

# **VALUTAZIONE DEL RISCHIO IN TOSSICOLOGIA OCCUPAZIONALE**

## **RELAZIONI**

P. Apostoli<sup>1</sup>, M. Manno<sup>2</sup>

## L'esposizione a basse dosi può produrre effetti?

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Sperimentale ed Applicata, Medicina del Lavoro e Igiene Industriale, Università degli Studi di Brescia

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Preventive, Università degli Studi di Napoli Federico II

**RIASSUNTO.** Obiettivo della presente relazione è quello di esaminare l'evidenza scientifica disponibile oggi in medicina e tossicologia occupazionali per rispondere al quesito posto nel titolo. Dopo un breve richiamo ai principi fondamentali che sono alla base della valutazione del rischio chimico (fattore di rischio, esposizione, suscettibilità, rischio), vengono esaminati, con esempi, i concetti generali di dose-effetto, dose-risposta e dose-soglia. Viene quindi evidenziata la differenza esistente tra effetti avversi *con* e quelli *senza* soglia e vengono descritte le metodologie oggi adottate nei due casi per la definizione dei valori limite di esposizione ad agenti chimici professionali. Queste sono rispettivamente basate sul livello-di-non-effetto-avverso-osservato o NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) e i fattori di sicurezza (FS) nel primo caso, e sulla dose-virtualmente-sicura (DVS) nel secondo caso. Le due metodologie sottendono due meccanismi d'azione diversi, l'uno di tipo deterministico e l'altro di tipo stocastico, e corrispondono a due andamenti diversi della curva dose-risposta alle basse dosi, appunto. Vengono quindi discussi i diversi significati generalmente attribuiti al termine "basse dosi", dal punto di vista semantico, tossicologico e operativo, con l'obiettivo di proporre un'interpretazione che possa raccogliere un consenso tra i medici del lavoro. La dose, o la concentrazione, può essere infatti definita bassa in quanto, a differenza di quella alta, non determina effetti tossici (basti pensare all'aforisma di Paracelso) o non è misurabile (al di sotto dei limiti di rilevabilità) o non si discosta significativamente dai valori riscontrati nella popolazione non esposta (valori di riferimento) o, infine, si colloca ben al di sotto dei valori permessi nei luoghi di lavoro (valori limite). Viene confrontato, infine, il concetto di "basse dosi" con quello, assai controverso, di "rischio moderato" recentemente introdotto dal D.Lgs 25/02 che recepisce la direttiva comunitaria 98/24/CE sulla protezione della salute e sicurezza dei lavoratori contro i rischi da agenti chimici. La valutazione della (bassa) dose non permette, da sola, una soddisfacente valutazione qualitativa e quantitativa del rischio, ma necessita di adeguate informazioni sul meccanismo di tossicità del composto e sulla suscettibilità della popolazione esposta: due fattori che necessitano la valutazione attenta e rigorosa del medico competente. Per una più estesa trattazione del rischio moderato e della sua interpretazione, si veda il documento *ad hoc* pure agli Atti. Concludendo, l'evidenza clinica, epidemiologica e tossicologica indica che in alcuni individui, popolazioni o circostanze si possono prevedere o evidenziare effetti avversi per la salute anche per esposizioni a dosi/concentrazioni cosiddette basse, a cui cioè per la gran parte dei soggetti o circostanze non si verificano effetti avversi. Ciò è dovuto ad un numero di fattori quali interazioni tossicologiche, ipersuscettibilità su base immuno-allergica o metabolica, sia genetica (polimorfismo) che acquisita (fenotipo), preesistenti patologie, abitudini voluttuarie o dietetiche ed altro ancora. Gli Autori concludono pertanto che per garantire una valutazione del rischio alle basse dosi che miri alla tutela di *tutti* i lavoratori, l'esperienza clinica, tossicologica ed epidemiologica del medico competente appare fondamentale e insostituibile.

**Parole chiave:** basse dosi, valutazione del rischio, suscettibilità individuale, valori limite, valori di riferimento, rischio moderato.

**ABSTRACT.** [www.gimle.fsm.it](http://www.gimle.fsm.it)

**CAN "LOW DOSES" CAUSE ADVERSE EFFECTS?** This paper aims to discuss the scientific evidence to answer the question in the title. After a brief mention of the fundamental toxicological principles of risk assessment (hazard, exposure, susceptibility, risk), the concepts of dose-response, dose-effect and threshold-dose are presented. The difference between adverse effects with and those without a threshold is highlighted, together with the corresponding methodologies used in risk assessment for the definition of the limit values, i.e. the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) and Safety Factor (SF) method and the Virtually Safe Dose (VSD) method. The two methods correspond to two different types of effect, i.e. deterministic and stochastic, and to two different shapes of the dose-response curve at low doses. The various possible meanings (semantic, toxicological and practical) of the terms "low doses" are discussed: a dose (or concentration) may be low because it does not cause measurable adverse effects (as from Paracelsus' aphorism) or because it is too low to be (analytically) measurable or because it is close to or within the "normal" values of a reference population or because it is well below the exposure limit(s). These various concepts are presented also in relation with the controversial concept of "moderate risk" introduced by a recent Italian legislation (D.Lgs 25/02) on the protection of the workers against chemical risk. It would not be appropriate to set a level of risk simply based on the dose (or the level of exposure) without considering the two other components of risk, i.e. hazard and susceptibility, whose estimation also needs a careful and competent evaluation by the occupational physician. For a thorough discussion of the "moderate risk" concept see a specific paper in these Proceedings. So, clinical, epidemiological and toxicological evidence indicates that in some individuals, groups of the population or circumstances, adverse effects can be observed or expected even at low doses, at which the large majority of the population shows no effect. This is due to a number of factors including toxicological interactions, immunoallergic mechanisms, metabolic hypersusceptibility, both genetic (polymorphism) and acquired (phenotype), preexisting traits or diseases, living habits, diet and others. The Authors conclude therefore that to ensure the protection of all the workers' health and safety, the clinical, toxicological and epidemiological expertise of the occupational physician appears to be fundamental and unreplaceable.

**Key words:** low doses, risk assessment, individual susceptibility, limit values, reference values, moderate risk.

### Introduzione

Obiettivo della presente relazione è quello di discutere il concetto di "basse dosi" in riferimento alla valutazione del rischio conseguente l'esposizione occupazionale ad agenti tossici. Per rispondere alla domanda posta nel titolo analizzeremo i possibili significati attribuibili a tale con-

cetto in medicina e tossicologia occupazionali con l'obiettivo di proporre una sua interpretazione che possa raccogliere un consenso nella disciplina. Cercheremo, infine, di collegare il concetto di "basse dosi", così come da noi inteso, a quello di "rischio moderato" recentemente e, a nostro modesto avviso, incautamente introdotto dal D.Lgs. 25/02 (1). Ciò con un duplice obiettivo: da un lato di favorire una corretta interpretazione dottrinale del citato e controverso decreto 25/02 e dall'altro di fornire un contributo pratico alla formulazione, da parte dei medici del lavoro competenti, di linee di intervento non solo giuridicamente corrette, ma anche scientificamente valide e, per quanto possibile, basate sull'evidenza.

## 1. Dose, esposizione, concentrazione, rischio

Prima di entrare nello specifico della relazione è necessario richiamare brevemente alcune definizioni e concetti-chiave.

Un primo punto riguarda il rapporto tra "dose" ed "esposizione". È noto infatti che la dose necessaria per determinare un dato effetto tossico dipende da vari fattori, tra cui modalità di esposizione, assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione del composto in causa. Inoltre, è importante tener presente che esistono diversi tipi di "dose", ciascuno con diverso significato tossicologico: dose esterna, dose inalata, dose assorbita, dose al bersaglio, dose eliminata, dose accumulata, ecc. Come pure esistono diverse vie di esposizione: inalatoria, per ingestione, cutanea, ecc. È necessario quindi, ogniquale volta si parli di dose, definire esattamente il contesto in cui si opera e la matrice ambientale o biologica cui ci si riferisce.

Una seconda importante puntualizzazione semantica va fatta per quanto concerne il rapporto tra "dose" e "concentrazione", due termini spesso usati come intercambiabili, ma in realtà di significato diverso e con unità di misura distinte. Da un punto di vista tossicologico, il concetto di dose va oltre quello di concentrazione esterna in quanto presuppone l'assorbimento dell'agente/composto e quindi, implicitamente, la sua interazione con l'organismo, a differenza della concentrazione che si limita alla misura della quantità dell'agente in una specifica matrice o solvente, in genere l'aria. La stima della dose al bersaglio (che è quella più direttamente correlata all'effetto) presuppone poi la conoscenza delle modalità di esposizione e della tossicocinetica del composto, ciò che non sempre è dato conoscere. Un problema pratico che ne risulta in termini di valutazione del rischio è il fatto che gli effetti dipendono dalla dose, mentre i limiti di esposizione sono espressi generalmente in concentrazioni. In altre parole, è sì vero che l'esposizione ad una concentrazione, ad esempio nell'aria, determina una dose al bersaglio la quale a sua volta produce l'effetto biologico; non è detto però che soggetti esposti alla stessa concentrazione abbiano la stessa dose al bersaglio.

Il terzo concetto riguarda il significato da dare al termine "rischio" per la salute (tralasciamo per semplicità di discutere il rischio per la sicurezza). Il rischio dunque può essere definito come possibilità o, meglio, probabilità che

in un certo individuo o gruppo di individui si verifichi un effetto avverso a seguito dell'esposizione ad una determinata (concentrazione di) sostanza. Tale definizione corrisponde all'equazione fondamentale seguente:

$$\text{RISCHIO} = f(\text{FATTORE DI RISCHIO}, \\ \text{ESPOSIZIONE}, \text{SUSCETTIBILITÀ})$$

È importante notare che in questa equazione l'esposizione rappresenta solo una delle tre variabili in giuoco e che non è quindi corretto valutare ed esprimere il "rischio" solo in funzione dell'esposizione (ovvero della dose/concentrazione esterna). Torneremo su questo punto in seguito (capitolo 5.2).

## 2. Dose-effetto, dose-risposta e dose-soglia

La relazione tra dose da un lato ed effetto o risposta dall'altro rappresenta il principio fondamentale che sta alla base della valutazione degli effetti tossici in generale e di quelli da composti chimici in particolare. Originariamente mutuato dalla farmacologia, il concetto ha poi assunto contenuti e metodi specifici in ambito tossicologico. La relazione può essere considerata da due prospettive diverse, quella clinica e quella epidemiologico-sperimentale, ed avere quindi significato diverso, ovvero:

a) il comparire o l'aumentare di un determinato effetto in un singolo individuo o gruppo di individui all'aumentare della dose (*dose-effetto*)

b) l'aumentare della percentuale di individui che manifestano un (pre)determinato effetto all'aumentare della dose (*dose-risposta*).

Sebbene entrambi i concetti siano applicabili alla medicina del lavoro, ai fini della presente trattazione ci riferiremo esclusivamente al secondo.

Perché la relazione dose-risposta possa dunque essere utilizzata quantitativamente nella valutazione del rischio, è necessario che si verifichino o, quanto meno, si deve presumere che si verifichino le seguenti principali condizioni di base: 1. l'effetto è sicuramente dovuto all'esposizione al composto chimico in questione (*rapporto di causalità*), 2. l'effetto è secondario all'interazione del composto con una specifica struttura o funzione biologica (*tessuto- od organo-bersaglio*), 3. l'entità dell'effetto è proporzionale alla concentrazione di composto, o di un suo metabolita, nell'organo bersaglio (*dose al bersaglio*), 4) la dose al bersaglio è proporzionale all'esposizione, 5. l'uomo è considerato essere la specie animale più sensibile, 6) è possibile estrapolare alle basse dosi l'effetto osservato alle alte dosi (*estrapolazione tra dosi*). Solo qualora tutte le condizioni sopraesposte si verifichino, è lecito utilizzare il rapporto dose-risposta a fini preventivi, valutandone in modo più approfondito sia gli aspetti qualitativi che quelli quantitativi.

Dal punto di vista qualitativo, la curva dose-risposta mostra, in genere, una tipica distribuzione normale, o gaussiana, in cui alcuni individui manifestano l'effetto a dosi sensibilmente più basse (*individui ipersuscettibili*) ed altri a dosi più alte (*individui resistenti*) che non la mag-

gioranza della popolazione. Altre caratteristiche importanti dell'andamento della curva, soprattutto alle dosi più basse, sono la pendenza e la forma. Ne consegue che dall'andamento della curva dose-risposta alle alte dosi (quelle in grado di determinare effetti osservabili) è possibile stimare il numero di individui che potrebbero manifestare l'effetto a seguito dell'esposizione ad una dose più bassa. Come pure, viceversa, calcolare la dose cui corrisponde una (pre)determinata percentuale di soggetti affetti.

Un terzo concetto fondamentale in tossicologia occupazionale è quello della dose-soglia. Dal punto di vista della tossicodinamica si può definire dose-soglia quella minima in grado, reagendo a livello di un recettore, di causare un effetto lesivo (*adverse*) in base a due criteri: o la minima quantità di agente che determina un effetto avverso misurabile (*Low Observed Adverse Effect Level* o *LOAEL*) o, viceversa, quella massima che non determina un effetto avverso osservabile (*No Observed Adverse Effect Level* o *NOAEL*). Analogamente, in medicina del lavoro si può pensare alla dose-soglia come alla minima dose assorbita, o la minima concentrazione nel sangue o la minima dose all'organo bersaglio, a cui si osserva un effetto avverso in una percentuale predefinita di lavoratori (o, viceversa, alla più alta che non determina alcun effetto).

Su questi pochi fondamentali concetti si basano essenzialmente tutte le metodologie, alcune delle quali peraltro assai complesse, oggi usate per la stima del rischio chimico ambientale e occupazionale. Tra queste citiamo il modello PBPK (*physiologically based pharmacokinetic model*), il Benchmark Dose (BMD) e quelli per la valutazione del rischio cancerogeno o di altri rischi specifici. Tutti questi modelli presentano tuttavia gravi limiti. Una difficoltà consiste ad esempio nell'impossibilità di verificare la correttezza del modello utilizzato per l'estrapolazione della probabilità dalle alte alle basse dosi. Un'altra difficoltà consiste nell'incertezza della forma e/o andamento della curva dose-risposta alle basse dosi. Ne deriva che un'applicazione acritica ed eccessivamente tecnicistica di questi modelli può portare ad una sovra- o sottostima del rischio.

In questo contesto il contributo del medico del lavoro può dimostrarsi fondamentale per migliorare la valutazione del rischio attraverso le sue conoscenze delle relazioni dose-effetto e dose-risposta per le diverse sostanze. Ciò può essere meglio compreso utilizzando il piombo come esempio.

Le principali conoscenze/evidenze che dovrebbero essere tenute presenti nella scelta delle strategie preventive e nella gestione del rischio da piombo (ed in particolare la sua massima espressione, ovvero la determinazione del valore limite) sono i seguenti:

- La diversa suscettibilità degli *enzimi coinvolti nella sintesi dell'eme* all'inibizione da piombo che avviene secondo meccanismi dose-dipendenti, per cui è possibile identificare i valori di piombemia al di sotto dei quali tali effetti non sono osservabili: l'anemia, ad esempio, inizia per valori di PbB superiori a 50 ug/dl; la ZPP si eleva per valori di PbB > 30-35 ug/dl; le coproporfirine per valori > 40 ug/dl; l'ALA-U per PbB > di 35-40 ug/dl; l'ALA deidratasi per valori molto più bassi, cioè > 10 ug/dl (2,3).

- Gli *effetti subclinici* dovuti al blocco da parte del Pb degli enzimi contenenti eme ed implicati ad esempio nel metabolismo del calcio, di aminoacidi e proteine, soprattutto a livello del SNC. Tali effetti possono manifestarsi per valori di piombemia inferiori a 40 ug/dl, anche se per questi livelli non sono osservabili effetti avversi (4).
- La maggiore frequenza di *disturbi a carico di SNP e SNC* per livelli di esposizione che variano tra i 30 ed i 70 ug/dl di piombemia ma senza una precisa relazione dose-effetto al di sotto dei 50 µg/10 ml (5).
- Gli *effetti sulla riproduzione* per lo più qualitativi e, anche per essi, senza precise relazioni dose-risposta; effetti del piombo sulla riproduzione nell'uomo non sono stati osservati per valori di piombemia inferiori a 40 ug/dl (6, 7).
- Gli *effetti cardiovascolari e sulla pressione arteriosa*: sebbene la questione se esista una vera e propria cardiopatia indotta da esposizione lavorativa a piombo sia ancora dibattuta, numerose evidenze mostrano un aumento della pressione arteriosa stimato attorno a 1-5 mm Hg per ogni raddoppio della piombemia. Inoltre, alcuni studi longitudinali mostrano una significativa correlazione fra i livelli di PbB e pressione arteriosa (sia considerando la pressione sistolica che la diastolica) in casistiche di soggetti appartenenti alla popolazione generale senza che sia chiaramente individuabile una dose-soglia (8).

### 3. Effetti con soglia ed effetti senza soglia

Tutti i modelli di valutazione della relazione dose-risposta possono essere ricondotti sostanzialmente a due sole categorie: quelli in cui è dimostrabile una dose al di sotto della quale non è osservabile alcun effetto (dose-soglia) e quelli in cui tale soglia non è dimostrabile. I due modelli corrispondono in generale a due diversi meccanismi di tossicità, l'uno di tipo deterministico, come ad esempio la neuro-, o la nefro- o la epatotossicità di metalli o solventi, l'altro di tipo stocastico, come l'azione dei cancerogeni genotossici. La distinzione tra modelli di dose-risposta *con* e quelli *senza* soglia sta alla base delle due diverse metodologie normalmente usate per calcolare i valori limite di esposizione agli agenti chimici nei luoghi di lavoro e di vita. Il primo metodo è basato sulla determinazione del livello di non-effetto-avverso e la riduzione di quest'ultimo in base a determinati fattori di sicurezza (FS). Il secondo metodo si basa sulla determinazione della dose virtualmente sicura (DVS), ovvero la dose di composto alla cui esposizione per tutta la vita corrisponde una probabilità che si verifichi l'effetto avverso così bassa da doversi considerare trascurabile (rischio irrilevante).

Nel primo caso (*effetto con soglia*), una volta individuato, epidemiologicamente o sperimentalmente, il NOAEL (ovvero la più alta dose che non determina effetti avversi nell'uomo o nell'animale), da tale valore viene calcolato il valore limite, dividendo il NOAEL stesso per dei fattori di sicurezza che tengono conto dell'incertezza complessiva dei metodi adottati, inclusa la statistica, della gra-

vità dell'effetto, del livello di protezione che si vuole raggiungere ed altri ancora.

Nel secondo caso (*effetto senza soglia*) si presume che anche le basse dosi possano determinare un effetto, per quanto piccolo. Qui il processo adottato è in qualche modo inverso: si parte dal rischio per arrivare alla dose. È necessario cioè dapprima stabilire il livello di protezione che si vuole raggiungere, ovvero il livello di rischio che si è disposti ad accettare, e quindi da questo inferire la dose o concentrazione corrispondente a tale rischio. Un caso di tumore per milione di esposti per tutta la vita è considerato generalmente un livello di rischio accettabile. Questi due metodi costituiscono tuttora lo strumento più largamente utilizzato nella gestione del rischio chimico, sia in ambito occupazionale che ambientale.

Entrambi i metodi presentano tuttavia forti limiti intrinseci che dipendono principalmente dalla scelta e sensibilità del modello usato, sia animale che epidemiologico, e dal livello delle conoscenze sul meccanismo d'azione del composto in causa. Tra i principali limiti dell'uso del modello animale sono la possibile diversa sensibilità tossicodinamica della specie usata, le differenze tossicocinetiche e metaboliche, l'imprecisione dei metodi di estrapolazione dei risultati dall'animale all'uomo, le alte dosi testate nell'animale, il basso numero di animali testati (e il conseguente scarso potere statistico) ed altri ancora. In genere si cerca di superare tali limiti mediante l'adozione di alcuni assunti conservativi predefiniti tra cui, ad esempio: l'uomo è sensibile come la specie animale più sensibile, il composto viene metabolizzato nell'animale attraverso le stesse vie metaboliche che nell'uomo, è possibile estrapolare alle basse dosi l'effetto osservato alle alte dosi, e così via.

Anche nel caso degli studi epidemiologici vi sono forti elementi di incertezza. Da sottolineare sono la difficoltà nella stima dell'esposizione, la presenza di fattori di confondimento ignoti o sottostimati, gli errori sistematici di classificazione (bias) ed altri ancora. Ma il principale limite nell'uso dei FS o della DVS come metodi per stabilire i valori limite è rappresentato dalla loro incapacità di tenere in debito conto la suscettibilità individuale all'effetto tossico. Nel primo caso (FS, ovvero effetto deterministico con soglia) la suscettibilità ha un significato "quantitativo" in quanto il soggetto ipersuscettibile presenta un abbassamento della soglia di non-effetto-avverso-osservabile (NOAEL). Nel secondo modello (DVS, ovvero effetto stocastico senza soglia) la suscettibilità ha un significato "qualitativo", ovvero l'individuo suscettibile presenta, a parità di esposizione, una maggiore probabilità di manifestare l'effetto (per es. cancerogenesi). Tale limitazione può essere ovviata adottando rispettivamente un FS maggiore per i modelli con soglia ed una DVS più bassa per quelli senza soglia. Sempre che si possano affrontare i conseguenti maggiori costi di bonifica ambientale, i limiti tecnici analitici e le eventuali limitazioni di produzione ed utilizzo dei composti in causa.

#### 4. Possibili definizioni di "basse dosi"

La prima formulazione del concetto di "bassa dose" risale probabilmente al famoso aforisma di Paracelso (1493-

1541) secondo cui *"Tutte le sostanze sono tossiche. La dose, se sufficientemente bassa, può da sola eliminare la tossicità"*. Secondo Paracelso la dose è detta "bassa" in quanto, a differenza di quella alta, non dà tossicità. Il concetto di dose, quindi, è in questo caso intimamente legato ai suoi effetti più che alla sua misurabilità, ed ha quindi un significato qualitativo (tossicità sì, tossicità no) più che quantitativo (valore numerico della dose).

La definizione di "bassa dose" intesa come concentrazione di una sostanza nell'ambiente di lavoro o nelle matrici biologiche può in realtà riguardare anche altri parametri, assai diversi tra loro:

1. la quantità di agente chimico misurata nell'ambiente o nell'individuo in rapporto alla sensibilità e specificità delle strumentazioni e delle tecniche di misura (limiti di rilevabilità);
2. il livello quantitativo, misurato in un gruppo di soggetti esposti professionalmente, rispetto a quello presente nella popolazione generale (dose di riferimento);
3. la collocazione di tale livello rispetto a dosi di specifico significato in termini di valutazione e gestione del rischio (livello d'azione, valori limite).

Considereremo ora questi tre casi separatamente, anche per chiarire il diverso ruolo giocato da chi effettua le misure e da chi, invece, è chiamato ad interpretarne il significato ambientale o tossicologico.

#### 4.1 "Bassa dose" in rapporto alla sua misurabilità

Da un punto di vista empirico l'uso del termine "basso" è da collegare alle caratteristiche di sensibilità, ovvero ai limiti di rilevabilità (quantizzazione), dei sistemi di misurazione e delle tecniche analitiche disponibili in un dato momento o luogo, senza alcun significato in termini di effetto o rischio. In tal senso, "bassa dose" significa "quantità scarsa, piccola, micro o anche "non misurabile". Nulla ci dice, invece, circa i suoi possibili effetti. In questo caso il significato di "bassa dose" ha un valore relativo in quanto risente fortemente dell'evoluzione degli strumenti e dei metodi di misura. Basti pensare che sostanze ritenute a bassa concentrazione o non misurabili fino a pochi anni fa, sono oggi routinariamente monitorate nelle più diverse matrici.

La principale limitazione operativa che rende non tutte le tecniche analitiche idonee a studiare le basse concentrazioni è quello di assicurare adeguati limiti di rilevabilità. Il limite di rilevabilità (LR) è la più bassa concentrazione di analita che può essere distinta con una certa probabilità dal bianco e pertanto, per convenzione, deve essere inferiore di almeno di un ordine di grandezza rispetto alla più bassa concentrazione che deve essere misurata con una sufficiente precisione. Si distinguono due limiti di rilevabilità: il *limite di rilevabilità strumentale (LRS)* che va riferito alla lettura replicata (10 volte, in genere) della stessa soluzione, e il *limite di rilevabilità del metodo (LRM)* che è relativo a letture replicate del bianco che ha subito lo stesso trattamento del campione reale. Il valore numerico del limite di *rilevabilità* si calcola moltiplicando il livello di rischio che si assume presente per la DS del bianco (confidenza). Il limite raccomandato dall'IUPAC per distribuzioni normali, con una probabilità di rischio del 5%, è di 3 DS del bianco. Il limite di *quantizzazione*, infine, ovvero la

più piccola concentrazione di analita che può essere identificata e misurata secondo una precisione definita (per es. del 10-20%), è invece pari a 10 DS del bianco. È stato ad esempio dimostrato che le correnti determinazioni del HgU con tecnica ai vapori freddi e AAS, hanno LR compresi tra 0.3 e 0.5 mg/L, cioè limiti dello stesso ordine di grandezza dei valori di riferimento (VR) attesi (0.5-1 mg/L). Solo l'uso di tecniche più sofisticate (FI-CV/ICPMS) consente di raggiungere LR dell'ordine degli 0.02-0.05 mg/L, ovvero 10 volte inferiori ai valori attesi e quindi più congrui alla produzione di VR.

Queste considerazioni sui limiti analitici delle "Basse dosi" sono importanti soprattutto per le sostanze per le quali si è proposto, per comodità o convenzione, un modello senza dose-soglia (cancerogeni genotossici) e per le quali in via teorica anche il riscontro di una singola molecola o atomo potrebbe ingenerare preoccupazione.

#### 4.2 "Bassa dose" in rapporto ai valori di riferimento

Il termine "valore normale" in Biologia e Medicina è stato spesso usato indifferentemente nei due diversi significati di "non patologico" e di "abituale". Il suo impiego, pertanto, non risultava affatto chiaro, specie quando si cercava artatamente di far coincidere i due diversi significati. Per alcuni parametri, infatti, quali ad esempio i livelli di lipidi nel sangue, risultava difficile sostenere che valori "normali" (cioè abituali) dosati nelle popolazioni dei paesi occidentali fossero anche non patologici, cioè associabili all'assenza di alterazioni della salute. Ciò consigliò l'uso, di volta in volta, di termini alternativi più precisi e rispondenti al contesto specifico, quali "sano", "non patologico", "tipico", "caratteristico", ecc. Per far fronte a queste problematiche e permettere una corretta interpretazione dei dati di laboratorio, offerti peraltro dalla chimica clinica in numero sempre maggiore, nel 1968, da un'intuizione di R. Graspeck e N. Saris, nasce il concetto di "reference value" o "valore di riferimento" come viene tuttora chiamato (9).

Il principale concetto introdotto da questi autori è che i risultati delle determinazioni di laboratorio non possono essere valutati individualmente, ma devono essere confrontati con opportuni valori ottenuti da soggetti classificabili come "riferimenti", ovvero come termini di confronto per i soggetti esaminati. Tali "riferimenti" (corrispondenti ai "controlli" delle scienze mediche sperimentali) non sono necessariamente soggetti "sani" o soggetti rappresentativi dell'intera "popolazione generale", ma semplicemente individui, da un lato appartenenti allo stesso gruppo della popolazione dei soggetti i cui valori sono da esaminare, e dall'altro dei quali devono essere note (dichiarate) le caratteristiche (10).

L'aspetto più importante che rende peculiare la tematica dei V.R. nell'ambito di discipline come la Medicina del Lavoro è rappresentato dalla natura degli analiti, in parte simile a quella delle comuni variabili chimico-cliniche (parametri biologici ed elementi cosiddetti "essenziali"), in parte differente (xenobiotici e loro metaboliti). Nel primo gruppo, quello degli analiti, rientrano ad esempio:

1. metalli ed altri elementi, essenziali a concentrazioni fisiologiche ma tossici a concentrazioni elevate (Cr, As, Ni, Fe, Zn, etc.);

2. metaboliti non specifici di solventi, presenti cioè nelle matrici biologiche anche in assenza di una esposizione professionale o ambientale, come ad es. l'acido ippurico;
3. indicatori di effetto di metalli pesanti, come Pb o Cd, che sono però presenti a livelli dosabili anche quando non vi è esposizione a tali metalli, come l'acido deltaaminolevulinico urinario (ALA-U), la zinco-protoporfirina eritrocitaria (ZPP), la beta 2-microglobulina.

In tutti questi casi i VR sono da considerare corrispondenti alla sola concentrazione di base derivante da processi fisiologici-omeostatici ("baseline concentration"), o della somma di questa alla "quota" ascrivibile all'esposizione ambientale totale (aerea, idrica, alimentare, voluttuaria, hobbistica, ecc.) dei soggetti sui quali sono stati effettuati i dosaggi.

Nel secondo gruppo (xenobiotici) rientrano invece elementi, composti o sostanze estranee senza una funzione biologica nota e quindi valutabili esclusivamente per il loro potenziale tossicologico. In via teorica tali composti, siano essi di origine naturale o di sintesi, non dovrebbero essere presenti, e quindi nemmeno misurabili, nelle matrici biologiche. Pertanto, sempre in linea di principio, i VR nelle matrici biologiche per queste sostanze/elementi dovrebbero essere pari a zero ("controllo negativo") e, quindi, con tale valore pari a "zero" andrebbero confrontati i valori incogniti. Sarebbe pertanto automatica la dimostrazione dell'avvenuta esposizione-assorbimento per quei soggetti che presentassero un valore per quanto basso ma diverso da zero. Questa ipotesi è tuttavia irrealistica per la maggior parte dei composti, a causa dell'ampia ecodispersione, accentuatasi con l'epoca industriale, degli elementi e composti chimici. Questo fenomeno, oggi ben noto, ha fatto sì che, quando le tecniche analitiche lo hanno permesso, xenobiotici sono stati reperiti nelle matrici biologiche anche di gruppi della popolazione residenti in aree remote. Ben noto è, ad esempio, il riscontro di livelli misurabili di piombo, mercurio o composti organoclorurati sintetici, quali pesticidi, PCB o diossine, in abitanti o animali dell'Himalaia, delle Ande o delle zone polari, anche se a tali livelli di concentrazione non è (o non è stato ancora) dimostrato un particolare effetto sulla salute umana. Da qui è ingenerato l'uso, peraltro incorretto, di parlare ancora di "valori normali" per composti che in realtà sono comunque "estranei" dal punto di vista biologico.

È quindi la diversa origine, piuttosto che la misurabilità, che costituisce la maggiore differenza tra xenobiotici da un lato ed analiti fisiologici dall'altro. Per procedere alla produzione di VR per elementi o composti di questi tipo non saranno necessarie solo le abituali conoscenze dei fattori preanalitici ed analitici, ma anche quelle di tipo tossicocinetico e tossicodinamico. Infatti è solo conoscendo come un elemento o un composto da un lato è assorbito, distribuito, metabolizzato ed escreto (tossicocinetica) e dall'altro interagisce col sistema biologico (tossicodinamica) che può essere attribuito un "significato" ai livelli di indicatore misurati nelle matrici biologiche. Tra le tante variabili sono infatti quelle tossicocinetiche e tossicodinamiche a condizionare più di ogni altra la definizione di VR corretti, a partire dal controllo dei fattori di variabilità che le caratterizzano (11).

### 4.3 “Bassa dose” in rapporto ai valori limite

Un punto non eludibile quando si valutano i valori limite ed in particolare l’appropriatezza dei livelli adottati è quello di domandarsi “a cosa servono?” ovvero, in altre parole, se servono a tutelare la salute o se hanno (anche) altre finalità. Ad esempio, l’ACGIH (17) definisce i valori limite di soglia (*Threshold Limit Values* o *TLV*) come “le concentrazioni delle sostanze aerodisperse al di sotto delle quali si ritiene che la maggior parte dei lavoratori possa rimanere esposta ripetutamente giorno dopo giorno senza effetti negativi per la salute”. La stessa Associazione precisa che “a causa della notevole variabilità della suscettibilità individuale, una piccola percentuale di lavoratori può accusare disagio in presenza di alcune sostanze le cui concentrazioni siano uguali o inferiori ai TLV e, in una più piccola percentuale di individui, si può osservare un effetto più marcato per l’aggravarsi di condizioni preesistenti o per l’insorgere di una malattia professionale”. Gli igienisti tedeschi (DFG) hanno invece proposto limiti (MAK) definiti come massima concentrazione al posto di lavoro, cioè “concentrazione massima permessibile di un composto chimico presente nell’atmosfera di un’area di lavoro che, allo stato delle conoscenze, generalmente non compromette la salute dell’operatore, né causa disturbo.” Qui la tutela, come si vede, è più ampia, includendo anche uno stadio precedente la malattia vera e propria come il “disturbo” appunto (18). Sempre la DFG adotta, per i cancerogeni, limiti di tutt’altro significato, detti limiti tecnici di esposizione (TRK). Questi sono proposti per sostanze per cui non si ritiene di poter adottare i MAK (cioè i limiti che hanno un significato di protezione della salute) ma qualcosa di diverso, cioè appunto valori in grado di orientare nelle attività di prevenzione (8). In ambito di Unione Europea è stato istituito il Comitato Scientifico per i Limiti di Esposizione Professionale (*Scientific Committee for Occupational Exposure Limits* o *SCOEL*) che si propone di definire due tipi di limiti di esposizione professionale (*Occupational Exposure Limits* o *OELs*): valori limite obbligatori e valori limite indicativi. I valori limite potranno cioè essere o “basati sulla salute” (*health based*), per quelle sostanze per cui è possibile identificare chiaramente una dose soglia al di sotto della quale l’esposizione non darà, presumibilmente, origine ad effetti avversi, o “pragmatici”, per quelle sostanze per le quali le conoscenze attuali non consentono di definire con sicurezza una dose soglia (cancerogene, genotossiche, sensibilizzanti), e che comunque saranno fissati a concentrazioni tali da comportare un livello di rischio sufficientemente basso (9). Va ricordato, peraltro, che altri valori limite fissati dall’Unione Europea, quali ad esempio quelli per i pesticidi nelle acque potabili, hanno più un significato tecnico che tossicologico, in quanto si basano su criteri di misurabilità analitica.

Nel D.Lgs. 25/02 il limite viene definito come “limite della concentrazione media ponderata nel tempo di un agente chimico nell’aria all’interno della zona di respirazione di un lavoratore in relazione ad un determinato periodo di riferimento” e ne viene riportato un primo elenco nell’allegato VIII-ter. Nell’allegato VIII-ter, al punto 5 viene riportato: “valore limite al di sopra del quale non vi

deve essere esposizione e che si riferisce ad un periodo di 15 minuti se non diversamente specificato”. Non viene invece definito il significato di “valore limite indicativo” di cui al 60 terdecies. Passando al limite biologico, nel D.Lgs. 25/02 esso viene definito come “il limite della concentrazione del relativo agente, di un suo metabolita, o di un indicatore di effetto, nell’appropriato mezzo biologico”. L’allegato VIII-quater riguarda poi i “valori limite biologici obbligatori e procedure di sorveglianza sanitaria”. Il limite biologico per il piombo ematico (con le opportune correzioni rispetto al primo testo) è fissato a 60 ug/100 ml di sangue, precisando che per le lavoratrici in età fertile il riscontro di valori di piombemia superiori a 40 ug/100 ml di sangue comporta, comunque, l’allontanamento dall’esposizione (quest’ultima previsione sembra limitata quindi alle lavoratrici in età fertile). Anche per i limiti biologici, quindi, non viene precisato il significato preciso, come fa invece l’ACGIH con gli indici biologici di esposizione (BEIs) che rappresentano un indice integrato corrispondente al relativo TLV-TWA, e che hanno pertanto un valore di protezione della maggior parte dei lavoratori dalla comparsa di effetti avversi alla salute.

La DFG fissa a sua volta come limiti biologici i BAT, e cioè concentrazioni di sostanze chimiche o metaboliti in fluidi biologici che generalmente non si associano ad effetti negativi sulla salute degli operatori esposti, e gli EKA nello specifico per i cancerogeni, che hanno invece il significato di indicatori utili al controllo delle esposizioni per monitorare l’efficacia dei provvedimenti preventivi.

In ambito Europeo, i valori limite biologici (*Biological Limit Values* o *BLVs*) fissati dallo SCOEL (16) devono essere fissati a livelli sufficientemente bassi da prevenire effetti nocivi per la salute in base a tre criteri diversi: il livello biologico di esposizione corrispondente al rispettivo OEL (stesso criterio dell’ACGIH), il livello biologico di esposizione a cui non vi è effetto avverso e il livello biologico di effetto considerato non avverso.

È chiaro che una definizione di “bassa dose” in rapporto ad un determinato valore limite, sia ambientale che biologico, richiede la comprensione del significato di quel particolare valore limite ed in particolare dei criteri in base ai quali il limite stesso è stato fissato (health-based, indicativo, tecnico, analitico, ecc).

### 5. “Basse dosi” e “rischio moderato”...

Il recente documento del Comitato Consultivo istituito dal D.Lgs 25/02 per la determinazione e l’aggiornamento dei valori limite di esposizione professionale e dei valori limite biologici relativi agli agenti chimici è utile a chiarire le modifiche di tipo permissivo, anche sostanziali, apportate in corso di recepimento attuativo da parte del legislatore italiano al testo originale della direttiva europea. Il documento, peraltro, ha dato un’interpretazione del significato del cosiddetto “rischio moderato” che solleva più domande che risposte. Da un lato si associa il rischio moderato alla dizione “rischio irrilevante per la salute” (così com’era in effetti definito dalla direttiva europea origina-

le) e subito dopo si definisce il rischio moderato come “una soglia al di sotto della quale il rischio è basso”.

Il decreto 25/02 (1) prevede che “se i risultati della valutazione dei rischi dimostrano che, in relazione al tipo e alle quantità di un agente chimico pericoloso ed alle modalità e frequenza di esposizione a tale agente presente sul luogo di lavoro, vi è solo un rischio moderato per la sicurezza e la salute dei lavoratori e che le misure di cui al comma 1 (progettazione e organizzazione, fornitura di attrezzature idonee, riduzione al minimo del numero dei lavoratori, riduzione al minimo della durata ed intensità della esposizione, misure igieniche adeguate, riduzione al minimo della quantità di agenti sul luogo di lavoro, metodi di lavoro appropriati, n.d.a.) sono sufficienti a ridurre il rischio, non si applicano le disposizioni degli articoli 60-sexies, 60-septies, 60-decies, 60-undecies” (le misure generali di tutela e la sorveglianza sanitaria, n.d.a.). Ci sembra utile e pertinente, quindi, discutere il rapporto esistente tra “basse dosi” e “rischio moderato” per dare un contributo sia alla laboriosa interpretazione del “rischio moderato”, sia alla definizione, una volta per tutte, dei criteri per la sorveglianza sanitaria dei lavoratori esposti a rischio chimico.

### 5.1 ...da un punto di vista semantico

Un concetto di tale rilevanza ed innovazione quale quello di “rischio moderato” non è definito dal decreto, ma viene rimandato ad atti tecnici successivi o, in alternativa, ad atti non tecnici, ovvero a decisioni delle associazioni datoriali di categoria o dei singoli datori di lavoro. L'aggettivo “moderato” è parso fin dall'inizio non adeguato ad esprimere i concetti sottesi nella Direttiva madre (12). “Moderato” ha infatti semantica, etimologia ed implicazioni pratiche del tutto dissimili da quelli degli equivalenti aggettivi adottati nelle altre lingue europee (“geringfügiges”, “lieve”, “faible”, “slight”, “baixo”, “ringe”, “gerig”, “kyseisen”, “ringa”, “micro”). L'equipollenza di tutti questi sarebbe da assegnare piuttosto, in italiano, a termini quali “minimo”, “basso”, “lieve”, “piccolo”, “leggero”, “esiguo”, “modesto”, “trascurabile”. Nelle abituali scale da “inesistente” a “molto elevato”, “moderato” generalmente si colloca ad un livello superiore a “basso”, e cioè ad un livello decisamente apprezzabile. Ciò è confermato dalla classificazione internazionale del funzionamento e della disabilità ICF dell'OMS (13) che propone la seguente scala:

1. nessun problema (assente, trascurabile)
2. problema lieve (leggero, piccolo)
3. problema medio (moderato, discreto)
4. problema grave (notevole, estremo)
5. problema completo (totale).

Mentre è chiara la collocazione intermedia di “moderato”, il termine “basso” potrebbe situarsi al secondo livello o tra il primo e il secondo livello. Noi riteniamo pertanto che, proprio nel rispetto di una maggiore chiarezza e precisione, si sarebbe dovuto usare un termine corrispondente a quello dell'action level, come peraltro già fissato in passato (D.Lgs 277/91), cioè un valore operativo inferiore a quello limite e al di sotto del quale non si ritengono necessari altri specifici interventi (oltre il monitoraggio ambientale e/o biologico).

### 5.2 ...da un punto di vista tossicologico

Anche da un punto di vista strettamente tossicologico non pare proponibile, in base ai principi fondanti la valutazione del rischio, associare il concetto di “rischio moderato” a quello di “bassa dose”. Secondo tali principi il rischio viene definito come la probabilità che si verifichi un effetto sulla salute (*rischio, R*) in un dato individuo o gruppo di individui (*suscettibilità, S*) a seguito di una data esposizione (o dose, *E*) a un certo agente chimico (*fattore di rischio, FR*). Da ciò deriva che la dose è solo una delle tre variabili che compongono l'equazione fondamentale del rischio (già riportata nel capitolo 1), ovvero:  $R = f(FR, E, S)$ . In altre parole, una stima razionale del rischio deve tener conto non solo della dose (esposizione) ma anche del meccanismo d'azione (tossicodinamica) dell'agente chimico e della suscettibilità dell'individuo. È noto, infatti, che gli effetti tossici di molti agenti chimici, sia di tipo deterministico (ad esempio la nefrotossicità da metalli) che di tipo stocastico (cancerogenesi), dipendono fortemente da elementi caratterizzati da un'elevata variabilità intra- ed inter-individuale, siano essi geneticamente predeterminati o acquisiti. Tra questi ricordiamo l'assorbimento e l'escrezione, la capacità metabolica di attivazione e detossificazione (da parte del sistema del citocromo P450-dipendente e di altri enzimi metabolici), la capacità di riparazione del DNA ed altri ancora.

Una definizione di “rischio moderato” come quello corrispondente all'esposizione ad una bassa dose è pertanto scientificamente accettabile *solo* in condizioni e per composti di cui sia noto il meccanismo d'azione e sia definita la relazione dose-effetto e dose-risposta, e per i quali vi sia una bassa variabilità della risposta individuale. Condizioni queste che non si verificano frequentemente. Cercheremo di esemplificare questo concetto con tre esempi di effetti deterministici conseguenti l'esposizione a tre diversi composti: il primo in cui possiamo ragionevolmente ritenere che tutte le condizioni sono rispettate, il secondo in cui vi sono importanti elementi di incertezza, il terzo in cui l'assunto è chiaramente improponibile.

*Esempio 1:* monossido di carbonio. Il CO rappresenta un agente tossico i cui effetti sulla salute sono noti da tempo, il cui meccanismo d'azione è ben definito e la cui variabilità biologica nella risposta dei diversi individui è di entità limitata. In questo caso non ci sembrerebbe scientificamente scorretto definire il livello di rischio in base all'unica variabile indipendente significativa e cioè la dose esterna o interna che sia.

*Esempio 2:* piombo. Anche in questo caso gli effetti e i meccanismi di tossicità sono ben conosciuti. Tuttavia esiste una discreta variabilità individuale della risposta in base alla suscettibilità personale, alle eventuali patologie preesistenti o alla durata e modalità di esposizione, che suggeriscono cautela nell'utilizzo della sola dose quale elemento di valutazione del rischio.

*Esempio 3:* tetracloruro di carbonio. In questo caso è nota una notevole variabilità di risposta in base alla suscettibilità congenita o acquisita. Basti pensare che la  $DL_{50}$  (dose letale 50%) per l'uomo varia da 1,5 a 100 ml, cioè entro un margine di ben due ordini di grandezza. È evidente in questo caso che la conoscenza della dose non può da sola predire correttamente il livello di rischio.

Concludendo, la valutazione quantitativa del rischio, e conseguentemente l'interpretazione di rischio moderato, è diversa a seconda del composto in causa, del contesto e dell'obiettivo che tale valutazione si prefigge, ovvero la prevenzione della tossicità acuta, o di quella cronica, o della cancerogenesi, ecc. Non è pertanto ragionevolmente ipotizzabile un'unica definizione di "rischio moderato" per tutti i composti chimici semplicemente sulla base della sola dose.

### 5.3 ...da un punto di vista operativo

La "bassa dose" può essere anche interpretata confrontandola con valori guida come i livelli di azione e i valori limite. In Igiene Industriale, il concetto di livello di azione o di intervento (L.A.) nasce da una elaborazione NIOSH di fine anni '70, che si proponeva di fissare criteri per la valutazione della conformità ai limiti ambientali. Tali criteri sono stati poi messi a punto da Tuggle e Rock, anche attraverso un affinamento delle strategie di monitoraggio ambientale (14,15). Si tratta di un approccio statistico, per cui una stima dell'esposizione inferiore a L.A. indica una esposizione lavorativa accettabile ed una stima maggiore una esposizione probabilmente non accettabile. Basandosi sui dati di variabilità ambientale disponibili e caratterizzati da una deviazione geometrica standard media di 1.22, il NIOSH ha calcolato nel valore pari al 50% dello standard il limite di concentrazione che consente, con una confidenza del 95%, un superamento dello standard in meno del 5% dei turni di lavoro. In sintesi  $L.A. = 0.5 \text{ PEL}$ .

Nel monitoraggio biologico un L.A. biologico può essere definito (sulla falsariga dei limiti biologici) come L.A. equivalente, e può essere derivato sia dal L.A. ambientale, sia come L.A. assoluto, cioè come risultato di specifiche ricerche tossicologiche, cliniche ed epidemiologiche volte alla sua definizione, così come previsto, ad esempio, per i limiti biologici dell'UE (16). Questo secondo tipo di limite biologico, che è da confrontare al valore di riferimento che si misura nella popolazione non professionalmente esposta, presenta difficoltà anche di ordine concettuale nella sua definizione, soprattutto per i tossici che causano effetti stocastici. Come sancire ufficialmente, ad esempio, un'esposizione professionale, pur bassa, a cancerogeni?

In base a quanto detto sopra sui L.A. e da una prima interpretazione del Decreto 25/02 si può prospettare la possibilità di classificare le aziende che impiegano agenti chimici in tre categorie:

- nella prima rientrano quelle per le quali, sulla base di una "giustificazione" (comma 5, art. 60-quater), si rende "non necessaria una ulteriore valutazione maggiormente dettagliata dei rischi" e, quindi, non si richiedono più accurate attività conoscitive;
- nella seconda (tra giustificazione e rischio moderato) le aziende nelle quali accanto alla valutazione del livello di rischio si deve dimostrare che le misure già adottate "sono sufficienti a ridurre il rischio". In queste aziende non si applicano misure di tutela specifiche né la sorveglianza sanitaria. Nel secondo gruppo, pertanto, sono necessarie attività conoscitive di livello superiore a quelle del primo gruppo, tali da poter consentire decisioni di non applicazione di specifici interventi preventivi;
- nella terza le aziende a rischio moderato appunto.

## Discussione

Valutazione del rischio e sorveglianza sanitaria costituiscono i due pilastri fondamentali della pratica della medicina del lavoro oggi. È prassi, infatti, che il numero e tipo degli accertamenti clinici, strumentali e di monitoraggio biologico cui sottoporre i singoli lavoratori nel corso della sorveglianza sanitaria, siano definiti sulla base della natura dei rischi specifici individuati, mentre la periodicità degli accertamenti sia fissata sulla base dell'entità dei rischi medesimi e delle caratteristiche delle popolazioni sotto controllo. La sorveglianza sanitaria trae la sua motivazione e la sua esatta definizione nell'ambito delle procedure dell'accertamento del rischio, ma quando ben condotta può essa stessa diventare una fonte di informazioni di primaria importanza per il processo dinamico di valutazione del rischio. L'osservazione nel corso della sorveglianza sanitaria di effetti clinici o strumentali anche minimi o di dati di monitoraggio biologico che dimostrino l'esistenza di una esposizione eccessiva o di un effetto biologico o di una suscettibilità, induce necessariamente una revisione delle procedure di accertamento del rischio ed un rafforzamento dei controlli e accertamenti sanitari, estendendone eventualmente il numero e/o accorciandone la periodicità.

Tutto ciò rischierebbe, tuttavia, di essere vanificato se, attraverso una troppo permissiva definizione del "rischio moderato", si dovessero escludere dall'obbligo della sorveglianza sanitaria fasce di lavoratori a maggior rischio, i soggetti ipersuscettibili, che, per definizione, non sono tutelati neppure per esposizioni a concentrazioni di agenti chimici al di sotto dei limiti di esposizione. Tra questi includiamo non solo categorie note come gli anziani, le donne, i portatori di patologie croniche non invalidanti o non interamente invalidanti, gli atopici, chi assume determinate terapie farmacologiche, i forti bevitori ed altre categorie, ma anche categorie atipiche, sempre in maggior numero, quali i non caucasici o semplicemente i lavoratori che per difficoltà linguistiche od altre ragioni presentino inadeguati livelli di formazione e informazione sui rischi. L'esclusione di questi lavoratori dalla sorveglianza sanitaria inevitabilmente si ripercuoterebbe negativamente non solo sugli stessi lavoratori, che vedrebbero ridotti i livelli di tutela della salute e sicurezza stabiliti dalla precedente legislazione, ma anche sugli stessi datori di lavoro per i quali sarebbe facile prevedere un aumento dei contenziosi civili e penali a seguito dell'insorgenza di patologie professionali pur in presenza di giudizi di "valutazione non necessaria" o di "rischio moderato" non adeguatamente dimostrati o francamente errati.

Quanto ai criteri da adottare per la definizione quantitativa del "rischio moderato", l'individuazione di un livello di esposizione (sia essa espressa in dose o in concentrazione) corrispondente ad un rischio moderato, ovvero irrilevante per la salute, dovrà essere limitata a composti e condizioni ben definiti, come detto sopra. Appare chiaro che, in tali casi, l'esposizione corrispondente al "rischio moderato" dovrà comunque collocarsi in un ambito compreso tra VR e valori limite (VL). Vi è la necessità pertanto di non considerare VR e VL separatamente gli uni dagli

altri, non essendo proponibili, ad esempio, VL inferiori ai VR. Per approfondire il significato del rapporto tra VR e VL potrebbe essere utile partire dalle diverse "aree di esposizione" sulle quali i diversi valori dovrebbero insistere, in un continuum che parte dalla non-esposizione e arriva all'esposizione massima. La *prima area* è quella dell'esposizione ambientale complessiva (area di dominio dei VR) che comprende una zona di certezza di non effetto ed un'altra zona nella quale si sospettano o sono già stati dimostrati effetti verso i quali però non si ritiene (opportuno, utile, vantaggioso) intervenire. La *seconda area* parte dalla precedente zona degli effetti verso i quali non si interviene ed arriva ad una zona di effetti iniziali giudicati meritevoli di attenzione. Questa zona è quella più "dinamica" in quanto maggiormente soggetta all'influenza delle nuove acquisizioni scientifiche e nella quale i VR potrebbero fornire un rilevante contributo, ad esempio entrando nell'interpretazione delle evidenze epidemiologiche. Vi è poi la *terza area* degli effetti da evitare-contenere, quella dei valori limite veri e propri, verso la quale maggiori sono le esperienze e gli strumenti di intervento della Medicina del Lavoro e della Tossicologia Industriale e Ambientale (19).

In uno specifico ambito, come quello dell'esposizione a cancerogeni, potrebbe persino realizzarsi una saldatura fra VR e VL. Da sempre la proponibilità o meno dei valori limite per i composti cancerogeni è stata oggetto di discussioni e polemiche che a volte hanno trasceso l'ambito più strettamente scientifico. In alcuni casi potrebbe essere utile, ad esempio, porre come riferimento la quantità di cancerogeno "ormai" presente nell'ambiente generale di vita e dalla quale non si può prescindere per qualsiasi intervento ambientale o lavorativo. Da questo valore si dovrebbe partire per valutare gli assorbimenti aggiuntivi a questo "fondo naturale", siano essi di origine individuale, ambientale o occupazionale, ed ovviare così ad una delle principali carenze oggi riscontrabili nella valutazione dei dati epidemiologici. Tale "fondo naturale" rappresenta infatti il valore di esposizione della popolazione rispetto alla quale vengono poi calcolati gli eccessi di mortalità specifica per tumori dei diversi gruppi professionalmente esposti. Una riflessione a parte va fatta, a nostro avviso, sulla scelta che pare ormai costante, nel recepimento delle direttive europee, di adottare sempre e comunque i limiti proposti, senza mai utilizzare la possibilità fornita dai trattati comunitari di stabilire limiti più restrittivi o meglio adeguati al tipo e livello dei rischi presenti nel nostro paese. L'adozione di valori per i quali è prevista la non applicazione della norma di tutela superiori addirittura ai limiti assoluti fissati, ad esempio, dall'ACGIH (come quelli adottati, ad esempio, per il piombo nel sangue) dovrebbe far riflettere.

Concludendo a proposito del rischio moderato, a noi pare che tre aspetti del decreto 25/02 meritino una particolare attenzione: uno di carattere linguistico, uno scientifico ed uno di ordine etico-deontologico. Questi sono rispettivamente: 1. l'errore di traduzione presente solo nel testo italiano, come già segnalato (20, 21), 2. la confusione tra il concetto di rischio e quello di dose e, infine, 3. i principi etici che devono sottendere la gestione del cosiddetto "rischio moderato", ovvero il concetto che per essere "accet-

tabile" il rischio deve essere minimo/trascurabile, non solamente "moderato". Queste considerazioni suggeriscono che la questione interpretativa del cosiddetto "rischio moderato" sarebbe stata meglio risolta attraverso una modifica del tipo *errata corrige*, come peraltro avvenuto per altri errori presenti nel decreto ("mg" invece che "ug"). Se ciò non sarà, o non sarà ritenuto possibile o opportuno, sarebbe almeno auspicabile il raggiungimento di un generale consenso sul fatto che con "rischio moderato" si debba in realtà intendere "rischio trascurabile". Si dovrebbe anche concordare sul fatto che la valutazione/gestione del cosiddetto "rischio moderato" richiede un'analisi caso per caso, attenta e competente di tutti i fattori in giuoco e non possa essere ridotta all'uso di modelli semplificati. L'applicazione di ricette preconfezionate (algoritmi) per definire il rischio moderato non solo appare antiscientifica ma, se applicata indiscriminatamente, potrebbe portare ad una sopra-stima o sottostima del rischio ed essere quindi inutilmente costosa o, peggio, pericolosa per i lavoratori esposti.

---

## Conclusioni

Quanto al quesito postoci nel titolo della relazione, ci pare, sulla base dell'evidenza discussa sopra, si debba ragionevolmente concludere in senso positivo, ovvero che le cosiddette "basse dosi" possono produrre effetti. Infatti l'effetto, o meglio la probabilità dell'effetto (rischio) non è solamente funzione dell'esposizione, di cui la dose o concentrazione è il principale parametro quantitativo, ma dipende anche da altre due variabili: il tipo di fattore di rischio e la suscettibilità individuale dei soggetti esposti. In altre parole, considerato un dato agente chimico, potranno esistere individui ipersuscettibili, su base genetica o acquisita, che non sono protetti anche per esposizioni basse o molto basse, sia per gli effetti acuti che per quelli cronici (22).

Nel caso, ad esempio, dell'esposizione a composti chimici attivati metabolicamente, soggetti con un particolare corredo genetico (polimorfismo) possono manifestare effetti per esposizioni inferiori, anche di vari ordini di grandezza, a quelle che determinano effetti nella popolazione generale. In altri casi l'individuo può essere esposto contemporaneamente a un numero di composti diversi ma che condividono le vie metaboliche, così che i meccanismi di detossificazione di un composto possono essere compromessi dalla presenza degli altri, comoda noi osservato, ad esempio, in lavoratori calzaturieri messicani esposti a miscele di solventi a livelli attorno o inferiori al TLV che presentavano una notevole inibizione (-50%) della capacità metabolica epatica citocromo P450-dipendente (CYP2E1) (24). In altri casi ancora una dose ritenuta sicura può divenire tossica a causa delle abitudini dietetiche o voluttuarie, basti pensare all'effetto di potenziamento della tossicità del tetracloruro di carbonio da parte dell'ingestione eccessiva di etanolo (23).

Nel caso dei cancerogeni genotossici, l'evidenza suggerisce che esposizioni a dosi anche molto basse comportino comunque un aumento modesto ma statisticamente significativo della probabilità di un effetto. Basti pensare al riguardo agli incrementi, pur modesti dal punto di vista

quantitativo ma significativi da quello statistico, del rischio di tumore polmonare che varie metanalisi statistiche hanno evidenziato nei soggetti esposti a fumo passivo (cioè a dosi di cancerogeni sicuramente "molto" basse se confrontate con quelle degli ambienti di lavoro tradizionali). Lo stesso discorso può essere fatto per le sostanze a meccanismo immuno-allergico, per le quali la valutazione della dose mostra livelli praticamente "irrilevanti" ai quali, comunque, si manifesta una risposta (basti pensare all'asma da isocianati).

A noi pare che proprio nell'affrontare correttamente il rapporto tra "basse dosi" e sorveglianza sanitaria si possa dimostrare che il medico del lavoro ha e deve continuare ad avere un ruolo determinante nella valutazione del rischio chimico. Questo ruolo si giocherà soprattutto nel valutare, oltre all'esposizione (mediante il monitoraggio ambientale e biologico) anche il tipo di tossicità del composto (attraverso la valutazione del meccanismo d'azione) ed i fattori di ipersuscettibilità individuale (mediante un'attenta valutazione clinica del lavoratore). Nella tutela della salute dei lavoratori nessun algoritmo potrà mai sostituire la rigorosa valutazione del reale contesto ambientale e biologico che solo l'esperienza clinica, igienistica ed epidemiologica del medico del lavoro professionalmente preparato (competente) possono garantire.

## Bibliografia

- 1) D.Lgs 2 Febbraio 2002, n. 25 "Attuazione della direttiva 98/24/CE sulla protezione della salute e della sicurezza dei lavoratori contro i rischi derivanti da agenti chimici durante il lavoro" (GU n. 57 del 8-3-2002 Suppl. Ordinario n. 40)".
- 2) World Health Organization: Lead - environmental effects, OMS, Geneva (Environmental Health Criteria, 85) 1989.
- 3) IPCS International programme on chemical safety: Environmental health criteria for lead. 1995; 164., Geneva.
- 4) Sirbelgeld EK. Toward the twenty first century: lesson from lead and lesson yet to learn. *Environ Health Perspec* 1990; 86: 191-196.
- 5) ATSDR, Agency for toxic substances and disease registry, 1986 Toxicological profile for lead. US department of health and human services, Atlanta, Georgia.
- 6) Bonde I, Joffe M, Apostoli P, Dale A, Spano M, Giwercman A, Vanhoorne M, Zschiesche W. Sperm count and chromatin structure in men exposed to organic lead: lowest adverse effect levels. *Occup Environ Med* 2002; 59: 234-242.

- 7) Landrigan P, Boffetta P, Apostoli P. The reproductive toxicity and carcinogenicity of lead: a critical review. *Am J Ind Med* 2000.
- 8) Apostoli P. Aggiornamenti in tema di tossicologia da piombo. *Ann.Ist Sup Sanità* 1998; 34: 5-15.
- 9) Grasbeck R, Saris ME. Establishment and use of reference values. *Scand J Clin Lab Invest* 1969; 26: 62-63.
- 10) Grasbeck R. Reference values, why and how. *Scand J Clin Lab Invest* 1990; 50: 45-53.
- 11) Apostoli P, Minoia C, Hamilton EI. Significance and utility of reference values in occupational health. *Sci Total Environ* 1998; 209: 69-77.
- 12) Direttiva 98/24/CE del Consiglio, del 7 Aprile 1998, sulla protezione della salute e della sicurezza dei lavoratori contro i rischi derivanti da agenti chimici durante il lavoro. G.U.C.E. n. L. 131, 5 Maggio 1998.
- 13) Organizzazione mondiale della sanità: ICF Classificazione internazionale del funzionamento della disabilità della salute. Erickson Edizioni Spini di Gardolo.
- 14) Tuggle RM. Assessment of occupational exposure using one sided tolerance limits. *Am Ind Hyg Assoc J* 1982; 43: 338-346.
- 15) Rock JC. A comparison between OSHA compliance criteria and action level decision criteria. *Am Ind Hyg Assoc J* 1982; 43: 297-311.
- 16) SCOEL: Metodologia per la derivazione dei limiti di esposizione professionale - Documentazione di riferimento 1999. Commissione Europea, DGV V/F/5D 99 GAAL.
- 17) American Conference of Governmental Industrial Hygienists: TLVs and BEIs for chemicals substances and physical agents. ACGIH, Cincinnati, OH, 2001.
- 18) Commission for the investigation of health hazards of chemical compounds in the work area DFG List of MAK and BAT values Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2001.
- 19) Apostoli P, Perbellini L, Brugnone F. Valori di riferimento, livelli di azione, valori limite nella interpretazione del monitoraggio biologico. *Lavoro e Medicina* 1999; 1: 45-57.
- 20) Apostoli P, Bartolucci GB, Imbriani M, Mutti M, Ambrosi L. Usque tandem? riflessioni sul decreto legislativo 2 febbraio 2002 n. 25. *G Ital Med Lav Erg* 2002; 24: 2, 99-111.
- 21) Manno M, Mutti A, Apostoli P, Bartolucci GB, Franchini I. Occupational Medicine at stake in Italy. *Lancet* 2002; 359: 1865.
- 22) Manno M. Risk assessment. *Toxicol Lett* 1995; 11: 45-47.
- 23) Manno M, Rezzadore: Critical role of ethanol abuse in carbon tetrachloride poisoning. *Lancet* 1994; 343: 232.
- 24) Lucas D, Ferrara R, Gonzales E, Bodenez P, Albores A, Manno M, Berthou F. Chlorzoxazone, a selective probe for phenotyping CYP2E1 in humans. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 377-388.

## Ringraziamenti

Gli Autori ringraziano il Prof. G.B. Bartolucci, coordinatore del gruppo di lavoro AIDII/SIMLII/SITOX sui valori limite, per il contributo alla discussione sul rischio moderato.

L.G. Costa<sup>1</sup>, P. Lovreglio<sup>2</sup>, A. Vitalone<sup>1</sup>, L. Soleo<sup>2</sup>

## Ruolo del polimorfismo genetico nella valutazione del rischio

<sup>1</sup> Dipartimento di Farmacologia e Fisiologia Umana, Università degli Studi di Bari

<sup>2</sup> Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Pubblica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Bari

**RIASSUNTO.** I polimorfismi genetici rappresentano un importante fattore di suscettibilità individuale nella risposta a farmaci o a sostanze tossiche presenti negli ambienti di vita e di lavoro. Essi, pur non essendo mai responsabili da soli dell'insorgenza di una malattia, sono in grado di modificare il livello di rischio per un effetto avverso o i livelli degli indicatori biologici in caso di esposizione a determinati agenti tossici. In questa breve nota sono stati esaminati due importanti classi di enzimi polimorfici responsabili della detossificazione di sostanze esogene: la paraossonasi-1, coinvolta nel metabolismo di alcuni insetticidi organofosforici, e le glutazione S-transferasi, che intervengono tra l'altro nella detossificazione di numerosi metaboliti epossidi. In particolare è stato valutato il ruolo del polimorfismo della GSTT1 e della GSTM1 sugli indicatori biologici di esposizione a 1,3-butadiene. Sono state esaminate, inoltre, le attuali conoscenze circa il ruolo del polimorfismo dell'acido  $\delta$ -aminolevulinico deidratasi, enzima coinvolto nella sintesi dell'eme, sugli indicatori biologici di esposizione ed effetto del piombo.

**Parole chiave:** polimorfismo genetico, indicatori biologici, paraossonasi-1, insetticidi organofosforici, acido  $\delta$ -aminolevulinico deidratasi, piombo, glutatione-S-transferasi, 1,3-butadiene.

**ABSTRACT.** [www.gimle.fsm.it](http://www.gimle.fsm.it)

**THE ROLE OF GENETIC POLYMORPHISM IN THE RISK ASSESSMENT.** Genetic polymorphism is an important factor of individual susceptibility to drugs or to toxic substances in environmental and occupational exposure. Although polymorphism is never the only responsible of a disease, it can modify both the level of risk for adverse effects and the levels of biomarkers after exposure to some toxic agents. In this paper two important groups of polymorphic enzymes, responsible of the detoxification of exogenous substances, were examined: paraoxonase-1, involved in the metabolism of some organophosphorus insecticides, and glutathione S-transferases, involved in the detoxification of numerous epoxide metabolites. Particularly the role of GSTT1 and GSTM1 polymorphism on the biological indicators of 1,3-butadiene has been evaluated. Moreover, the influence of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase, enzyme involved in the synthesis of the heme, on the biological indicators of exposure and effect to lead has been also examined.

**Key words:** genetic polymorphism, biological indicators, paraoxonase-1, organophosphorus insecticides,  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase, lead, glutathione-S-transferase, 1,3-butadiene.

### Introduzione

Sebbene i rischi derivanti dall'esposizione a sostanze chimiche dipendano dalle proprietà intrinseche della sostanza e dalla dose, questi possono essere influenzati in modo significativo anche da variazioni nell'organo bersaglio, determinabili geneticamente. La variabilità individuale nella risposta farmacologica è un problema spesso presente nella pratica medica, che può portare ad un effetto terapeutico diverso da quello previsto o a reazioni avverse. Un fattore importante in tale variabilità è rappresentato dai polimorfismi genetici, cioè da variazioni nei geni per i sistemi di trasporto dei farmaci, per gli enzimi coinvolti nel loro metabolismo o per i bersagli recettoriali, il cui studio rientra nel campo della farmacogenetica (Motulsky, 1957; Weber, 1997). Il termine polimorfismo genetico definisce la presenza di varianti alleliche a livello fenotipico, che si manifesta con un'incidenza di almeno l'uno per cento rispetto ad una popolazione normale (Meyer e Zanger, 1997). Le mutazioni nei geni per gli enzimi coinvolti nel metabolismo possono portare a varianti con attività minore o maggiore, o all'espressione ridotta o addirittura assente della proteina (Meyer e Zanger, 1997). Un tempo, l'osservazione iniziale di una risposta anomala in un paziente portava a studi, in popolazioni più ampie, di natura fenotipica (per esempio il pattern di escrezione di un metabolita di un farmaco), per arrivare poi a studi che delucidassero i pattern di ereditarietà ed infine la mutazione, cioè il genotipo responsabile dell'effetto anomalo osservato. Nell'attuale era post-genomica, lo studio parte spesso dal DNA dove le mutazioni genetiche, solitamente singole sostituzioni di nucleotidi (single nucleotide polymorphisms, SNP), vengono identificate e messe poi in relazione a possibili risposte anomale a farmaci.

Le variazioni genetiche possono interessare non solo la risposta ai farmaci, ma anche ad un qualsiasi contaminante ambientale o sostanza tossica a cui si può essere esposti sul luogo di lavoro. Da qui il termine ecogenetica, che comprende lo studio dei fattori genetici che influenzano la suscettibilità agli effetti tossici di tutte le sostanze e di cui la farmacogenetica può essere considerata parte integrante (Motulsky, 1991; Costa, 2000). A differenza dei geni associati a malattie ereditarie specifiche, ad esempio la fenilchetonuria o la fibrosi cistica, questi geni di suscettibilità

non sono né necessari né sufficienti a causare una malattia, ma sono in grado di modificare il livello di rischio per un effetto avverso, quando vi sia l'appropriata esposizione ad agenti tossici (Eaton et Al. 1998; Costa, 2000).

Si è stimato che nei circa trentamila geni che costituiscono il genoma umano esistono dai 10 ai 15 milioni di SNP. La maggior parte non hanno conseguenze funzionali, ma dai 50 ai 100 mila portano ad alterazioni degli aminoacidi e quindi delle proteine. I maggiori progressi si sono avuti finora nello studio dei polimorfismi presenti nei geni che codificano per gli enzimi coinvolti nel metabolismo di xenobiotici e di farmaci. Queste brevi note discutono due classi di enzimi polimorfici importanti per la detossificazione di sostanze esogene: la paraossonasi-1 (importante nel metabolismo di alcuni insetticidi organofosforici) e la famiglia delle glutatione transferasi (che hanno un ruolo prominente nella detossificazione di numerosi composti cancerogeni e che sono qui discusse in relazione alla tossicità dell'1,3-butadiene). Inoltre, viene anche discussa l'influenza dell'acido  $\delta$ -aminolevulinico deidratasi sugli indicatori biologici di esposizione ed effetto del piombo. Va ricordato che, sebbene non discussi in questo contesto, numerosi studi hanno dimostrato come anche altri polimorfismi, quali quelli di vari citocromi P450 (per esempio 2A1, 1A2, 2E1, 2D6), dell'idrolasi epossidica, dell'acetil transferasi, delle deidrogenasi, sono importanti nel modulare gli effetti tossici di varie sostanze e possono conferire suscettibilità a diversi processi patologici (Eaton et Al. 1998; Costa, 2000).

### **La paraossonasi-1 (PON1): ruolo nel metabolismo e nella tossicità degli insetticidi organofosforici**

La paraossonasi-1 (PON1) è un enzima prevalentemente plasmatico, strettamente associato alle lipoproteine ad alta densità (HDL), il cui ruolo fisiologico più importante sembra quello di proteggere le LDL da modificazioni di natura ossidativa (Durrington et Al. 2001). Le prime ricerche sull'attività di questo enzima (EC 3.1.8.1) sono state rivolte però alla sua capacità di idrolizzare i metaboliti attivi di alcuni insetticidi organofosforici (Costa et Al. 2002). Il suo nome deriva infatti da uno dei primi substrati studiati, il paraoxon, metabolita attivo del parathion. Più di vent'anni fa si osservò che, utilizzando proprio il paraoxon come substrato, l'attività della paraossonasi-1 nel plasma di varie popolazioni di origine caucasica presentava una distribuzione bimodale o trimodale (Eckerson et Al. 1983; Mueller et Al. 1983). La popolazione quindi consisteva di individui con attività plasmatica della PON1 bassa, intermedia o alta. L'ipotesi che ne seguì fu che gli individui a "bassa attività" paraossonica potessero essere più sensibili alla tossicità degli insetticidi organofosforici, a causa della loro minore capacità detossificante. Studi condotti negli ultimi dieci anni, utilizzando approcci molecolari e modelli animali, in particolare topi transgenici, hanno permesso la caratterizzazione della PON1 e del suo ruolo nella modulazione della tossicità degli organofosfati (Costa et Al. 2002; 2003a).

La paraossonasi-1 è un enzima di 355 aminoacidi, sintetizzato nel fegato e secreto in circolo (Hassett et Al.

1991); non è espressa praticamente in nessun altro tessuto o organo. Il gene della PON1 è localizzato sul cromosoma 7 q21-22 e presenta due polimorfismi nella regione codificante: una sostituzione Gln (Q)/Arg (R) nella posizione 192 ed una sostituzione Leu (L)/Met (M) nella posizione 55 (Humbert et Al. 1993). La frequenza della PON1Q192 varia dallo 0,75% in popolazioni caucasiche di origine europea allo 0,3% in alcune popolazioni asiatiche, mentre quello della PON1L55 varia dallo 0,57% in popolazioni caucasiche allo 0,99% in una popolazione di aborigeni canadesi (Brophy et Al. 2002). Diversi studi hanno evidenziato come gli alleli L55 e R192 siano in forte disequilibrio, con una concordanza di circa il 98% degli alleli R192 con L55 (Brophy et Al. 2002). Il polimorfismo Q/R 192 ha un ruolo importante nell'attività catalitica della PON1 nei riguardi di substrati organofosforici. In studi in vitro, condotti in presenza di elevate concentrazioni di NaCl (1M), è stato visto come il paraoxon ed il clorpirifos oxon sono preferenzialmente idrolizzati dalla PON1R192, mentre l'opposto è vero per altri substrati come il diazoxon (metabolita attivo del diazinon), o il gas nervino sarin (Davies et Al. 1996). Diversi altri polimorfismi sono stati identificati nella regione del promotore e quello in posizione -108 (C/T) contribuisce, per circa il 23%, alla variazione dei livelli di proteina nel plasma (Brophy et Al. 2001). La frequenza dell'allele -108C, che conferisce un livello di PON1 più elevato, varia dallo 0,46 allo 0,51% in diverse popolazioni caucasiche e giapponesi (Brophy et Al. 2002). In studi epidemiologici, per esempio in lavoratori potenzialmente esposti ad insetticidi organofosforici, è ora possibile determinare con più accuratezza il genotipo/fenotipo della PON1. Un approccio strettamente molecolare permette di identificare il genotipo d'interesse (per esempio Q o R 192); con la misurazione dell'attività enzimatica, utilizzando due diversi substrati (paraoxon e diazoxon), si può invece determinare sia il genotipo Q/R 192 che il livello di espressione dell'enzima (Richter e Furlong, 1999).

Studi in modelli animali hanno contribuito a verificare il ruolo della PON1 nel modulare la tossicità di alcuni insetticidi organofosforici in vivo. Per esempio, la somministrazione di paraossonasi-1, purificata dal plasma di coniglio, o di PON1 umana ricombinante (LR o LQ) protegge ratti e topi dalla tossicità del clorpirifos oxon (Costa et Al. 1990; Li et Al. 1995; Cowan et Al. 2001). Studi in topi transgenici hanno portato ad altre importanti osservazioni. In topi knockout (PON1<sup>-/-</sup>), l'assenza della PON1 porta ad un'aumentata tossicità del clorpirifos oxon e del diazoxon, come prevedibile (Shi et Al. 1998; Li et Al. 2000). Sorprendentemente, la completa mancanza in questi topi della PON1 a livello epatico e plasmatico, non altera la tossicità del paraoxon, composto da cui l'enzima prende il nome. Ciò è da attribuirsi alla bassa efficienza catalitica della PON1 nei confronti del paraoxon, quando misurata in vitro in condizioni fisiologiche (Li et Al. 2000). Quindi, nel caso del paraoxon, i polimorfismi della PON1 non ne influenzano la tossicità in vivo. Al contrario, il polimorfismo Q/R 192 è importante per il clorpirifos oxon, la cui tossicità è minore in presenza di PON1R192. Per quanto riguarda il diazoxon, l'efficienza catalitica di entrambi gli isozimi è molto simile e la suscettibilità individuale è de-

terminata dal livello di espressione della PON1 (determinata a sua volta in parte dal polimorfismo C/T -108), indipendentemente dal genotipo Q/R192 (Costa et Al. 2002). Tali osservazioni sono state confermate con due altri modelli sperimentali: in un modello la PON1 umana, purificata da individui omozigoti per uno o l'altro allele 192, è stata somministrata a topi knockout. L'effetto protettivo, valutato misurando il grado di inibizione dell'acetilcolinesterasi cerebrale e diaframmatica, è risultato superiore per la PON1R192 nel caso del clorpirifos oxon e simile per i due allozimi nel caso del diazoxon; nessun effetto protettivo è stato visto invece dopo somministrazione di paraoxon (Li et Al. 2000). Inoltre in topi transgenici, che esprimono gli stessi livelli di PON1 umana Q192 o R192 su un background knockout, si è visto che la tossicità del clorpirifos oxon era inferiore negli animali PON1R192 rispetto a quelli PON1Q192, mentre tale differenza non si è osservata nel caso del diazoxon (Costa et Al. 2003b).

Questi studi hanno delineato i polimorfismi della PON1 responsabili per la sua attività catalitica e i livelli di espressione, e hanno dimostrato l'importanza della PON1 nel modulare la tossicità di vari insetticidi organofosforici in modelli animali. La possibile rilevanza di tali scoperte nell'uomo ha però ricevuto solo di recente qualche iniziale verifica (Costa et Al. 2003b). Tre studi si riferiscono ad esposizione al gas nervino sarin, in una popolazione di giapponesi coinvolti in un attacco terroristico a Tokyo nel 1995 e in due gruppi di veterani della guerra del golfo del 1991. Nel primo caso la presenza del genotipo Q della PON1 (l'allozima che preferenzialmente idrolizza il sarin) non sembra aver conferito, contrariamente a quanto ipotizzato (Yamada et Al. 2001), alcuna protezione agli individui esposti, molto probabilmente a causa dei livelli di esposizione a sarin assai elevati (Costa et Al. 2003b). In un gruppo di veterani americani, uno studio di Haley et Al. (2000) ha suggerito che la PON1R192 possa rappresentare un fattore di rischio per la cosiddetta "sindrome del golfo", ma sono state rilevate numerose limitazioni in questo studio, in particolare l'esiguo numero di soggetti coinvolti (Furlong, 2000). In un altro studio su veterani britannici della prima guerra del golfo è stata invece rilevata una ridotta attività della PON1 plasmatica in soggetti che riportavano sintomi avversi persistenti, senza alcun effetto conferito dal genotipo Q/R 192 (Mackness et Al. 2000). Più rilevanti sono forse i risultati di uno studio condotto in Gran Bretagna su lavoratori esposti a diazinon, usato per il trattamento delle pecore (Cherry et Al. 2002). Gli individui che lamentavano una serie di sintomi attribuiti a tale attività presentavano una frequenza maggiore di PON1R192 ed una diminuita attività della diazoxonasi, rispetto a colleghi ugualmente esposti a diazinon ma privi di sintomi. Questo ha portato gli autori a concludere che il genotipo R192 possa essere un fattore di rischio per gli effetti tossici del diazinon.

È evidente come siano necessari ulteriori studi per valutare il ruolo della PON1 in lavoratori esposti ad insetticidi organofosforici. Tali studi dovrebbero valutare, in particolare, se e come gli indici di esposizione e di effetto degli organofosforati, quali ad esempio l'attività delle colinesterasi plasmatica ed eritrocitaria, siano alterati in presen-

za di determinati polimorfismi. È importante sottolineare, inoltre, la necessità di avere informazioni precise sul composto organofosforico in esame (poiché non tutti gli insetticidi organofosforici sono substrati per la PON1) e sui relativi livelli di esposizione.

---

### **Influenza del polimorfismo dell'acido $\delta$ -aminolevulinico deidratasi sugli indicatori biologici di esposizione ed effetto del piombo**

Il gene *ALAD*, localizzato sul cromosoma 9, codifica per l'enzima acido  $\delta$ -aminolevulinico deidratasi (ALAD) che catalizza la seconda tappa della sintesi dell'eme, cioè la formazione del porfobilinogeno a partire da due molecole di acido  $\delta$ -aminolevulinico (ALA). L'enzima ALAD è espresso in tutti i tessuti ed in particolar modo nei globuli rossi e nel fegato (Wetmur et Al. 1994).

Il gene *ALAD* presenta un polimorfismo con due alleli codominanti *ALAD-1* e *ALAD-2*. L'allele *ALAD-2* contiene una transversione G-C in posizione 177 che determina la sostituzione di una lisina con un'asparagina a livello del residuo aminoacidico 59 con modificazione della carica elettrica ma non dell'attività catalitica dell'enzima. La lisina, infatti, presenta una carica positiva mentre l'asparagina è un amminoacido neutro per cui il risultato finale della sostituzione sarà un aumento della elettronegatività complessiva dell'enzima codificato dall'*ALAD-2* rispetto a quello codificato dall'*ALAD-1* (Battistuzzi et Al. 1981).

La prevalenza dei diversi genotipi varia a seconda della popolazione. Circa il 18% della popolazione caucasica presenta una condizione di eterozigosi per *ALAD-2* (16.7% nella popolazione italiana) e l'1% una condizione di omozigosi (2% nella popolazione italiana), mentre le popolazioni africane ed asiatiche presentano una bassa prevalenza dell'allele *ALAD-2* con bassissime percentuali di soggetti omozigoti (Kelada et Al. 2001).

Il polimorfismo dell'*ALAD* è stato ampiamente studiato in ambito tossicologico poiché interagisce con la distribuzione e l'accumulo del piombo (Pb), un metallo in grado di determinare effetti tossici a livello di numerosi organi ed ancora presente negli ambienti di vita e di lavoro. In particolare il polimorfismo dell'*ALAD* è in grado sia di modificare i livelli dei diversi indicatori biologici di esposizione e di effetto utilizzati nella valutazione delle popolazioni esposte a Pb, sia di influenzare la suscettibilità individuale agli effetti tossici. L'*ALAD*, infatti, è l'enzima della via biosintetica dell'eme che più risente dell'azione inibitoria del Pb, tanto che la riduzione della sua attività enzimatica costituisce il più sensibile indicatore di esposizione a Pb, con modificazioni già per livelli di piombemia di 10  $\mu\text{g}/\text{dl}$ . Un effetto dell'inibizione dell'*ALAD* è l'incremento dei valori di ALA nelle urine che potrebbe rappresentare una delle cause degli effetti neurotossici del Pb (Sithisarakul et Al. 1997).

Il polimorfismo *ALAD G177C* può modificare la cinetica del Pb sia a livello ematico che a livello osseo. Per alti livelli di esposizione, che comportano piombemie solitamente superiori ai 30  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , i soggetti con genotipi *ALAD 1-2* o *2-2* presentano livelli di piombemia maggiori rispetto ai soggetti con genotipo *ALAD 1-1* (Ziemsens et Al.

1986; Astrin et Al. 1987; Wetmur et Al. 1991). Questi risultati sono stati confermati successivamente anche da Fleming et Al. (1998) per livelli di piombemia media pari a 23.3 µg/dl. Una possibile spiegazione per questi risultati è legata al fatto che l'ALAD-2 codifica per un enzima con maggiore elettronegatività che, quindi, tende probabilmente a legare lo ione Pb con maggiore affinità, determinando una più lunga permanenza del metallo nel sangue e nei tessuti. L'ALAD, infatti, costituisce il principale sito di legame del Pb negli eritrociti (oltre l'80%) ed è stato osservato che la percentuale di Pb che si lega all'enzima è maggiore negli ALAD 1-2 rispetto agli ALAD 1-1 (84% vs 81%) (Bergdahl et Al. 1997a). L'ipotesi di una maggiore affinità per il Pb da parte dell'ALAD-2 è stata confermata anche da Fleming et Al. (1998) che hanno osservato come i soggetti ALAD 1-1 tendono a depositare il Pb nell'osso più facilmente rispetto ai soggetti che presentano un allele ALAD-2.

Anche gli indicatori biologici di effetto del Pb possono essere influenzati dal polimorfismo dell'ALAD. Alexander et Al. (1998), oltre ad osservare una differenza nei livelli di piombemia ai limiti della significatività (28.4 µg/dl nei lavoratori con genotipo ALAD 1-2 vs 23.1 µg/dl in quelli con genotipo 1-1) hanno evidenziato, solo nei lavoratori con esposizione superiore ai 40 µg/dl, livelli di zinco protoporfirina e coproporfirina più alti nei soggetti ALAD 1-1, ad indicare una maggiore inibizione della sintesi dell'eme da parte del Pb in presenza di questo genotipo.

In uno studio successivo eseguito su lavoratori esposti a Pb, Schwartz et Al. (1995), pur non osservando livelli di piombemia e di Zn protoporfirina diversi tra i genotipi, hanno evidenziato una maggiore frequenza di lavoratori con piombemia superiore a 40 µg/dl tra i soggetti che presentavano un allele ALAD-2 rispetto a quelli con genotipo ALAD 1-1, sebbene l'intervallo di confidenza (95%) includeva 1. È stata osservata, inoltre, un'associazione tra genotipo ALAD 1-2 ed anzianità lavorativa per esposizione a Pb superiore a 6 anni, probabilmente legato alla non disponibilità del Pb dopo il suo legame con l'ALAD-2. I lavoratori, così, erano protetti dagli effetti tossici del Pb e potevano tollerare l'esposizione più a lungo rispetto ai soggetti con genotipo omozigote ALAD 1-1. Considerando solo i lavoratori con una storia di alta esposizione a Pb, inoltre, i livelli di zinco protoporfirina erano più bassi nei soggetti ALAD 1-2 rispetto a quelli con ALAD 1-1. In conclusione, nonostante i soggetti con genotipo ALAD-2 presentavano, a parità di esposizione, livelli di piombemia più alti, essi andavano incontro ad una inibizione della sintesi dell'eme minore rispetto agli omozigoti per ALAD-1. I soggetti con ALAD-2, pertanto, dovrebbero tollerare meglio l'esposizione professionale.

Smith et Al. (1995) hanno indagato, invece, il ruolo del polimorfismo dell'ALAD in lavoratori esposti a basse dosi di Pb (livello medio 7.8 µg/dl), non osservando alcuna influenza del genotipo sui livelli di piombemia. Sempre nello stesso studio il contenuto di Pb nell'osso non ha mostrato differenze legate al genotipo, sebbene è stata osservata una differente distribuzione con aumento della quantità di Pb nell'osso corticale rispetto a quella contenuta nell'osso trabecolare, nei soggetti con genotipo 1-1 rispet-

to a quelli che presentano un allele ALAD-2. Anche questi risultati confermano la maggiore affinità del Pb per l'ALAD-2 e sembrerebbero indicare un rischio maggiore nei soggetti 1-1 poiché il Pb nell'osso corticale rappresenta un deposito a lungo termine che può successivamente ritornare in circolo in particolari situazioni. In questo studio, inoltre, è stato riscontrato un aumento dei livelli ematici di azoto ureico nei soggetti che presentano un allele ALAD-2 rispetto ai soggetti ALAD 1-1.

Bergdahl et Al. (1997b) non hanno osservato alcuna relazione tra genotipo dell'ALAD e livelli di piombo ematico ed osseo, mentre le concentrazioni di calcio e di creatinina nelle urine erano più basse nei soggetti che presentavano un allele ALAD-2. Tali risultati sembrerebbero indicare una possibile relazione tra polimorfismo dell'ALAD e funzionalità renale. In questo studio, inoltre, la frequenza dell'allele ALAD-2 risultava inferiore tra i lavoratori esposti rispetto ai controlli, probabilmente perché i lavoratori portatori di allele ALAD-2, raggiungevano livelli più alti di piombemia in seguito all'esposizione e pertanto venivano allontanati con maggiore frequenza rispetto agli ALAD 1-1.

Schwartz et Al. (1997a; 1997b) hanno valutato in lavoratori esposti a Pb i livelli di metallo escreto con le urine dopo somministrazione di un chelante, l'acido 2,3-dimercaptosuccinico (DMSA). I livelli di piomburia dopo somministrazione di DMSA, che rappresentano un indicatore della quantità di Pb biodisponibile nell'organismo, sono risultati più bassi, a parità di esposizione, nei soggetti con almeno un allele ALAD-2 rispetto agli omozigoti per ALAD-1, indicando anche in questo caso una condizione di minor rischio per i genotipi 1-2 o 2-2. Anche tale osservazione è stata spiegata con una maggiore ritenzione di Pb nel sangue da parte dell'enzima codificato da ALAD-2.

La concentrazione plasmatica di ALA è stata indagata in riferimento al polimorfismo dell'ALAD in alcuni studi (Schwartz et Al. 1997a; Sithisarakul et Al. 1997; Sakai et Al. 2000), essendo l'ALA sospettato di essere responsabile, almeno in parte, degli effetti del Pb sul sistema nervoso. In tutti gli studi sono stati osservati livelli più alti nei soggetti omozigoti per ALAD-1, cosa che dovrebbe determinare un maggiore rischio di effetti neurotossici per questi soggetti rispetto a quelli con ALAD-2.

In conclusione, per esposizione ad alte dosi di Pb, i soggetti con genotipo ALAD 1-2 / 2-2 presentano, rispetto ai soggetti ALAD 1-1, livelli di piombemia più alti, concentrazioni di ALA plasmatico più basse, livelli di Zn protoporfirina più bassi, concentrazioni di Pb ridotte nell'osso corticale e aumentate nell'osso trabecolare, livelli di piomburia dopo somministrazione di chelante (DMSA) più bassi. È evidente, quindi, che il polimorfismo dell'ALAD gioca un ruolo importante nel bioaccumulo del Pb, sebbene i meccanismi non sono stati ancora completamente chiariti. L'ipotesi attualmente più probabile resta quella che l'ALAD-2, a causa dell'alta affinità per il Pb rispetto all'ALAD-1, trattiene il metallo a livello ematico per cui, pur associandosi a livelli di piombemia più alti, riduce la disponibilità per alcuni effetti tossici, come l'inibizione della sintesi enzimatica. Ulteriori studi sono comunque necessari per chiarire completamente il ruolo del polimorfismo dell'ALAD nell'esposizione professionale ed am-

bientale a Pb ed il suo meccanismo d'azione ed in particolare appare necessario indagare l'influenza sugli altri effetti tossici del Pb, come ad esempio quelli neurocomportamentali.

### **Le glutazione S-transferasi M1 e T1 in relazione alla biotrasformazione dell'1,3-butadiene**

Le glutazione-S-transferasi (GST) costituiscono una famiglia di enzimi che catalizzano la coniugazione del glutathione (GSH) con differenti specie di substrati elettrofili, e rappresentano, pertanto, uno dei principali sistemi di detossificazione cellulare per numerose sostanze tossiche endogene ed esogene, tra cui diversi composti ad azione genotossica.

Le GST sono presenti in tutti gli organismi eucarioti e procarioti (Laughlin et Al. 1998). Nel ratto e nell'uomo sono state identificate una forma microsomiale (mGST) e una famiglia di isoenzimi citosolici di cui, fino ad oggi, sono state individuate nell'uomo 8 diverse sottofamiglie di geni: alpha sul cromosoma 6, mu sul cromosoma 1, theta sul cromosoma 22, pi sul cromosoma 11, zeta sul cromosoma 14, sigma sul cromosoma 4, kappa la cui localizzazione cromosomica è ancora sconosciuta, chi (chiamato anche omega) sul cromosoma 10. Gli isoenzimi mostrano un'ampia specificità di substrato ed una particolare reazione può essere catalizzata da differenti isoenzimi e con differenti cinetiche enzimatiche (Strange et Al. 2001; Soleo et Al. 1999).

Molti dei geni che costituiscono queste sottofamiglie presentano uno spiccato polimorfismo genetico con presenza di varianti alleliche che comportano una diversa attività enzimatica e che pertanto possono influenzare il processo di detossificazione catalizzato dalle GST. Particolare importanza in ambito tossicologico rivestono i polimorfismi dei geni GSTM1 e GSTT1.

Il gene GSTM1 fa parte della sottofamiglia mu, insieme con altri quattro geni con cui costituisce un cluster sul cromosoma 1. La GSTM1 si presenta in modo polimorfico con un allele GSTM1\*0, che è deleto e non esprime alcuna proteina per cui in omozigosi determina il genotipo GSTM1 nullo, e due alleli funzionali GSTM1\*A e GSTM1\*B, senza grossa differenza catalitica tra loro, la cui presenza in omozigosi o eterozigosi determina il genotipo GSTM1 positivo; esiste, inoltre, un allele GSTM1\*C molto raro (Strange RC et Al. 2001). Circa il 50% della popolazione caucasica e asiatica manca dell'attività della GSTM1 (49.4% nella popolazione italiana), mentre nella popolazione africana la frequenza di genotipo nullo è pari al 26% (Garte et Al. 2001).

La sottofamiglia theta comprende due geni con struttura simile, GSTT1 e GSTT2. Anche per il gene GSTT1 esiste un allele GSTT1\*0 che in omozigosi determina un genotipo nullo, mentre la presenza di almeno un gene funzionale determina il genotipo positivo (Strange et Al. 2001). Circa il 20% dei soggetti di razza caucasica presentano un genotipo nullo per GSTT1 (16.3% nella popolazione italiana), mentre nella popolazione asiatica la frequenza è pari al 47% (Garte et Al. 2001).

Il genotipo nullo per la GSTM1 e la GSTT1 comporta l'assenza dei rispettivi enzimi e, quindi, una ridotta capacità di detossificare alcuni composti elettrofili. Per tale motivo è stato studiato il ruolo che questi polimorfismi, singolarmente o più probabilmente in associazione tra loro e con il polimorfismo di altri enzimi metabolici, possono avere sia sulla suscettibilità individuale agli effetti tossici di alcuni xenobiotici, sia sui livelli dei loro indicatori biologici.

L'esistenza di associazione tra genotipo GSTM1 o GSTT1 nullo ed incidenza di alcune patologie neoplastiche, è stata ampiamente indagata, ma, a fronte dei numerosi studi presenti a tutt'oggi in letteratura, il ruolo del polimorfismo delle GST nella suscettibilità individuale per i principali tipi di tumore resta ancora non perfettamente chiaro con odds ratio (OR) solitamente di poco superiori all'unità anche in presenza di associazione. La GSTT1 e la GSTM1, così come altri polimorfismi metabolici, sembrerebbero tuttavia assumere un ruolo rilevante se consideriamo, piuttosto che la popolazione generale, specifici sottogruppi della popolazione dove sono state osservate associazioni molto forti con OR compresi tra 3 e 12. Tra i dati più evidenti ricordiamo la relazione tra il carcinoma basocellulare della cute ed il genotipo di alcuni isoenzimi della GST (Strange et Al. 1998) e l'associazione tra GSTT1 nullo e l'insorgenza di meningioma e astrocitoma (Elexpuru-Camiruaga J et Al. 1995).

La presenza di genotipo nullo per GSTM1 e GSTT1 è stata valutata anche perché in grado di influenzare i livelli di alcuni indicatori di esposizione e di dose vera legati all'azione detossificante del glutathione. Gli acidi mercapturici, ad esempio, sono indicatori di esposizione specifici che derivano dalla metabolizzazione del complesso elettrofilo - glutathione da parte delle GST, per cui i livelli urinari possono essere modificati dal polimorfismo della GSTM1 e GSTT1. Gli addotti al DNA o all'emoglobina, invece, sono considerati indicatori di dose vera e derivano dal legame dei composti elettrofili alle macromolecole nucleofile presenti nella cellula. Anche in questo caso i livelli di questi indicatori potrebbero aumentare in presenza di una ridotta attività di detossificazione da parte del sistema delle GST. La ridotta detossificazione dei composti genotossici in presenza di genotipo nullo per la GSTM1 e la GSTT1 può influenzare anche i livelli degli indicatori di genotossicità, quali le aberrazioni cromosomiche (CA), gli scambi tra cromatidi fratelli (SCE), i micronuclei (MN), la frequenza di linfociti con mutazioni della ipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasi (HPRTVf), ecc.

L'1,3-butadiene (BD) costituisce un esempio di sostanza chimica per la quale il polimorfismo genetico di alcuni enzimi metabolici potrebbe essere responsabile di variazioni individuali sia del suo effetto genotossico, sia dei livelli dei suoi principali indicatori biologici. Il BD è sia un inquinante professionale prodotto nell'industria petrolchimica e utilizzato per la sintesi di gomme, resine e plastiche, sia un inquinante ambientale presente nel fumo di sigaretta e nei gas di scarico degli autoveicoli. Sulla base dell'accertata cancerogenicità del BD nell'animale da esperimento e dei risultati non univoci osservati nei diversi studi epidemiologici sull'uomo, la IARC ha classificato

il BD nel gruppo 2A cioè come probabile cancerogeno per l'uomo (1999). Il BD va incontro a metabolismo ossidativo, principalmente da parte del citocromo P450 2E1, con formazione di metaboliti reattivi quali l'eossibutene (EB), il dieossibutano (DEB) e l'eossibutanediolo (EBD). Questi metaboliti vanno incontro successivamente a processi di detossificazione o per idrolisi, che costituisce la via prevalente nell'uomo ed è catalizzata dall'enzima epossido idrolasi (EH), o per coniugazione con il glutatiione, catalizzata dalle GST.

Gli studi in vitro eseguiti su linfociti umani hanno mostrato che sia l'EB che il DEB sono genotossici e, pertanto, sono ritenuti responsabili del sospetto effetto leucemogeno del BD. Questi studi, inoltre, hanno evidenziato come l'azione genotossica di questi epossidi sia influenzata dal genotipo dei soggetti donatori e in particolare l'aumento della frequenza di SCE dopo esposizione ad EB sia influenzato dal polimorfismo della GSTM1 e della GSTT1 (Uusküla et Al. 1995; Bernardini et Al. 1998), mentre l'incremento dei livelli di SCE e CA dopo esposizione a DEB è maggiore in presenza di genotipo GSTT1 nullo, ma non di GSTM1 nullo (Norppa 1995; Landi 1998).

Resta ancora controversa, invece, l'influenza del polimorfismo delle GST sugli indicatori di genotossicità in popolazioni professionalmente esposte a BD. Sorsa et Al. (1996) hanno riscontrato un aumento della frequenza media di CA nei linfociti periferici di lavoratori esposti con genotipo GSTT1 nullo, mentre Šram et Al. (1998), in 19 lavoratori di un impianto di produzione del BD monomero e 19 controlli non professionalmente esposti a BD, hanno osservato risultati contraddittori, con una riduzione della frequenza di CA negli esposti con GSTM1 nullo e un aumento nei controlli con GSTT1 nullo. Hayes et Al. (2000), invece, non hanno riscontrato, in 41 lavoratori esposti a BD, alcuna influenza della GSTM1 e della GSTT1 su SCE, aneuploidia dei cromosomi 1, 7, 8 e 12, mutazioni della glicoforina A o della HPRT.

Il polimorfismo della GSTM1 e della GSTT1 potrebbe influenzare anche alcuni indicatori di esposizione a BD quali gli addotti all'emoglobina HBVal (che si forma per reazione tra l'EB e la valina n-terminale dell'emoglobina) e THBVal (che si forma per reazione tra l'EBD e la valina n-terminale dell'emoglobina), o gli acidi mercapturici MI (che deriva dal GSH-coniugato del 3-butene-1,2-diolo) ed MII (che deriva dal GSH-coniugato dell'EB). Anche in questo caso i risultati non sono univoci. Begemann et Al. (2001) hanno valutato i livelli di HBVal su 17 lavoratori esposti a BD e 19 controlli concludendo per un'assenza di associazione evidente tra genotipo GSTM1 o GSTT1 e livelli dell'addotto HBVal. Hayes et Al. (2000), sempre su 41 lavoratori esposti a BD, non hanno riscontrato alcuna influenza della GSTM1 e della GSTT1 sui livelli di MI e THBVal.

In una recente esperienza, Fustinoni et Al. (2002) hanno valutato, in 30 lavoratori professionalmente esposti a basse dosi di BD e in 10 lavoratori non professionalmente esposti a BD, l'influenza che il polimorfismo di alcuni enzimi coinvolti nel metabolismo del BD (CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, EH, ADH) ha sui livelli di alcuni indicatori di esposizione come l'acido mercapturico MI, e l'addotto all'emoglobina THBVal. I risultati hanno mo-

strato livelli più alti di THBVal sia nei soggetti con genotipo GSTT1 che in quelli con GSTM1 nullo, in accordo con il ruolo che le GST rivestono nella detossificazione dei metaboliti epossidi del BD. Il fatto che il GSTT1 è espresso in grossa quantità negli eritrociti, presunto sito di formazione degli addotti dell'emoglobina, inoltre, può contribuire al forte effetto del genotipo GSTT1 sui livelli di THBVal. Anche il polimorfismo di un enzima attivante come il CYP2E1 (G<sub>-35</sub>T) ha evidenziato un'influenza ai limiti della significatività sui livelli di THBVal. Poiché la combinazione di più polimorfismi metabolici, piuttosto che i singoli polimorfismi, dovrebbe essere maggiormente in grado di influenzare il metabolismo e quindi gli indicatori di dose interna, è stata effettuata un'analisi combinata dei genotipi CYP2E1, GSTM1 e GSTT1 che ha mostrato come i livelli di THBVal siano correlati con il numero di genotipi polimorfici che singolarmente avevano incrementato gli addotti. Questo studio ha mostrato per la prima volta che alcuni polimorfismi metabolici possono influenzare, nell'uomo, la formazione in vivo degli addotti al BD dell'emoglobina. Questi risultati, inoltre, indicano come l'analisi combinata di più polimorfismi possa rappresentare la chiave per una migliore comprensione del loro ruolo nel metabolismo delle sostanze tossiche.

In conclusione, gli esempi riportati in questa breve trattazione indicano come i polimorfismi genetici possono modulare la sensibilità individuale agli xenobiotici, influenzando sia l'insorgenza di effetti tossici, sia i livelli degli indicatori biologici utilizzati nel monitoraggio biologico dell'esposizione professionale ed ambientale. Il livello di esposizione, inoltre, sembra condizionare la possibilità che questi geni possano esprimere il loro potenziale ruolo di fattori di ipersuscettibilità.

Una corretta valutazione del rischio tossicologico, pertanto, dovrebbe sempre considerare anche gli indicatori di suscettibilità, sebbene motivazioni di tipo scientifico e soprattutto di tipo etico non consentono a tutt'oggi di utilizzare queste informazioni né per la messa a punto di test per la selezione pre-assuntiva dei lavoratori, né per la valutazione individuale del rischio. La conoscenza del ruolo che svolgono i polimorfismi genetici, tuttavia, appare necessaria per la comprensione dei meccanismi di tossicità degli xenobiotici e per una migliore interpretazione dei risultati del monitoraggio biologico.

Il destino di un tossico all'interno dell'organismo può essere maggiormente influenzato dalla combinazione di differenti polimorfismi genetici. Il polimorfismo di un singolo gene, infatti, difficilmente avrà un grosso peso sulla suscettibilità individuale, mentre l'associazione di più alleli svantaggiosi potrebbe creare importanti condizioni di ipersuscettibilità in particolari sottogruppi di popolazione. L'analisi combinata di più polimorfismi, pertanto, sembra fornire maggiori informazioni sulla tossicità e sull'espressione degli indicatori biologici. Appare pertanto necessario nel futuro indagare gruppi di soggetti che presentano combinazioni svantaggiose di alleli per i diversi geni, superando le difficoltà connesse con la necessità di grosse numerosità campionarie per ottenere risultati significativi anche per le combinazioni geniche meno frequenti.

## Bibliografia

- Alexander BH, Checkoway H, Costa-Mallen P, Faustman EM, Wookds JS, Kelsey KT, van Netten C, Costa LG. Interaction of blood lead and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase genotype on markers of heme synthesis and sperm production in lead smelter workers. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 213-216.
- Astrin KH, Bishop DF, Wetmur JG, Kaul BC, Davidow B, Desnick RJ.  $\delta$ -Aminolevulinic acid dehydratase isozymes and lead toxicity. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 514: 23-29.
- Battistuzzi G, Petrucci R, Silvagni L, Urbani FR, Caiola S.  $\delta$ -Aminolevulinic acid dehydratase: a new genetic polymorphism in men. *Ann Hum Genet* 1981; 45: 223-229.
- Begegmann P, Sram RJ, Neumann HG. Hemoglobin adducts of epoxybutene in workers occupationally exposed to 1,3-butadiene. *Arch Toxicol* 2001; 74: 680-687.
- Bergdahl IA, Gerhardsson L, Schutz A, Desnick RJ, Wetmur JG, Skerfving S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism: influence on lead levels and kidney function in humans. *Arch Environ Health* 1997b; 52(2): 91-96.
- Bergdahl IA, Grubb A, Schutz A, Desnick RJ, Wetmur JG, Sassa S, Skerfving S. Lead binding to  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in human erythrocytes. *Pharmacol Toxicol* 1997a; 81: 153-158.
- Bernardini S, Hirvonen A, Pelin K, Norppa H. Induction of sister chromatid exchange by 1,2-epoxy-3-butene in cultured human lymphocytes: influence of GSTT1 genotype. *Carcinogenesis* 1998; 19: 377-380.
- Brophy VH, Jampsa RL, Clemdenning JB, McKinstry LA, Furlong CE. Effects of 5' regulatory region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am J Med Genet* 2001; 68: 1428-1436.
- Brophy VH, Jarvik JP, Furlong CE. PON1 polymorphisms. In: *Paraoxonase (PON1) in Health and Disease: Basic and Clinical Aspects* (Costa LG, Furlong CE, Eds.), Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA, 2002; pp. 53-77.
- Cherry N, Mackness MI, Durrington P, Povey A, Dippnal M, Smith T, Mackness M. Paraoxonase (PON1) polymorphisms in farmers attributing ill health to sheep dip. *Lancet* 2002; 359: 763-764.
- Costa LG, Cole TB, Furlong CE. Polymorphisms of paraoxonase (PON1) and their significance in the clinical toxicology of organophosphates. *J Toxicol Clin Toxicol* 2003b; 41: 37-45.
- Costa LG, Cole TB, Jarvik GP, Furlong CE. Functional genomics of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease and drug metabolism. *Annu Rev Med* 2003a; 54: 371-392.
- Costa LG, Li WF, Richter RJ, Shih D, Lulis AJ, Furlong CE. PON1 and organophosphate toxicity. In: *Paraoxonase (PON1) in Health and Disease: Basic and Clinical Aspects* (Costa LG, Furlong CE, Eds.), Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA, 2002; pp.165-183.
- Costa LG, McDonald BE, Murphy SD, Richter RJ, Motulsky AG, Furlong CE. Serum paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifos oxon toxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990; 103: 66-76.
- Costa LG. The emerging field of ecogenetics. *NeuroToxicology* 2000; 21: 85-89.
- Cowan J, Sinton CM, Varley AW, Wians FH, Haley RW, Munford RS. Gene therapy to prevent organophosphate intoxication. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 173: 1-6.
- Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet* 1996; 14: 334-336.
- Durrington PN, Mackness B, Mackness MJ. Paraoxonase and atherosclerosis. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 473-480.
- Eaton DL, Farin F, Omiecinski CJ, Omenn GS. Genetic susceptibility. In: *Environmental and Occupational Medicine* (Rom WN, Ed.), Lippincott-Raven, Philadelphia, 1998; pp. 209-221.
- Eckerson HW, White CM, LaDu BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet* 1983; 35: 1126-1138.
- Elexpuru-Camiruaga J, Buxton N, kandula V, Dias VS, Cambell D, McIntosh J, Broome J, Jones P, Inskip A, Alldersea J, Fryer AA, Strange RC. Susceptibility to astrocytoma and meningioma: Influence of allelism at glutathione-S-transferase, GSTT1 and GSTM1 and cytochrome P450, CYP2D6 loci. *Cancer Res* 1995; 55: 4237-4239.
- Fleming DE, Chettle DR, Wetmur JG, Desnick RJ, Robin JP, Boulay D, Richard NS, Gordon CL, Webber CE. Effect of the  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase polymorphism on the accumulation of lead in bone and blood in lead smelter workers. *Environ Res* 1998; 77: 49-61.
- Furlong CE. PON1 status and neurologic symptom complexes in Gulf War veterans. *Genom Res* 2000; 10: 153-155.
- Fustinoni S, Soleo L, Warholm M, Begemann P, Rannug A, Neumann HG, Swenberg JA, Vimercati L, Foà V, Colombi A. Influence of Metabolic Genotypes on Biomarkers of Exposure to 1,3-Butadiene in Humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1082-1090.
- Garte S et Al. Metabolic Gene Polymorphism Frequencies in Control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 1239-1248.
- Haley RW, Billecke S, La Du BN. Association of low PON1 type Q (type A) arylesterase activity with neurologic symptom complexes in Gulf War veterans. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 157: 227-233.
- Hassett C, Richter RJ, Humbert R, Chapline C, Crabb JW, Omiecinski CJ, Furlong CE. Characterization of DNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry* 1991; 30: 10141-10149.
- Hayes RB, Zhang L, Yin S, Swenberg JA, Xi L, Wiencke J, Bechtold WE, Yao M, Rothman N, Haas R, O'Neill JP, Zhang D, Wielmels J, Dosemeci M, Li G, Smith MT. Genotoxic markers among butadiene polymer workers in China. *Carcinogenesis* 2000; 21 (1): 55-62.
- Humbert R, Adler DA, Disteche CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 1993; 3: 73-76.
- IARC. Re-evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide: 1,3-Butadiene. Lyon 1999; Vol. 71 (Part One): 109-225.
- Kelada SN, Shelton E, Kaufmann RB, Khoury MJ.  $\delta$ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Genotype and Lead Toxicity: A HuGE Review. *Am J Epidemiol* 2001; 154 (1): 1-13.
- Landi S, Norppa H, Frenzilli G, Cipollini G, Ponzanelli I, Barale R, Hirvonen A. Individual sensitivity to cytogenetic effects of 1,2:3,4-diepoxybutane in cultured human lymphocytes: influence of glutathione S-transferase M1, P1, and T1 genotypes. *Pharmacogenetics* 1998; 8: 461-471.
- Laughlin LT, Bernat BA, Armstrong RN. Mechanistic imperative for the evolution of a metallo glutathione transferase of the vicinal oxygen chelate superfamily. *Chem Biol Interact* 1998; 111-112: 41-50.
- Li WF, Costa LG, Richter RJ, Hagen T, Shih DM, Tward A, Lulis AJ, Furlong CE. Catalytic efficiency determines the in vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphates. *Pharmacogenetics* 2000; 10: 1-13.
- Li WF, Furlong CE, Costa LG. Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice. *Toxicol Lett* 1995; 76: 219-226.
- Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Low paraoxonase in persian Gulf War veterans self-reporting Gulf War Syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 729-733.
- Meyer VA, Zanger VM. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 269-296.
- Motulsky AG. Drug reactions, enzymes and biochemical genetics. *JAMA* 1957; 165: 835-837.
- Motulsky AG. Pharmacogenetics and ecogenetics in 1991. *Pharmacogenetics* 1991; 1: 2-3.
- Mueller RF, Hornung S, Furlong CE, Anderson J, Giblett ER, Motulsky AG. Plasma paraoxonase polymorphism: a new enzyme assay, population, family, biochemical and linkage studies. *Am J Hum Genet* 1983; 35: 393-408.
- Norppa H, Hirvonen A, Järvenatus H, Uusküla M, Tasa G, Ojajarvi A, Sorsa M. Role of GSTT1 and GSTM1 genotypes in determining individual sensitivity to sister chromatid exchange induction by diepoxybutane in cultured human lymphocytes. *Carcinogenesis* 1995; 16: 1261-1265.
- Richter RJ, Furlong CE. Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 745-753.
- Sakai T, Morita Y, Araki T, Kano M, Yoshida T. Relationship between  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase genotypes and heme precursors in lead workers. *Am J Ind Med* 2000; 38: 355-360.
- Schwartz BS, Lee BK, Stewart W, Ahn KD, Kelsey K, Bressler J. Associations of subtypes of hemoglobin with  $\delta$ -aminolevulinic acid dehy-

- dratase genotype and dimercaptosuccinic acid-chelatable lead levels. *Arch Environ Health* 1997b; 52: 97-103.
- Schwartz BS, Lee BK, Stewart W, Ahn KD, Springer K, Kelsey K. Associations of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase genotype with plant, exposure duration, and blood lead and zinc protoporphyrin levels in Korean lead workers. *Am J Epidemiol* 1995; 142: 738-745.
- Schwartz BS, Lee BK, Stewart W, Sithisarankul P, Strickland PT, Ahn KD, Kelsey K.  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase genotype modifies four hour urinary lead excretion after oral administration of dimercaptosuccinic acid. *Occup Environ Med* 1997a; 54: 241-246.
- Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, Lusic AJ. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998; 394: 284-287.
- Sithisarankul P, Schwartz BS, Lee BK, Kelsey KT, Strickland PT. Aminolevulinic acid dehydratase genotype mediates plasma levels of the neurotoxin, 5-aminolevulinic acid, in lead-exposed workers. *Am J Ind Med* 1997; 32: 15-20.
- Smith CM, Wang X, Hu H, Howard H, Kelsey KT. A polymorphism in the  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase gene may modify the pharmacokinetics and toxicity of lead. *Environ Health Perspect* 1995; 103: 248-253.
- Soleo L, Strzelczyk R. Xenobiotici e glutatione. *G Ital Med Lav Erg* 1999; 21(4): 302-308.
- Sorsa M, Osterman-Golkar S, Peltonen K, Saarikoski ST, Srám RJ. Assessment of exposure to butadiene in the process industry. *Toxicology* 1996; 113: 77-83.
- Srám RJ, Rossner P, Peltonen K, Podrazilova K, Mrackova G, Demopoulos NA, Stephanou G, Vlachodimitropoulos D, Darroundi F, Tate AD. Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cells with high frequency of SCE, micronuclei and comet assay parameters in 1,3-butadiene-exposed workers. *Mutat Res* 1998; 419: 145-154.
- Strange RC, Lear JT, Fryer AA. Glutathione-S-transferase polymorphisms: influence on susceptibility to cancer. *Chem Biol Interact* 1998; 111-112: 351-364.
- Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res* 2001; 482: 21-26.
- Uusküla M, Järvenatus H, Hirvonen A, Sorsa M, Norppa H. Influence of GSTM1 genotype on sister chromatid exchange induction by styrene-7,8-oxide and 1,2-epoxy-3-butene in cultured human lymphocytes. *Carcinogenesis* 1995; 16: 947-950.
- Weber WW. *Pharmacogenetics*. Oxford University Press, New York, 1997; pp. 344.
- Wetmur JG, Lehnert G, Desnick RJ. The  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase polymorphism: higher blood lead levels in lead workers and environmentally exposed children with the 1-2 and 2-2 isozymes. *Environ Res* 1991; 56: 109-119.
- Wetmur JG. Influence of the common human  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase polymorphism on lead body burden. *Environ Health Perspect* 1994; 102 (suppl. 3): 215-219.
- Yamada Y, Takatori T, Nagao M, Iwase H, Kurada N, Yanagida J, Shinozuka T. Expression of paraoxonase isoform did not confer protection from acute sarin poisoning in the Tokyo subway terrorist attack. *Int J Leg Med* 2001; 115: 82-84.
- Ziensen B, Angerer J, Lehnert G, Benkman HG, Goedde HW. Polymorphism of  $\delta$ -Aminolevulinic acid dehydratase genotype in lead exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health* 1986; 58: 245-247.

C.L. Galli, M. Marinovich

## Valutazione del rischio cumulativo derivante da miscele con effetto su differenti bersagli

Lab. di Tossicologia e Centro per la Valutazione del Rischio Tossicologico, Università di Milano, Italia

**RIASSUNTO.** L'uomo è esposto a miscele ambientali molto complesse. Ciononostante, la maggior parte degli studi, con eccezione dei test di mutagenesi, hanno indagato su miscele composte da poche sostanze chimiche. Gli approcci che utilizzano le informazioni sulle singole sostanze chimiche non sono di per sé sufficienti per lo studio di miscele ambientali complesse, dal momento che significative componenti di esse non sono identificate.

La valutazione del rischio cumulativo da esposizione multipla a sostanze chimiche è un problema che viene discusso regolarmente nei programmi dell'USEPA e dell'FDA. Negli Stati Uniti il "Food Quality Protection Act" del 1996 indirizza l'"Office of Pesticide Programs" ad includere, nelle sue valutazioni, il rischio associato con gli effetti cumulativi dei pesticidi che hanno un meccanismo d'azione comune. I pesticidi organofosforici sono stati la prima classe interessata, sulla base del comune meccanismo di inibizione dell'acetilcolinesterasi.

Gli studi di tossicità che hanno focalizzato l'attenzione sulle miscele partendo dall'analisi dei loro componenti, hanno evidenziato che per quanto riguarda le sostanze chimiche che non condividono lo stesso bersaglio e meccanismo d'azione, il tipo di azione combinata o di interazione osservata quando ciascuna sostanza chimica era presente nella miscela a livelli chiaramente tossici, non era predittiva della risposta osservata quando ciascuna sostanza chimica era presente a concentrazioni pari o inferiori al LOAEL. Gli "endpoints" solitamente scelti negli studi di tossicità non offrono una grande scelta di risposte valutabili per livelli pari o superiori al NOAEL, e comunque i metodi sensibili che evidenziano piccole modificazioni non sono stati ancora impiegati nel protocollo per testare le miscele.

La tossicogenomica ha integrato la genomica funzionale con la tossicologia classica e noi crediamo che possiede una grande potenzialità di rivoluzionare la ricerca sulle miscele.

**Parole chiave:** miscele, valutazione del rischio cumulativo, interazione.

**ABSTRACT.** [www.gimle.fsm.it](http://www.gimle.fsm.it)

**CUMULATIVE RISK ASSESSMENT OF MIXTURES IMPACTING MULTIPLE TARGET ORGANS.** *Humans are exposed to very complex environmental mixtures. In contrast to this reality, most laboratory investigations of mixtures, with exception of mutagenicity assays, have focused on mixtures comprised of a few chemicals. Component-based approaches that use information on the individual chemical contained in the mixture are not by themselves sufficient for complex, environmental mixtures because significant portions of the mixtures mass are unidentified. Assessment of the cumulative risk posed by exposure to multiple chemicals is a problem the USEPA's and FDA's program discuss*

*regularly. In USA the Food Quality Protection Act of 1996 directs the Office of Pesticide Programs to include in its assessments the risk associated with the cumulative effects of pesticides that have a common mode of action. Organophosphorus pesticides (OPs) have been the first class addressed, based on the common mechanism of acetylcholinesterase inhibition. Interestingly toxicity studies focussing on component-based analysis of mixtures indicated that for chemicals not sharing the same target and mechanism, the type of combined action or interaction found when each chemical in the mixture was present at clearly toxic effect levels did not predict the response observed when each chemical was present at or below the lowest observed adverse effect level (LOAEL). Moreover, mixtures of chemicals produced toxicity only for those chemicals that showed the same toxic effect on the same target organ when given singly at dose above the LOAEL values. However, end-points chosen in routine toxicity studies do not offer a wide dynamic range of testable, significant responses around and above the NOAEL. So far sensitive methods that detect low level changes have not yet been employed in mixtures testing protocol. Toxicogenomics integrated functional genomics with classical toxicology and we believe that it has great potential to revolutionize mixtures research.*

**Key words:** mixtures, cumulative risk assessment, interaction.

La valutazione del rischio derivante alla salute umana dall'esposizione a sostanze chimiche segue una serie ben definita di regole delineate dal National Research Council vent'anni fa (NRC, 1983). la procedura consiste di 4 fasi: identificazione del pericolo, valutazione della dose-risposta, valutazione dell'esposizione e caratterizzazione del rischio, ed è generalmente circoscritta alla valutazione dei rischi potenziali derivanti da un singolo composto chimico attraverso una singola via di esposizione. mentre la valutazione del rischio per singoli composti è chiaramente importante per definire livelli di esposizione accettabili, è evidente che nella vita reale la popolazione è esposta giornalmente a bassissimi livelli di una miriade di composti sintetici e naturali attraverso molteplici vie di esposizione.

Da questa realtà è scaturita la preoccupazione sui possibili effetti tossici che possano insorgere dall'interazione fra i vari composti chimici, preoccupazione che non ha ancora trovato un consenso a livello scientifico e regolatorio su come condurre la valutazione del rischio nel caso di miscele.

Il problema si è riproposto con la recente approvazione negli USA del Food Quality Protection Act (FQPA, 1996), che nella valutazione del rischio da pesticidi con un medesimo meccanismo d'azione considera i potenziali effetti derivanti dall'esposizione cumulativa: prima di questo documento, i rischi potenziali da pesticidi erano valutati singolarmente per ogni molecola. Il FQPA prevede che si consideri una valutazione cumulativa del rischio per esposizioni contemporanea a due o più molecole che agiscano con lo stesso meccanismo d'azione. L'Environmental Protection Agency (Guidance for identifying Pesticide Chemicals and Other Substances that have a Common Mechanism of Toxicity, 1999) unitamente ad un gruppo di lavoro dell'International Life Sciences Institute (1998) hanno concluso che due composti hanno uno stesso meccanismo d'azione quando:

- causano lo stesso effetto avverso
- agiscono sullo stesso bersaglio molecolare nello stesso tessuto bersaglio e
- agiscono con lo stesso meccanismo farmacologico d'azione e possono condividere un intermedio tossico comune.

Non è peraltro definito se tutti e tre questi requisiti debbano essere soddisfatti perché si possa parlare di "meccanismo d'azione comune". È anche evidente che fatta eccezione per pochi gruppi di sostanze - pesticidi organofosforici e carbammici - informazioni precise sugli effetti di sostanze chimiche e ancor di più sul loro meccanismo d'azione a livello animale/umano sono lacunose. In pratica, quindi, la decisione di fare una valutazione comune si basa sulle somiglianze strutturali unite al verificarsi di effetti avversi comuni su indicatori selezionati biochimici, fisiologici o funzionali.

Ancora più nebuloso è il campo della valutazione tossicologica di miscele (i cui componenti se noti) abbiano bersagli e organi bersaglio differenti. Per quanto riguarda le miscele di componenti apparentemente con diverso meccanismo d'azione, gli studi tossicologici disponibili (rari) mostrano che in questo caso il tipo d'azione o interazione combinata riscontrata quando ogni sostanza è presente nella miscela a concentrazioni chiaramente tossiche non è predittiva della risposta osservabile quando ogni sostanza è presente a livelli pari o inferiori al proprio LOAEL.

In ogni caso, il vero punto focale della valutazione del rischio da miscele deriva proprio dalla mancanza di dati di tossicità *in vivo* e dalla confusione su come generarli.

Infatti la quasi totalità dei dati tossicologici *in vivo* è relativa a singoli composti, somministrati a dose fisse per una singola via. Inoltre l'applicazione dei fattori di sicurezza che permettono classicamente l'estrapolazione inter ed intra-specie non tiene conto della possibilità di azioni combinate o di interazioni. Anche la definizione di miscela può variare: per miscela semplice, s'intende una miscela di un numero relativamente piccolo di composti (meno di 10) di composizione qualitativa e quantitativa nota (combinazione di medicine o di pesticidi). Una miscela complessa può comprendere decine, centinaia o addirittura migliaia di molecole e avere una composizione qualitativa ignota (acqua potabile, aromi naturali, atmosfera di un ambiente di lavoro).

Anche da un punto di vista operativo si possono usare diversi approcci: valutare la miscela come una singola entità, o valutarla sulla base dei singoli componenti.

Un'altra strategia usata per la valutazione del pericolo da esposizione a miscele è l'uso dei fattori di tossicità equivalente (toxic equivalency factor, TEF). Questo metodo proviene dalla tossicologia ambientale dove è riconosciuto che molecole correlate strutturalmente possano esibire tossicità e modo d'azione simili. In questo caso la potenza della miscela è calcolata dalla somma delle concentrazioni di ogni congenere nella miscela moltiplicato il proprio TEF.

Per tutte le motivazioni sopra esposte i tests *in vitro* sono diventati parte essenziale della strategia tossicologica nei riguardi delle miscele. I recenti sviluppi nell'arena della biologia molecolare e della tecnologia dei microchip sono applicabili in campo tossicologico nello screening dell'azione a livello molecolare delle miscele. In questo modo, per esempio, è possibile identificare velocemente proteine alterate da agenti tossici e ottenere informazioni su eventuali modifiche di vie biochimiche. L'acquisizione di nuove informazioni nell'area della genomica e proteomica permetterà un migliore approccio nella valutazione delle interazioni.

Tuttavia al presente, non è stato intrapreso nessun approccio integrato per valutare il potere predittivo delle nuove tecnologie nella valutazione tossicologica.

V. Foà, A. Bordiga

## Il principio di precauzione: è applicabile in medicina del lavoro?

Dipartimento di Medicina del Lavoro, Università degli Studi di Milano

**RIASSUNTO.** Il principio di Precauzione (PP) e la sua applicazione alle politiche ambientali e sanitarie emerge, a partire dagli anni '70 e da allora è stato introdotto, sempre più frequentemente, in diversi trattati e conferenze internazionali su ambiente e salute. Esso rappresenta una politica di gestione del rischio che viene applicata in circostanze caratterizzate da un alto grado di incertezza scientifica e riflette la necessità di intervenire nei confronti di un rischio potenzialmente grave senza attendere i risultati della ricerca scientifica. Considerando le realtà lavorative come situazioni in cui tali circostanze si verificano, colui a cui è deputata la gestione del rischio è necessariamente il Datore di Lavoro che si avvale di risorse e strumenti differenti tra cui la consulenza del Medico Competente. In azienda, in seguito alla identificazione dei possibili fattori di pericolo per la salute e la sicurezza, valutato il rischio come non accettabile per la salute dei lavoratori, occorre decidere quali azioni cautelative adottare anche in funzione di esigenze e limitazioni di tipo economico, tecnico ed autocautelativo. Queste possono andare da interventi di "prudent avoidance" passando a misure di entità intermedia come la sorveglianza sanitaria dei lavoratori, fino a provvedimenti radicali che si ispirano al PP. È opportuno che il medico competente che già si trovi ad operare nei confronti di rischi ben conosciuti e valutati, introduca in forma cautelativa nell'attività di sorveglianza sanitaria anche quegli atti e quegli strumenti che vanno a ricercare eventuali effetti avversi legati a fattori di rischio caratterizzati da incertezza scientifica, soprattutto in quei casi in cui il datore di lavoro non risulti sensibile o sia impossibilitato ad adottare altri tipi di strumenti cautelativi. Il ruolo del medico competente, inoltre dovrebbe svilupparsi anche nella fase di valutazione dei rischi con la definizione e segnalazione di quei xenobiotici od agenti fisici le cui conoscenze sono affette da incertezze scientifiche.

**Parole chiave:** principio di precauzione, medicina del lavoro, medico competente.

**ABSTRACT.** [www.gimle.fsm.it](http://www.gimle.fsm.it)

**THE PRECAUTIONARY PRINCIPLE: IS IT APPLICABLE TO THE OCCUPATIONAL MEDICINE? Precautionary Principle (PP) and its application to environmental and health policy appear in the 70's and from that time is introduced more and more frequently in different international treaties and conferences on environment and health. PP is a risk management policy applied to scientifically uncertain circumstances where it is necessary to act against a potentially harmful risk factor without waiting for more accurate information. When this situation takes place at the workplace, the risk management is an Employer's task. The employer can use different instruments, including the occupational physician's advice, to reach their target. After identification of possible health and safety risk factors and after characterisation of a non-admissible risk for worker's health, the Employer must chose which precautionary actions to take, also in function of economic, technical and judicial needs and restrictions. This action can be the application of measures of "prudent avoidance" through steps such as health surveillance, until more radical measures are taken by using P.P. The Occupational health specialist that is already operating of the work place with characterised and well known risk factors should introduce the instruments, in the health surveillance**

*activities, that may detect possibly adverse effects related to risk factors characterised by scientific uncertainty. This is very important whenever the employers don't have the possibilities or are not sensitive enough to take other kinds of precautionary measures. Moreover, the occupational physician should play an active role also in the risk assessment phase by defining those chemicals or physical agents still characterized by scientific uncertainty.*

**Key words:** precautionary principle, occupational medicine, occupational physician.

Il principio di Precauzione (PP) e la sua applicazione alle politiche ambientali e sanitarie emerge, come concetto esplicito, a partire dagli anni '70, nel "German Clean Air Act" (Boehmer-Cristiansen) e da allora è stato invocato in diversi trattati e conferenze internazionali su ambiente e salute. Ma è soprattutto a partire dagli anni novanta, che si è creato un movimento crescente, tra governi, opinione pubblica e comunità scientifica per l'adozione di un "approccio cautelativo" nella gestione dei rischi sanitari ed ambientali quando questi siano caratterizzati da conoscenze incomplete o insufficienti.

Per rispondere alle preoccupazioni che sono state espresse per problemi ambientali e di salute pubblica e occupazionale legati a tali rischi, sono state sviluppate diverse politiche di cautela. Queste comprendono la "prudent avoidance", il principio ALARA ed il Principio di Precauzione (OMS)<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> La "Prudent avoidance" prescrive l'adozione di misure a basso costo per ridurre una esposizione potenzialmente dannosa ancorché non vi siano previsioni scientificamente giustificabile di riduzione del rischio. Nell'espressione "prudent avoidance" l'aggettivo prudente si riferisce ai costi, non all'atteggiamento verso il rischio. La "prudent avoidance" non implica fissare i limiti di esposizione ad un livello arbitrariamente basso e richiedere che questi siano raggiunti senza badare ai costi, ma implica piuttosto l'azione di provvedimenti per ridurre l'esposizione ad un costo modesto. Non richiede una valutazione dei potenziali benefici per la salute.

ALARA è l'acronimo inglese As Low As Reasonably Achievable (il più basso ragionevolmente raggiungibile). È una politica atta a minimizzare rischi riconosciuti mantenendo l'esposizione ai livelli più bassi "ragionevolmente" possibili, tenendo in considerazione non solo la tecnica ma anche i costi, i benefici per la salute pubblica ed altri fattori sociali ed economici.

Oggi il principio ALARA è usato dove i limiti non sono stabiliti sulla base di una valutazione tossicologica con individuazione di una soglia, ma piuttosto sulla base di un "rischio accettabile" o meglio "non inaccettabile" come nel caso dell'utilizzo delle Radiazioni Ionizzanti (RI) a scopi medici e degli agenti cancerogeni in generale. In queste circostanze va minimizzato un rischio che si presume possa esistere ad ogni livello di esposizione considerando i benefici derivanti dall'esposizione alle RI.

Il **Principio di Precauzione** rappresenta una politica di gestione del rischio che viene applicata in circostanze caratterizzate da un alto grado di incertezza scientifica e riflette la necessità di intervenire nei confronti di un rischio potenzialmente grave senza attendere i risultati della ricerca scientifica.

In Europa il Principio di precauzione appare per la prima volta nel 1992 nel Trattato sull'Unione Europea di Maastricht che afferma che "le politiche ambientali ... dovrebbero essere basate sul principio di precauzione ... e sui principi della riduzione alla fonte dei danni per l'ambiente e del risarcimento da parte di colui che inquina".

Da allora è stato richiamato in diversi atti politici ed è entrato a far parte della giurisprudenza dell'UE. Alcuni esempi in cui è stato applicato fino ad ora sono per esempio quelli degli Organismi Geneticamente Modificati (OGM), del caso Bovine Serum Encephalitis (BSE), del bando degli ormoni dalla carne e dei fluorocarburi (CFC) per limitare la riduzione dello strato di ozono nell'atmosfera.

Da subito è emersa, però, la non facile applicabilità di tale principio anche in virtù delle molte incertezze e dei molteplici interessi che esistono quando viene invocata la sua applicazione. Se da una parte il PP è accettato quasi unanimemente nelle sue finalità preventive, dall'altra ha suscitato e tutt'ora suscita diverse critiche.

Per affrontare tali problemi e per dare ai governanti degli strumenti sui quali poter appoggiare le loro decisioni la Commissione Europea ha prodotto due importanti documenti. Nel 1998 tramite la Direzione Generale XXIV (Politica dei consumatori e protezione della salute) ha pubblicato le "Linee guida sull'applicazione del PP" (EC) e nel 2000 ha pubblicato una Comunicazione "Communication from the Commission on the Precautionary Principle" (EC).

In questi documenti viene chiarito che il ricorso al PP presuppone l'identificazione di effetti potenzialmente negativi derivanti da un fenomeno, un prodotto o un processo e una relativa valutazione scientifica del rischio che per l'insufficienza o l'inconcludenza dei dati non permette di caratterizzare con sufficiente certezza il rischio in questione.

Il documento chiarisce la differenza esistente tra il **PP** ed il **Principio (o strategia) di Prudenza**. Quest'ultimo fa parte del processo di valutazione del rischio, attraverso l'applicazione di modelli cautelativi di interpretazioni dei dati.

Vi sono situazioni in cui, però, i dati scientifici sono insufficienti per poter applicare concretamente tali elementi di prudenza o in cui i rapporti di causa-effetto sono ipotizzati e non dimostrati. In conseguenza di tali incertezze e qualora i responsabili politici ritengano che il livello prescelto di protezione dell'ambiente o della salute umana, possa essere minacciato, viene applicato il PP che appartiene perciò alla fase di **gestione del rischio**.

Il problema dell'incertezza scientifica, presupposto per l'applicazione del principio è, nei fatti, un problema non affrontato in questa fase dalla Commissione. È infatti difficile fornire esemplificazioni per quanto generali, in quanto il PP può essere applicato in una gamma di situazioni e fenomeni troppo ampia. Spetta alla comunità scientifica, nei singoli casi, stabilire il grado di incertezza legata alla valutazione del rischio.

Una parte importante è dedicata ai "principi" a cui si ispira il PP che sono i principi generali di buona gestione dei rischi. Questi comportano:

- La **proporzionalità**: le misure devono essere proporzionate al livello di protezione desiderata.
- La **non-discriminazione**: situazioni confrontabili non devono essere trattate diversamente e situazioni differenti non devono essere trattate arbitrariamente nello stesso modo;
- **Coerenza**: le misure devono essere coerenti, nella natura e negli scopi, con misure già prese in situazioni equivalenti in cui le informazioni scientifiche erano sufficienti.
- **Esame dei vantaggi e degli oneri derivanti dall'azione o dalla mancanza di azione**: occorre soppesare le conseguenze positive o negative più probabili dell'azione prevista, sia a breve che a lungo termine. L'esame dei vantaggi e degli oneri non può ridursi soltanto ad un'analisi economica costi benefici. Tale analisi è più vasta e include ovviamente anche considerazioni economiche. Potrebbe essere presa in considerazione fra l'altro la accettabilità da parte della popolazione, quando ciò sia adeguato e realizzabile.
- **L'esame dell'evoluzione della conoscenza scientifica**: le misure devono essere mantenute finché i dati scientifici rimangono insufficienti, imprecisi o non conclusivi e finché il rischio sia ritenuto sufficientemente elevato per non accettare di farlo sostenere alla società. Le misure adottate, inoltre dovrebbero essere soggette a monitoraggi su base scientifica e riviste periodicamente alla luce di nuovi dati emersi.

Accanto alle indicazioni della Commissione Europea un'importante contributo alla applicazione del PP viene dalla "European Environment Agency" (EEA) di Copenhagen. Questa, nel 2001, ha pubblicato un Rapporto in cui vengono ricercate le cause e le conseguenze del mancato ricorso al PP nei confronti di 14 casi emblematici di rischi per i quali erano stati segnalati, da parte della comunità scientifica, avvertimenti circa la probabile dannosità.

Il Rapporto riporta diverse "lezioni" per chi è impegnato nella valutazione e gestione dei rischi:

- Una lezione centrale per la comunità scientifica consiste nella importanza della presa di coscienza della limitatezza delle nostre conoscenze. In tutti i casi considerati ciò che è stato trascurato è stata la certezza virtuale che avrebbero potuto esserci fattori esclusi dal campo di esecuzione della valutazione del rischio.
- Una ricerca ben pianificata ed un monitoraggio dei risultati è essenziale per la individuazione sistematica delle aree di incertezza.
- Nella valutazione del rischio di un determinato pericolo, potrebbe esservi un campo coinvolto in misura preponderante rispetto agli altri e di prevaricazione sulle altre discipline che ritarda o nasconde eventuali importanti segnali di allarme;
- Di fronte a dati che denunciano la possibile dannosità di una determinata tecnologia od agente, dovrebbero essere promosse soluzioni e tecnologie alternative che riducano l'eventuale impatto di future "sorpresa" lega-

te ad un agente o un prodotto che monopolizza il mercato (vedi amianto).

- Accanto all'importanza di un approccio interdisciplinare nell'applicazione del PP è spesso utile e appropriato attingere dalle esperienze locali come quelle dei lavoratori, dei consumatori e della cittadinanza che vive nelle zone più interessate.
- Un altro elemento fondamentale nella scelta di azioni regolamentative è legato alla garanzia di una adeguata distanza tra chi effettua le ricerche scientifiche, chi ne deve gestire il rischio e le parti coinvolte che hanno interesse a influenzare tali fasi.

Non possiamo non riconoscere che il concetto (e la filosofia) insito nell'applicazione del "principio di Precauzione" (PP) è sempre stato presente in coloro che nel tempo andavano suggerendo norme a protezione della salute dei lavoratori e dei cittadini. Ovviamente con maggiore o minore forza a seconda dei momenti storici che si vivevano. Per fare solo alcuni esempi, emerge bene come abbia trovato la propria estrinsecazione nell'applicazione di fattori numerici di incertezza alla dose risultata di non effetto in esperimenti in vivo, numeri che sono più o meno grandi sia in dipendenza dell'entità delle informazioni disponibili sia del tipo (reversibile o irreversibile) dell'effetto osservato. I concetti che sottintendono il PP hanno raggiunto il maggior livello di applicazione nei processi messi in atto dalle agenzie regolamentative per la valutazione del rischio da sostanze chimiche in generale e di sostanze o agenti fisici cancerogeni in particolare. Di fatto esisteva il problema, per esempio, di estrapolare livelli di esposizione non nocivi per l'uomo dalle elevate dosi, efficaci sperimentalmente, alle basse dosi riscontrabili usualmente oggi nell'ambiente di vita e di lavoro.

In termini generali i problemi nei quali l'incertezza è più rilevante possono essere così elencati:

- Mancanza di dati scientifici che correlino in maniera quantitativa l'esposizione a sostanze chimiche con i rischi per la salute;
- Divergenza di opinioni all'interno della comunità scientifica sui meriti e sul livello della evidenza scientifica;
- Mancanza di conformità nel riportare i risultati delle ricerche che rendono difficile la loro applicazione alla valutazione del rischio;
- Incertezze dei risultati prodotti dai modelli teorici, modelli che sono utilizzati per mancanza delle misure.

L'applicazione in tossicologia quindi sia dei fattori di incertezza che dei principi di prudenza od "opzioni di default", sono solo esempi di come si siano affrontate nel tempo le problematiche che poi hanno trovato una loro più recente codifica, a livello di gestione del rischio, nel PP.

Al di là dell'utilizzo di tali strumenti utilizzati nel derivare i limiti di esposizione per l'uomo a partire dagli studi di tossicità sperimentali, è lecito chiedersi se abbia senso, nella pratica del medico del lavoro, il ricorso al PP.

Richiamando sinteticamente i concetti contenuti nella definizione del PP ed i presupposti nei quali invocarlo, ribadiamo che esso è uno strumento di gestione del rischio che viene utilizzato nelle situazioni in cui, a fronte di dati scientifici insufficienti o contraddittori riguardanti un de-

terminato fattore di rischio, esiste la possibilità di danni per la salute che per la loro gravità o frequenza, sono incompatibili con il livello di protezione scelta.

A differenza di altre politiche di cautela, il PP si riferisce ad azioni preventive di considerevole importanza come disposizioni e limitazioni regolamentative, tra cui l'imposizione di limiti di esposizione, limitazioni nell'utilizzo, il bando temporaneo e altre ancora.

Appare subito chiaro che quand'anche il PP possa avere un senso nell'ambito delle attività di salute occupazionale, certamente il medico del lavoro non è la figura centrale per la sua applicazione.

Colui a cui è deputata la gestione del rischio in azienda rimane il Datore di Lavoro che si avvale di risorse e strumenti differenti tra i quali la consulenza del Medico Competente con il suo bagaglio culturale e le capacità professionali che lo caratterizzano.

Vogliamo in ogni caso provare a identificare le situazioni in cui il ricorso al PP così come sopra definito possa avere un significato nelle attività di prevenzione in salute occupazionale.

L'incertezza è una componente intrinseca alla attività di valutazione dei rischi ed alla attività scientifica in generale tanto più quando esistono lacune o contraddizioni riguardo alle conoscenze relative agli specifici fattori di rischio.

Tali incertezze possono essere rappresentate da nuove conoscenze emergenti dalla letteratura scientifica (per esempio, attualmente gli effetti ipotizzati derivanti da esposizioni a basse dosi di tossici come le "endocrine disruptions", la "multiple chemical sensitivity", malattie autoimmuni e diverse neuropatie), da fattori di rischio già noti ma dibattuti, in merito alla loro esistenza e rilevanza, in seno alla comunità scientifica, da rischi noti ma classificati in categorie caratterizzate da limitata probabilità di effetto (agenti appartenenti alla classe 3 di cancerogenicità e mutagenicità etichettate come R40, agenti possibilmente tossici per la fertilità o possibilmente embriotossici etichettate come R62 e R63, i campi elettromagnetici a bassa frequenza classificati in classe 2B IARC).

Un'ulteriore componente di incertezza è legata anche all'attività di valutazione del rischio, anche quando i singoli fattori di rischio siano ben conosciuti.

Infatti, al di là dell'applicazione di una corretta metodologia di monitoraggio ambientale (MA) indicata dagli igienisti industriali spesso la misurazione di fattori di rischio presenta difficoltà oggettive, anche di tipo economico, come nel caso della determinazione dell'esposizione multipla ed a basse dosi ad agenti chimici. Il MA spesso assume carattere occasionale (mentre sarebbero necessarie campagne regolari) e per determinati fattori di rischio come per quello biologico è spesso difficile misurare con precisione il rischio con conseguente incertezza nella quantificazione della sua entità.

Tenuto conto della incertezza, seguendo sempre il filo conduttore dell'applicazione del PP, il datore di lavoro con i suoi collaboratori dovrebbe valutare se i rischi per la salute determinati dalle limitate conoscenze sui fattori di rischio e dalle incertezze legate alla valutazione dei rischi "tradizionali" possano determinare un rischio non accettabile per la salute dei lavoratori.

Questo punto rappresenta il nodo critico del processo anche perché gli strumenti di tipo statistico ed epidemiologico non sono applicabili a campioni di limitata numerosità come sono la gran parte delle aziende, mentre può essere più facile esprimersi sulla possibile gravità o irreversibilità degli effetti negativi derivanti da presunti fattori di rischio.

Nel caso in cui si sia giunti alla conclusione di una necessità di intervento il datore di lavoro dovrebbe decidere quali azioni cautelative adottare in funzione di esigenze e limitazioni economiche, tecniche ed autocautelative (rischio di procedimenti giudiziari futuri).

Misure cautelative di importanza rilevante possono essere la sostituzione di determinati agenti chimici, le modifiche di tipo tecnico su macchinari e ciclo produttivo o radicali sistemi di abbattimento ambientale dei tossici. Possono altresì essere prese misure di "prudent avoidance" finalizzate a ridurre l'esposizione con interventi a basso costo come la fornitura di DPI, la formazione e informazione ai lavoratori, la riduzione al minimo dei lavoratori che potrebbero essere esposti.

Tra gli interventi di entità intermedia possono essere considerati il MA periodico e la sorveglianza sanitaria dei lavoratori ad opera del medico competente.

Il ruolo del medico competente in questa, a volte forzata, analogia tra l'utilizzo del PP a livello di stati ed a livello aziendale merita alcune considerazioni.

Innanzitutto si suppone che il medico del lavoro abbia le conoscenze la formazione e soprattutto l'aggiornamento che gli consentano nella fase di valutazione dei rischi, un ruolo attivo nella individuazione, definizione e segnalazione di quei xenobiotici o agenti fisici le cui conoscenze sono affette da incertezze scientifiche. Egli inoltre dovrebbe conoscere quei potenziali effetti precoci sulla salute da individuare mediante la raccolta anamnestica, l'esame ob-

biettivo mirato, e la predisposizione di accertamenti diagnostici specifici.

In ogni caso, il medico competente che già si trovi a operare nei confronti di rischi ben conosciuti e valutati è opportuno che in forma cautelativa introduca nell'attività di sorveglianza sanitaria anche quegli atti e quegli strumenti che vanno a ricercare eventuali effetti avversi legati a fattori di rischio caratterizzati da incertezza scientifica. Soprattutto in quei casi in cui il datore di lavoro non risulti sensibile o sia impossibilitato ad adottare altri tipi di strumenti cautelativi in forma di prevenzione primaria.

In conclusione il PP risulta uno strumento che si adatta alla gestione dei rischi in ambito di salute occupazionale quando ad utilizzarlo sono i governi o gli enti sopranazionali, mentre sembra essere meno adatto ad essere invocato ed utilizzato nella pratica a livello aziendale. Nonostante ciò esistono forme e strumenti di tipo cautelativo che i datori di lavoro ed i medici competenti possono adottare anche nei confronti di quei pericoli per la salute che risultano caratterizzati da incertezza scientifica.

---

## Bibliografia

- Boehmer-Cristiansen S. The precautionary principle in Germany: enabling government. In O'Riordan, t. e Cameron, J., *Interpreting the precautionary principle*, pag 3, Cameron and May, London. 1994.
- OMS. Fact sheet. CEM e salute pubblica. Politiche cautelative. Marzo 2000.
- European Commission, 1999. Guidelines on the application of the precautionary principle. HB/hb d (98). DG XXIV, European Commission.
- European Commission, 2000. Communication from the Commission on the Precautionary Principle, COM (2000)1, Bruxelles.
- European Environmental Agency, 2001. Late lessons from early warnings: the precautionary principle 1896-2000. Environmental Issue Report n. 22.

Pagina 334  
Bianca

# **VALUTAZIONE DEL RISCHIO IN TOSSICOLOGIA OCCUPAZIONALE**

## **INTERVENTI PREORDINATI**

G.B. Bartolucci<sup>1</sup> (Coordinatore), L. Ambrosi<sup>2</sup>, P. Apostoli<sup>2</sup>, D. Cavallo<sup>1</sup>, D. Chiesara<sup>3</sup>, D. Cottica<sup>1</sup>, A. Gelormini<sup>2</sup>, C. Locatelli<sup>3</sup>, M. Manno<sup>2</sup>, G. Muzi<sup>2</sup>, G. Nano<sup>1</sup>, N. Sannolo<sup>2</sup>, G. Sesana<sup>1</sup>, L. Soleo<sup>2</sup>

## Applicazione del D.Lgs 25/02 e definizione di "rischio moderato"

Gruppo di Lavoro congiunto delle <sup>1</sup> Associazione Italiana degli Igienisti Industriali (AIDII) - <sup>2</sup> Società Italiana di Medicina del Lavoro e Igiene Industriale (SIMLII) - <sup>3</sup> Società Italiana di Tossicologia (SITOX) su "Analisi del D.Lgs 25/02 e ruolo delle Società Scientifiche nella definizione dei Valori Limite"

**RIASSUNTO.** Viene riportata la posizione di un Gruppo di Lavoro congiunto costituito dalle Associazione Italiana degli Igienisti Industriali, Società Italiana di Medicina del Lavoro e Igiene Industriale, Società Italiana di Tossicologia su "Analisi del D.Lgs 25/02 e ruolo delle Società Scientifiche nella definizione dei Valori Limite". Gli Autori, nell'esaminare in dettaglio il Decreto, mettono in evidenza i numerosi punti poco chiari e controversi e le difficoltà interpretative che ne rendono complicata l'applicazione da parte dei datori di lavoro e dei tecnici della prevenzione. In particolare segnalano una serie di incongruenze rispetto al testo della Direttiva Comunitaria e ad altre normative nazionali tuttora vigenti; sottolineano inoltre, accanto ad aspetti positivi quali l'eliminazione pressoché totale del regime tabellare delle visite mediche (previsto dal D.P.R. 303/56), i principali aspetti negativi come l'uso improprio del termine "moderato" rispetto all'originario "slight", la non obbligatorietà della sorveglianza sanitaria e del monitoraggio biologico in presenza di un rischio moderato, la conseguente esclusione in queste circostanze del medico del lavoro-competente dalla valutazione del rischio, le modifiche in aumento dei limiti del piombo rispetto al D.Lgs 277/91. Entrano poi nel merito della definizione di rischio moderato e di una recente proposta avanzata al riguardo dal Comitato Consultivo nominato ad hoc dal Ministero del Lavoro e delle Politiche Sociali: sottolineano l'impossibilità di equiparare il termine "moderato" ("basso") ad "irrilevante per la salute", sia dal punto di vista semantico che tossicologico; evidenziano inoltre come sia gravemente limitativo basarsi, per la valutazione del rischio moderato, sui soli valori limite (confusione tra i concetti di esposizione e rischio) o peggio su "algoritmi", strumenti questi ultimi utili nella fase preliminare di valutazione del rischio ma estremamente pericolosi se utilizzati da tecnici e/o soggetti non esperti. Al riguardo sottolineano come sia imprescindibile l'opera del binomio tecnico costituito dal Responsabile del Servizio di Prevenzione e Protezione e dal Medico Competente. Il Gruppo di Lavoro conclude che è necessaria la riscrittura della norma in questione o quanto meno l'emanazione di un Decreto integrativo o correttivo che chiarisca gli aspetti controversi ed elimini le incongruenze più evidenti che rischiano di ridurre l'attuale standard per la tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro.

**Parole chiave:** Decreto Legislativo 25/02, protezione da agenti chimici, rischio moderato.

**ABSTRACT.** *www.gimle.fsm.it*  
**IMPLEMENTATION OF PARLIAMENTARY ACT D.LGS 2<sup>ND</sup> FEBRUARY 2002 N. 25 AND DEFINITION OF "MODERATE RISK".** This paper describes the position of the Joint Working Group of the Italian Association of Industrial Hygienists (AIDII), the Italian Society of Occupational Health and Industrial Hygiene (SIMLII) and the Italian Society of Toxicology (SITOX) on "Analysis of Parliamentary Act D.Lgs 25/02 and role of the Scientific Societies in the definition of Limit Values". The positive aspects of the new

*law which implements the European Directive 98/24 are discussed, including the abolition of the rigid periodicity of medical examinations as stated by the old rule D.P.R. 303/56. The Authors also address various parts of the law which appear to be unclear and controversial and highlight the expected difficulties arising for the employers and the safety and health professionals during the application of this new piece of legislation. Moreover, a number of discrepancies are noted between the new Italian law and the original Directive or other current Italian rules such as i. the translation of the term "slight risk", as from the original Directive, into "moderate risk", and the resulting non compulsoriness of health surveillance and biological monitoring of the workers in presence of a "moderate risk", ii. the concurrent exclusion, under the same circumstances, of the occupational physician from risk assessment procedures and iii. the upward modification of the previously established (D.Lgs 277/91) occupational exposure limits for lead. Moreover, the Authors examine and criticize - both in semantic and in toxicological terms - a recent proposal for the definition of "moderate risk" made by an ad hoc Consulting Committee of the Labour Ministry, in which the term "moderate" has been interpreted either as "low" or as "irrelevant for health effects", clearly two very different meanings. Besides, it would be inappropriate to define the conditions of a moderate risk based only on the level of exposure to the chemical (expressed as a fraction of the corresponding limit value), without considering the two other components of risk assessment for that chemical (hazard and susceptibility). Even worse would be the use of simplified models based on "algorithms", which might be useful in a preliminary phase of risk assessment, but easily could lead to an under- or over-estimation of risk, particularly when used by non professionals. In conclusion, the Working Group recommend that the new law be amended in order to clarify its most controversial aspects, whose misinterpretation could severely jeopardize the protection of the workers' safety and health at work.*

**Key words:** Parliamentary Act D.Lgs 25/02, chemical risk prevention, moderate risk.

### Il decreto legislativo 25/02

#### Premessa

Dal 23 giugno 2002 è operativo il D.Lgs 25/02 che recepisce la Direttiva 98/24/CE ed integra il D.Lgs 626/94 per quanto riguarda la protezione della salute e della sicurezza dei lavoratori contro i rischi derivanti da agenti chimici durante il lavoro". Tale decreto, al di là degli errori formali successivamente in parte corretti, presenta, come già da più parti sottolineato (1, 2, 3), numerosi punti poco chiari e controversi e difficoltà interpretative che ne rendono complicata l'applicazione da parte dei datori di lavoro e dei tecnici della prevenzione.

Accanto ad aspetti positivi, quali ad esempio la conclusione dell'iter avviato nell'ambito della prevenzione dei rischi chimici con le norme sull'etichettatura e le schede di sicurezza (D.Lgs 52/97 e 285/98), l'eliminazione

pressoché totale del regime tabellare delle visite mediche (DPR 303/56 e successive modifiche), l'introduzione del monitoraggio ambientale e biologico seppure in particolari situazioni, ve ne sono altri estremamente criticabili quali, ad esempio, l'uso improprio del termine "moderato" rispetto all'originale del testo comunitario "slight", la non obbligatorietà della sorveglianza sanitaria e del monitoraggio biologico in presenza di un rischio "moderato" e cioè non trascurabile, la conseguente esclusione in queste circostanze del medico competente dalla valutazione del rischio, le modifiche in aumento dei limiti per il piombo apportate rispetto al D.Lgs 277/91.

Al riguardo il Gruppo di Lavoro congiunto delle Società Scientifiche Associazione Italiana degli Igienisti Industriali (AIDII), Società Italiana di Medicina del Lavoro ed Igiene Industriale (SIMLII) e Società Italiana di Tossicologia (SITOX) ha preparato un documento in data 2/8/2002 con il quale si richiedeva la riscrittura della norma o, quanto meno, l'emanazione in tempi ragionevoli di un decreto integrativo e correttivo (come già avvenuto per il D.Lgs 626/94 con il 242/96) che chiarisse gli aspetti controversi ed eliminasse le incongruenze più evidenti che rischiavano di ridurre l'attuale standard per la tutela della salute e sicurezza nei luoghi di lavoro.

Su di un piano diverso (non discussione nel merito, limitazione agli aspetti applicativi) si è mosso il Gruppo di Lavoro sull'applicazione del D.Lgs 25/02 del Coordinamento delle Regioni e delle Province Autonome che ha elaborato al riguardo delle Linee Guida a quanto si sa non ancora ufficialmente approvate (4).

### Campo di applicazione

Il primo punto che si vuole discutere riguarda il campo di applicazione della norma. Nel decreto sembra chiaro che la valutazione del rischio debba essere fatta non solo in relazione alla prevenzione dei rischi per la salute ma anche a quelli per la sicurezza (art. 60-bis capo 1, ter capo 3, quater capo 1 e sexies, capi da 5 a 7); non risulta tuttavia chiaro cosa debba intendersi per agente chimico pericoloso: infatti, se per le sostanze e per le miscele soggette alle norme di etichettatura le definizioni sono chiare, per gli altri prodotti la definizione del comma 3 articolo 60-ter apre il campo a tutti gli agenti chimici presenti a qualsiasi titolo negli ambienti di lavoro.

La definizione, anche se in modo incompleto (agenti chimici che possono comportare un pericolo a causa di loro proprietà chimico-fisiche, chimiche o tossicologiche e del modo in cui sono utilizzati o presenti sul luogo di lavoro), delinea la necessità di effettuare una vera e propria analisi di rischio comprensiva della verifica delle potenzialità pericolose dell'agente chimico per la salute e la sicurezza dei lavoratori, dell'analisi di impianto, di processo e di mansione per la determinazione delle quantità e delle modalità di contatto di tali agenti con i ricettori del danno (lavoratori esposti direttamente, lavoratori e popolazione esposta indirettamente, ecc.).

Questa necessità sembra confermata dalla lettura dell'articolo 60-quadro: infatti, il datore di lavoro ha l'obbligo di determinare "preliminariamente" la presenza di agenti chimici pericolosi sul luogo di lavoro e, conseguentemente, valutarne i rischi per la sicurezza e la salute dei lavoratori.

### La valutazione del rischio

L'analisi di rischio preliminare deve tener conto non solo delle sostanze presenti, della loro pericolosità per la salute e la sicurezza, ma anche dei processi, degli impianti, delle mansioni e compiti lavorativi e degli ambienti in cui vengono svolte le lavorazioni (compresi i prodotti intermedi, ecc.), in modo che la preliminare stima dei rischi abbia una completezza tale da poter escludere motivatamente i rischi considerati irrilevanti.

La norma non delinea chiaramente un percorso e un metodo per effettuare l'analisi di rischio iniziale, ma fornisce solo alcuni elementi da prendere in considerazione:

- le proprietà pericolose;
- le informazioni contenute nella scheda di sicurezza;
- il livello, il tipo e la durata dell'esposizione;
- le circostanze in cui viene svolto il lavoro;
- i valori limite di esposizione;
- gli effetti delle misure preventive e protettive adottate o da adottare;
- se disponibili, le conclusioni tratte da eventuali azioni di sorveglianza sanitaria già intraprese.

L'elenco appare ripetitivo in alcuni punti, non esaustivo e confuso. Si segnala ad esempio che tra i primi elementi da tener presente nell'analisi preliminare deve essere considerata la conoscenza degli effetti tossicologici e la reattività della sostanza a prescindere dalla scheda di sicurezza (sostanze naturali, materiali per l'edilizia, prodotti intermedi, possono esserne ad esempio sprovvisi). Inoltre delle parti metodologicamente relati-

ve alla valutazione dei rischi sono contenute in altri articoli del testo normativo: ad esempio le modalità di aggiornamento sono contenute nell'art. 60-sexies comma 2; tra l'altro in quel comma viene fatto riferimento ad un elenco di norme (tra cui la UNI EN 689 "Valutazione dell'esposizione per inalazione a composti chimici ai fini del confronto con i valori limite e strategia di misurazione") che tuttavia riguardano tutte metodologie per la valutazione delle esposizioni degli addetti esclusivamente per inalazione.

È evidente che una buona analisi di rischio deve essere condotta da un gruppo di esperti in cui siano presenti tutte le competenze tecniche, igienistiche e mediche e che adottino una metodologia in grado di individuare gli agenti di rischio presenti e valutarne la pericolosità in relazione a tutte le vie di penetrazione. Essa si compone essenzialmente di un'analisi e di una valutazione iniziale basate su metodi non quantitativi, e su analisi di dettaglio basate su misure effettuate sul campo.

I metodi di analisi preliminare possono essere di diverso tipo: ogni analista o gruppo adotta metodologie che ritiene più adeguate alla situazione da esaminare; tra questi metodi sono spesso utilizzati quelli ad indice (più o meno complessi). Bisogna ricordare che tali metodi non devono mai essere utilizzati in modo meccanico e che i risultati non costituiscono una chiara delimitazione tra le situazioni di rischio e di sicurezza. Ogni decisione è frutto dell'esperienza del valutatore che se ne assume le responsabilità.

L'esito dell'analisi iniziale può presentare margini di incertezza, ed in questo caso è necessaria una verifica sul campo prima di iniziare una vera e propria valutazione che preveda delle misure. La verifica può riguardare sia l'effettiva presenza di un agente di rischio, sia l'evidenziazione di agenti di rischio non immediatamente ipotizzabili, sia le ipotesi di generazione propagazione e contatto. È inoltre fondamentale far sempre riferimento ai dati storici sui livelli di esposizione (se disponibili) e sugli eventi verificatisi relativi ad infortuni e malattie professionali.

Nella norma non viene data alcuna indicazione metodologica e/o tecnica su come si arriva alla decisione della "giustificazione che la natura e l'entità dei rischi connessi con gli agenti chimici pericolosi rendono non necessaria un'ulteriore valutazione maggiormente dettagliata dei rischi", né tantomeno su come si definisce il rischio moderato (ferma restando l'estrema ambiguità del termine utilizzato). Ma su quest'ultimo aspetto sarà fatta nel prosieguo una trattazione specifica.

### La sorveglianza sanitaria

Altri punti negativi che si vuole sottolineare sono il declassamento della sorveglianza sanitaria da misura generale (art. 3 lettera l del D.Lgs 626/94) a misura specifica di tutela (art. 60-sexies comma 1 lettera d del D.Lgs 25/02), la questione del rapporto della sorveglianza sanitaria con il monitoraggio biologico che è subordinato ad essa in relazione al non fedele recepimento della Direttiva comunitaria (l'art. 10 della 98/24/CE diceva che "Nel caso in cui sia stato fissato un valore limite biologico obbligatorio ... la sorveglianza sanitaria è una prescrizione obbligatoria per il lavoratore con l'agente in questione..."), ed ancora del rapporto con la valutazione del rischio e con i limiti (cosiddetto "rischio moderato" compreso).

Il non chiarimento di questi aspetti, oltre a mettere in conflitto quanto previsto dal decreto con quanto fissato in precedenti leggi e norme (secondo l'art. 35 del DPR 303/56 non abrogato la sorveglianza sanitaria non viene effettuata solo se il rischio è irrilevante), renderà non agevole mettere in pratica i contenuti della sorveglianza sanitaria e del monitoraggio biologico per gli esposti a rischio chimico, e soprattutto farlo rispettando i principi su cui si fonda la moderna medicina del lavoro e il monitoraggio degli eventi sentinella anche in riferimento alla definizione dei valori limite.

### Rapporto tra valutazione del rischio e sorveglianza sanitaria

Anche se richiamato in alcuni passaggi, non è poi sistematizzata la relazione tra valutazione del rischio e sorveglianza sanitaria. La valutazione del rischio può concludersi con la dimostrazione dell'assenza di rischi per la salute dei lavoratori: in questo caso fino a modifiche di materiali, ambienti, cicli di lavoro, teoricamente non è richiesto altro. In genere però la valutazione del rischio non si conclude mai con la dimostrazione di rischio zero ma di rischio (residuo) giudicato accettabile. In questo caso la sorveglianza sanitaria, pur programmata con periodicità anche allungata, diventa un elemento essenziale della stessa valutazione del rischio, confermandone i risultati o evidenziando la necessità di una sua revisione.

Ma quale figura, se non quella del medico del lavoro-competente, è in grado di definire, al termine del processo di valutazione, se la situazione riscontrata rientra nella prima o nella seconda ipotesi di lavoro?

D'altra parte l'obbligo di valutazione esiste per tutti i potenziali rischi e per tutti i livelli dei singoli rischi, non solo per quelli che per legge richiedono l'obbligo della sorveglianza sanitaria. Di qui emerge l'utilità della presenza del medico del lavoro-competente nel processo di valutazione dei rischi, a prescindere dalla obbligatorietà o meno della successiva esecuzione di visite mediche (5). Il medico del lavoro non può infatti essere escluso da tale processo, anzi è l'unica figura tecnica che può avere competenza nella valutazione comparata delle differenti vie di assorbimento e delle cautele da porre in atto e nell'indirizzare verso la decisione della non necessità di esecuzione della sorveglianza sanitaria.

È questo forse il punto di maggiore contraddizione del nuovo decreto. Esso infatti può comportare una diminuzione di tutela per i lavoratori non certo per la eliminazione di una sorveglianza sanitaria ex DPR 303/56, che in quanto fondata sulla presunzione del rischio, era spesso immotivata, almeno relativamente alla periodicità. La minor tutela potrà derivare infatti da una non corretta valutazione dei rischi, non avendone valutate correttamente le diverse fasi-componenti, o per l'esclusione dalla sorveglianza di gruppi particolari di lavoratori, a partire dai soggetti ipersuscettibili.

La sorveglianza sanitaria dovrà essere effettuata sia periodicamente che, soprattutto, in sede preventiva, sulla base della dimostrata gravità degli effetti prevedibili e della probabilità di accadimento degli stessi. Oltre ad essere avviata laddove lo preveda la norma, in un futuro che si spera prossimo, dovrà essere attivata laddove se ne ravveda la necessità. Si potrebbero infatti avere situazioni lavorative di per sé non a rischio, ma che lo possono essere per singoli soggetti in rapporto a loro specifiche caratteristiche individuali.

Nella sorveglianza sanitaria numero e tipo degli accertamenti clinici, strumentali e di monitoraggio biologico, devono essere definiti sulla base della natura ed entità dei rischi individuati, mentre la periodicità degli accertamenti dovrebbe essere fissata sulla base dell'entità dei rischi e delle caratteristiche delle popolazioni sotto controllo.

Come visto, la sorveglianza sanitaria trae la sua motivazione e la sua esatta definizione dalle procedure dell'accertamento del rischio, ma quando ben condotta può essa stessa diventare una fonte di informazioni di primaria importanza per il processo dinamico di valutazione del rischio. Infatti, l'evidenza di effetti quantificabili nel corso della sorveglianza sanitaria (ed eventualmente di dati di monitoraggio biologico che dimostrano l'esistenza di una esposizione) indurrà necessariamente una revisione delle procedure di accertamento del rischio ed eventualmente un rafforzamento dei controlli sanitari.

Tutto ciò però rischia di essere vanificato se, attraverso una troppa permissiva definizione di "rischio moderato", si escluderanno dall'obbligo della sorveglianza sanitaria larghe fasce di lavoratori esposti a rischio chimico: ciò tra l'altro si ripercuoterebbe negativamente non solo sui lavoratori, che vedrebbero ridotti i livelli di tutela preventiva previsti dalla precedente legislazione, ma anche sugli stessi datori di lavoro per i quali potrebbero aumentare i contenziosi civili e penali in caso di insorgenza di patologie in carenza di documentata dimostrazione relativa all'esposizione a rischio dei singoli lavoratori.

Ben diverso era quanto riportato nell'articolo 35 del DPR 303/56 (peraltro non abrogato), ove si prevedeva che "il datore di lavoro può essere autorizzato dall'Ispettorato del lavoro a far eseguire le visite mediche periodiche a intervalli più lunghi di quelli prescritti nella tabella allegata, ma non superiori al doppio del periodo indicato, quando i provvedimenti adottati nell'azienda siano tali da diminuire notevolmente i pericoli igienici della lavorazione. L'Ispettorato del Lavoro può altresì esentare il datore di lavoro dall'obbligo delle visite mediche qualora per l'esiguità del materiale o dell'agente nocivo trattato e per l'efficacia delle misure preventive adottate ovvero per il carattere occasionale del lavoro insalubre, possa fondatamente ritenere irrilevante il rischio per la salute dei lavoratori". Il DPR 303/56 era stato più chiaro nei termini (esiguità, efficacia, irrilevante) e più circoscritto nell'ambito di esenzione (esclusa la sola sorveglianza sanitaria periodica e quindi necessaria la preventiva e necessarie le altre misure di tutela).

#### Minor tutela per gli esposti a piombo

Un esempio di cosa potrà accadere anche nella sorveglianza sanitaria se non si chiariranno i concetti relativi alla definizione di rischio moderato e di altri riferimenti come i limiti di esposizione si evince da quanto previsto per il piombo. Nell'allegato VIII-quater del decreto, si dice che "la sorveglianza sanitaria si effettua quando l'esposizione a una concentrazione di piombo nell'aria, espressa come media ponderata nel tempo calcola-

ta su 40 ore alla settimana, è superiore a 0,075 mg/m<sup>3</sup>; nei singoli lavoratori è riscontrato un contenuto di piombo nel sangue superiore a 40 µg/100 ml di sangue". Si tratta come si vede della non applicazione di 2 dei 4 articoli del citato articolo 60 quinquies. Si riprende testualmente la Direttiva 98/24, che precisava proprio che "la sorveglianza sanitaria interviene quando: l'esposizione ad una concentrazione di Pb nell'aria, espressa come media ponderata nel tempo calcolata su 40 ore alla settimana, è superiore a 0.075 mg/m<sup>3</sup>, oppure quando nei singoli lavoratori è riscontrato un valore di Pb nel sangue superiore a 40 µg/Pb/100 ml di sangue".

Va ricordato che nell'abrogato D.Lgs 277/91 a livelli di Pb di 40 µg/m<sup>3</sup> nell'aria e 35 µg/dl nel sangue non corrispondeva solo l'attivazione della sorveglianza sanitaria (art. 15), ma anche obblighi informativi (art. 12 commi 2, 3), misure tecniche organizzative (art. 13), misure igieniche (art. 14, comma 2), controlli dell'esposizione (art. 17), registrazione delle esposizioni (art. 21). Pertanto, si poteva più fondatamente parlare di "action level".

Si deve quindi osservare che con il D.Lgs 25/02 sono stati definiti, per l'obbligo della sorveglianza sanitaria e di una serie di misure di prevenzione per gli esposti a piombo, dei limiti più permissivi rispetto a quelli già in vigore con il D.Lgs 277/91. E ciò appare ancora più immotivato se consideriamo che l'ACGIH (6) ha adottato già da qualche anno dei valori limite per il piombo molto più restrittivi (TLV= 0.050 mg/m<sup>3</sup> di Pb in aria; BEI= 30 µg/100 ml di Pb nel sangue). Siamo cioè nella situazione che i nostri "action level" sono superiori rispetto ai valori limite americani o, in altre parole, che noi definiamo come rischio moderato una situazione in cui per gli americani sono superati i valori limite. Se vi possono essere infatti motivazioni socio-economiche e politiche che portano alla fissazione di valori limite di soglia più alti di quelli che possono essere definiti su base tossicologica, non c'è nessuna giustificazione nell'adottare degli "action level" così elevati che non permettono di tenere sotto controllo i lavoratori e di poter graduare al meglio le misure di prevenzione collettive ed individuali da adottare.

Un'altra modifica sostanziale è rappresentata dalla scomparsa (giusta), dall'allegato VIII quater, dei valori limite per ALA-U e ZPP. Non viene però recuperato l'uso, come raccomandazione, di indicatori biologici in base all'allegato 2 della Direttiva 98/24/CE di cui il D.Lgs 25/02 dovrebbe rappresentare il recepimento. Nel capo 1.3 dell'allegato 2 la Direttiva 98/24/CE riporta infatti che "gli orientamenti pratici per il monitoraggio biologico e la sorveglianza sanitaria sono definiti a norma dell'art. 12, paragrafo 2. Essi includono raccomandazioni di indicatori biologici (ad esempio ALA-U, ZPP, ALA-D) e strategie di monitoraggio biologico". Il non recepimento di questa fondamentale parte dell'allegato può costituire infrazione delle norme comunitarie e potrebbe dar luogo a ricorsi alla Corte Europea.

#### Gli aspetti documentali della sorveglianza sanitaria

Un commento specifico meritano gli aspetti documentali della sorveglianza sanitaria. Suscita non poche perplessità l'obbligo dell'invio delle cartelle sanitarie e di rischio all'ISPESL alla cessazione del rapporto di lavoro, in quanto tale clausola sembra inserita per fini destituiti di qualsiasi base scientifica ed epidemiologica.

Sarebbe invece opportuno che tale documentazione venisse conservata presso le aziende per il tempo previsto dalla normativa vigente; una copia dovrebbe essere consegnata al lavoratore stesso, sia per eventuali opportunità di continuazione della sorveglianza sanitaria negli ex esposti che per facilitarne la prosecuzione presso altre ditte. In caso di cessazione dell'attività dell'azienda, tutto il materiale potrebbe essere inviato ai servizi di vigilanza competenti per territorio.

#### Il monitoraggio biologico

Il monitoraggio biologico è visto, in modo riduttivo, come parte della sorveglianza sanitaria e non come elemento essenziale anche della valutazione del rischio, e ciò, come già detto, in modo difforme rispetto a quanto previsto dalla Direttiva Comunitaria. Il fatto che "i risultati del monitoraggio biologico, in forma anonima, vengano allegati al documento di valutazione del rischio e comunicati ai rappresentanti per la sicurezza dei lavoratori" non modifica il segnale chiaro di pratica ancillare rispetto alle altre nella valutazione del rischio. Vi è inoltre il richiamo ai soli agenti chimici che abbiano un limite fissato, il che ne riduce grandemente l'applicazione nel breve e medio periodo. Sarebbe stato meglio, anche in questo caso, fare riferimento alle elaborazioni al riguardo delle Società Scientifiche di settore (7).

È prevalsa ancora una impostazione che continua a ritenere il monitoraggio biologico del tutto complementare di quello ambientale, anche

se esso per un sempre maggior numero di elementi e composti chimici è in grado di fornire informazioni più attendibili dello stesso monitoraggio ambientale per una più esatta definizione dell'esposizione. Non vengono in pratica recepiti i progressi degli ultimi anni, soprattutto relativamente al monitoraggio biologico di sostanze non volatili ed assorbite prevalentemente per via percutanea, come numerosi pesticidi, l'acrilamide, le ammine aromatiche, nonché attraverso gli indicatori di effetto nella quantificazione del rischio vero e proprio nella sua fase precoce-reversibile associato con l'esposizione ad agenti chimici.

Inoltre, mentre da un lato si riconosce l'importanza del monitoraggio biologico che viene indicato come "obbligatorio per i lavoratori esposti agli agenti" chimici (seppur con la limitazione per gli agenti per i quali è stato fissato un valore limite biologico), dall'altro si rischia di perdere completamente l'opportunità di un suo corretto utilizzo in quanto strettamente aganciato alla pratica della sorveglianza sanitaria, e quindi a quelle situazioni nelle quali il rischio verrà considerato superiore a quello "moderato". Il ricorso al monitoraggio biologico sarebbe invece particolarmente utile proprio per il controllo di soggetti esposti a basso rischio, con la possibilità di documentare e controllare nel tempo i livelli di esposizione e di confrontarli con i valori di riferimento della popolazione generale (8).

Il monitoraggio biologico rappresenta uno strumento fondamentale di cui il medico del lavoro-competente dispone per attuare correttamente il programma di sorveglianza sanitaria, in quanto ormai consolidati studi hanno confermato la validità ed efficacia di questa procedura come strumento di prevenzione (9). Deve essere naturalmente utilizzato con la necessaria competenza professionale, poiché la sua programmazione e l'interpretazione e gestione dei risultati richiedono conoscenze di tossicocinetica e tossicodinamica che possono essere acquisite solo attraverso una formazione specifica, che è tipica del medico del lavoro.

## La definizione di rischio moderato

### Premessa

Il dibattito maggiore si è sviluppato attorno al significato del cosiddetto "rischio moderato", un nuovo concetto introdotto dal D.Lgs 25/02. I dubbi interpretativi riguardano non solamente la correttezza e legittimità del termine "moderato" usato nella traduzione italiana, in quanto tale termine si discosta significativamente da quelli adottati nelle altre lingue dell'Unione Europea (che invece corrispondono sostanzialmente tutte al termine "slight" usato dalla versione in inglese), ma anche i criteri per una sua corretta definizione.

Il significato autentico da attribuire al termine "slight" (erroneamente tradotto in "moderato" in italiano) si può ricavare dalla versione originaria della direttiva 98/24/CE, che all'Art. 5, comma 4 dice: "*Se i risultati della valutazione dei rischi a norma dell'art. 4, paragrafo 1 dimostrano che, in relazione alle quantità di un agente chimico pericoloso presenti sul luogo di lavoro, per la sicurezza e la salute dei lavoratori vi è solo un rischio moderato e che le misure adottate a norma dei paragrafi 1 e 2 (misure di prevenzione, n.d.a.) del presente articolo sono sufficienti a ridurre il rischio, non si applicano le disposizioni degli articoli...*". In pratica, la direttiva originaria sancisce che qualora la quantità di un agente chimico sia esigua (praticamente pari a zero), il rischio è irrilevante e quindi la sorveglianza sanitaria e le altre prescrizioni non sono necessarie, a prescindere dal tipo di sostanza e dalle modalità di esposizione.

Il D.Lgs. 25/02 ha sostanzialmente modificato il contenuto della direttiva 98/24/CE, nella parte in cui dice: "*Se i risultati della valutazione dei rischi dimostrano che, in relazione al tipo e alle quantità di un agente chimico pericoloso e alle modalità e frequenza di esposizione a tale agente presente sul luogo di lavoro, vi è solo un rischio moderato per la sicurezza e la salute dei lavoratori e che le misure di cui al comma 1 sono sufficienti a ridurre il rischio, non si applicano le disposizioni degli articoli...*". Il legislatore cioè, nel tentativo di precisare e, verosimilmente, migliorare i criteri generali cui condizionare un giudizio di rischio moderato ha introdotto, rispetto alla direttiva originale, alcuni concetti importanti (tipo di agente chimico, modalità e frequenza di esposizione) che rendono più articolata e completa la valutazione del rischio. Nel D.Lgs. 25/02 infatti la definizione quantitativa di rischio moderato (anche prescindendo dalle peraltro importanti e doverose valutazioni di ordine semantico) non può ridursi alla stima della sola esposizione (dose o concentrazione), ma deve tener conto anche di altre variabili. Tale approccio, pur condivisibile sul piano scientifico e metodologico, appare peraltro viepiù in contrasto

con l'uso del termine "moderato", come se si fosse voluto, a fronte di una migliore definizione qualitativa della valutazione del rischio, innalzarne la soglia quantitativa di accettabilità senza sorveglianza sanitaria, ciò che presumibilmente non era nelle intenzioni del legislatore.

Le incertezze sui contenuti riguardano l'interpretazione e le modalità di applicazione del concetto di rischio moderato, la cui definizione viene demandata a successivi decreti dei Ministri del Lavoro e delle Politiche Sociali e della Salute. L'importanza di un'interpretazione chiara ed univoca del "rischio moderato" appare particolarmente evidente in relazione alle misure di tutela (tra cui la sorveglianza sanitaria dei lavoratori esposti) che possono/debbono essere omesse in presenza appunto di rischio moderato. Ne deriva quindi la necessità di stabilire anzitutto i criteri con cui tale livello di rischio, al di sotto del quale le misure di tutela di cui sopra non sono necessarie, debba essere calcolato.

Da un punto di vista pratico la questione può essere ricondotta alla seguente domanda: "Quando la sorveglianza sanitaria e le altre azioni ad essa collegate (in particolare il monitoraggio biologico) possono essere trascurate senza che questo possa costituire pregiudizio alla tutela della salute e sicurezza dei lavoratori?"

Il presente contributo si prefigge di esaminare vari approcci e documenti interpretativi, incluso quello prodotto recentemente dal Comitato Consultivo ad hoc istituito dal Ministero del Lavoro e delle Politiche Sociali reso disponibile in rete (10), con l'obiettivo di arrivare ad una determinazione del rischio moderato che sia non solo rispettosa delle norme, ma anche scientificamente corretta ed eticamente sostenibile.

### Come interpretare il termine moderato

Non appare chiaro il parere espresso dal Comitato di cui sopra circa l'interpretazione del termine "moderato" quando argomenta: "*Se non può essere ridotto il livello di protezione per i lavoratori con l'introduzione della direttiva 98/24 CE appare logico associare il rischio moderato alla dizione «rischio irrilevante per la salute». Da queste considerazioni può essere ritenuto ragionevole definire il rischio moderato previsto dal D.Lgs 25/02 come una soglia al di sotto della quale il rischio è basso*". Da ciò parrebbe che il Comitato Consultivo avesse voluto attribuire lo stesso significato al "rischio irrilevante per la salute" ed al "rischio basso". Tale assimilazione appare tuttavia non condivisibile, non solo dal punto di vista semantico, ma anche da quello tossicologico e delle implicazioni etiche. In termini sia semantici che tossicologici, "irrilevante" e "basso" sono indicativi di valori manifestamente diversi: irrilevante significa letteralmente "non rilevante", "non rilevabile", "non misurabile", in pratica zero, sia come misura che come rilevanza tossicologica. "Basso" significa invece "non alto", ed indica quindi un valore misurabile che richiede una valutazione, sia numerica che tossicologica, più approfondita. Ma è soprattutto dal punto di vista etico che i due termini appaiono essere diversi ed anzi, per certi versi, addirittura opposti. "Irrilevante per la salute" implica una condizione tranquillizzante, di assenza di rischio, che non richiede pertanto ulteriori interventi né responsabilità; diverso appare il discorso per il termine "basso", per il quale si rendono necessarie invece ulteriori valutazioni di merito.

In sostanza nella prima ipotesi si è a livello della "giustificazione" prevista dal D.Lgs 25/02, e cioè siamo in una situazione nella quale si può essere d'accordo per la non necessità della sorveglianza sanitaria (e del monitoraggio biologico) né di specifiche misure di prevenzione e protezione. Nell'ipotesi di un rischio basso e/o moderato, è evidente che una certa quota di rischio comunque è presente, e quindi che lo stesso deve essere tenuto sotto controllo, anche attraverso la sorveglianza sanitaria ed il monitoraggio biologico, al fine di garantire la salvaguardia dei soggetti ipersuscettibili.

Per quanto detto sopra, non si vede pertanto come e perché un rischio considerato "irrilevante per la salute" possa essere definito "basso".

### Rischio moderato e sorveglianza sanitaria

La sorveglianza sanitaria deve essere considerata, come peraltro previsto dall'art. 3, lettera l) del D.Lgs 626/94, una misura *generale* di tutela, e non una misura *specifica* di tutela (e quindi da effettuare solo in presenza di un superamento del livello di rischio moderato), come discusibilmente previsto all'art. 60-sexies comma 1, lettera d) del D.Lgs 25/02. Tale ipotesi appare supportata dal principio consolidato che una norma successiva non possa/debba essere meno protettiva e/o in contrasto con quanto previsto dalla normativa preesistente. In linea con questa interpretazione appaiono infatti *sia* i recenti pareri espressi dalla Magistratura che considerano legittima la sorveglianza sanitaria anche in presenza di rischio moderato (riferendosi all'art. 3, comma 1 della 626/94), *sia* il pa-

rere espresso nel recentissimo documento del Comitato Consultivo di cui sopra. In tale documento si chiarisce infatti che "l'istituzione del Titolo VII-bis del D.Lgs 626/94 non può provocare un'attenuazione delle attuali norme sulla protezione del lavoratore durante il lavoro, né essere in contrasto con quanto disposto dalla Normativa previgente in materia di salute e di sicurezza negli ambienti di lavoro".

L'assunto che la sorveglianza sanitaria debba essere considerata una misura generale di tutela è motivato, in termini di principio, dal fatto che essa ha lo scopo di salvaguardare la salute di *tutti* i lavoratori fin dalle visite preventive ed in particolare quella dei soggetti ipersuscettibili, ovvero di coloro che per caratteristiche genetiche o acquisite presentino, a parità di esposizione, una minor tolleranza agli effetti tossici. La sorveglianza sanitaria ha appunto il ruolo di tutelare coloro che solo in questo modo possono essere riconosciuti e protetti da rischi non prevedibili sulla base della sola esposizione. Pertanto, è evidente che la sorveglianza sanitaria non debba essere ritenuta necessaria e, quindi, possa non essere effettuata solo quando e in quanto si sia in presenza di un rischio irrilevante per la salute, come peraltro disposto dall'art. 35 del DPR 303/56 non abrogato dal D.Lgs 25/02.

### Rischio moderato e monitoraggio biologico

Un secondo importante aspetto, ai fini di una corretta definizione del rischio moderato, che secondo il Gruppo di Lavoro non ha ricevuto la necessaria attenzione nel documento del Comitato Consultivo, è quello del monitoraggio biologico, ovvero della determinazione programmata dei possibili indicatori di esposizione, effetto e suscettibilità nei lavoratori. È noto come il ricorso al monitoraggio biologico risulti particolarmente utile proprio per il controllo di soggetti esposti a basso rischio, per la possibilità di seguire nel tempo gli indicatori biologici confrontandoli con i valori di riferimento della popolazione generale. Soprattutto gli indicatori di esposizione, più che non quelli di effetto o di suscettibilità, si prestano ad un uso pratico e routinario per la valutazione del rischio chimico e per il suo controllo ed aggiornamento nel tempo. In quest'ottica sembra interessante ipotizzare che, in particolari situazioni, un monitoraggio biologico programmato e gestito ad hoc dal medico del lavoro-competente possa, anche senza la necessità di effettuare sempre contestualmente la visita medica, non solo contribuire alla valutazione iniziale del rischio ma anche essere uno strumento permanente di "sorveglianza del rischio" (11).

### Rischio moderato, livelli di azione, valori limite

Il Comitato Consultivo non è entrato minimamente nel merito del livello di esposizione per il piombo fissato dal D.Lgs 25/02 al di sotto del quale non è necessaria la sorveglianza sanitaria, e che di fatto corrisponde a quello del rischio moderato. Tra l'altro non è nemmeno chiaro in base a quali criteri il Decreto e la stessa Direttiva Comunitaria abbiano fissato tale livello a  $75 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , pari al 50% del valore limite indicato dallo stesso Decreto. Non è chiaro, cioè, in base a quali valutazioni tossicologiche e in che misura tale livello tenga conto della necessità di tutelare la salute dei lavoratori. Infatti, la definizione di rischio moderato ha la necessità per essere compresa e accettabile, come tutte le classificazioni ordinali, di una sua specificazione in termini sia qualitativi che quantitativi. Allo stesso modo ci sfuggono i criteri in base ai quali alcune associazioni imprenditoriali hanno proposto anch'esse che il livello del rischio moderato corrisponda ad un'esposizione pari al 50% del valore limite ambientale dei singoli composti.

La definizione del rischio moderato come quello corrispondente al 50% del valore limite appare tanto più discutibile in quanto assimila il concetto di rischio a quello di esposizione, che rappresenta infatti una componente importante, ma non l'unica evidentemente, della valutazione del rischio. Quest'ultimo infatti è, per generale consenso della dottrina anche internazionale, concordemente definito come la probabilità che in un dato individuo, o gruppo di individui, si verifichi un effetto avverso per la salute a seguito dell'esposizione ad un determinato agente di rischio. Tale definizione rende la stima quantitativa del rischio ( $R$ , risk) funzione delle sue tre componenti fondamentali: l'agente di rischio ( $H$ , hazard), l'esposizione o dose ( $E$ , exposure) e la suscettibilità individuale ( $S$ , susceptibility), secondo la formula:  $R = f(H, E, S)$ .

Ciò significa che una stima corretta del rischio in termini quantitativi deve includere una stima di ciascuna delle tre componenti e non può limitarsi ad una sola di esse. Questo sembrerebbe essere il significato autentico attribuibile dalla direttiva originaria al termine "slight", e cioè irrilevanza del rischio (e quindi la non necessità della sorveglianza sanitaria) sulla base della sola quantità (evidentemente particolarmente bassa) di un agente chimico pericoloso presente nell'ambiente di lavoro.

Inoltre è necessario sottolineare che una stima del rischio sulla base del solo livello di esposizione possa essere giustificata soltanto quando e in quanto gli altri due fattori siano noti. Ovvero, quando sia sufficientemente conosciuto il meccanismo d'azione dell'agente in causa e sia ragionevolmente bassa la variabilità individuale della risposta ai suoi effetti tossici: due condizioni che purtroppo raramente si verificano. Una terza condizione, anch'essa difficilmente dimostrabile, è che l'effetto dipenda da una sola sostanza e che si possano escludere interazioni tossicologiche, di potenziamento o sinergismo, con altri composti. In questo caso è ragionevole assumere che il rischio dipenda (quasi) esclusivamente dalla dose ed è quindi scientificamente ed eticamente accettabile che la sua stima corrisponda al livello di esposizione misurato. Fatta questa premessa, che si ritiene irrinunciabile, sui criteri qualitativi della definizione di rischio moderato, resta da considerare come tale rischio possa essere calcolato quantitativamente.

La soluzione implicitamente suggerita dal D.Lgs. 25/02 alla definizione di rischio moderato per il piombo prevede l'adozione di un livello pari al 50% del limite di esposizione. Tale approccio richiama quello del "livello di azione" (peraltro già introdotto in Italia con il D.Lgs 277/91) analogamente a quanto fatto negli anni '70 dal National Institute Occupational Safety Health (NIOSH), che si proponeva di fissare criteri per la valutazione della conformità ai limiti ambientali. Tali criteri sono stati messi a punto anche attraverso un affinamento delle strategie di monitoraggio ambientale (una stima dell'esposizione inferiore indicherebbe un rischio accettabile ed una superiore un probabile non accettabile) e derivavano da alcune osservazioni sulla natura e sulla variabilità degli inquinanti in ambienti di lavoro.

Come noto, un inquinante ha una variabilità spazio-temporale che porta la sua concentrazione ad assumere valori distribuiti in modo log-normale, cioè ad assumere valori compresi tra 0 e valori molto elevati (fino a  $+\infty$ ), seppure questi ultimi con probabilità molto bassa (o praticamente nulla). Non vi è quindi, da un punto di vista della probabilità, un valore limite che non possa essere superato.

Il problema deve conseguentemente essere posto nei seguenti termini: qual è il valore che garantisce con una ragionevole certezza (limite di fiducia) che non più di una certa percentuale delle possibili esposizioni eccedano il valore limite?

Il NIOSH, sulla base della stima della variabilità media delle misure effettuate nelle industrie statunitensi ha definito che il 50% del limite garantisce (con un livello di fiducia del 95%) che nelle aziende con una variabilità (descritta in termini di deviazione standard geometrica - GSD) pari a 1.22 non più del 5% delle esposizioni supererà il valore limite (cosa che appare chiaramente osservando la figura 1).

Sempre dalla osservazione della figura 1 appare chiaro come al variare della GSD la percentuale del limite che deve essere rispettata in media, per garantire le stesse condizioni di probabilità, può variare sensibilmente.

Chiunque abbia esperienza di misure effettuate in ambienti di lavoro in Italia sa che i valori di GSD in alcuni settori sono decisamente superiori al valore di 1.22. Conseguentemente non sembra adatta una definizione di rischio moderato che tenga conto solo della percentuale del limite, ma sarà necessario tenere conto anche della variabilità ambientale. A tale proposito potrebbero essere seguite due strade: uno studio di set-

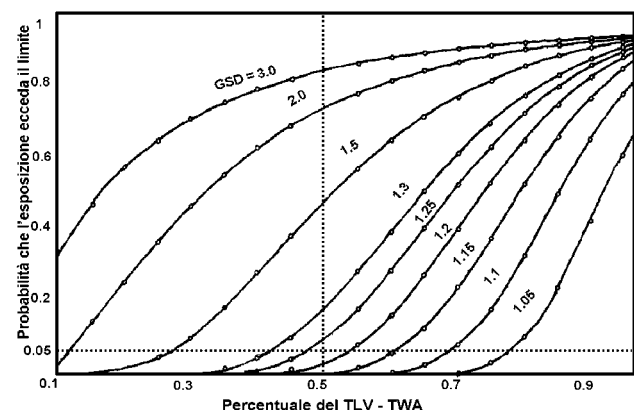


Figura 1. Probabilità di superamento del valore limite in funzione della variabilità media delle misure (GSD) e della frazione di TLV-TWA considerata

tore per definire, analogamente a quanto fatto dal NIOSH, la variabilità in termini di GSD; oppure effettuare, sui dati ambientali rilevati azienda per azienda, un test basato sui limiti di tolleranza come, ad esempio, il test OTL proposto dalla strategia AIDII (12). È senz'altro interessante anche considerare le osservazioni avanzate da Nano et al. (13) circa la valutazione congiunta di una quota del valore limite e della variabilità delle misure anche alla luce della norma UNI EN 689/97.

In ogni caso il significato più importante di tali rilievi resta quello di evidenziare la corretta conduzione tecnica degli impianti ed integrare tale valutazione con una di natura medica, non potendo la sola misurazione degli inquinanti aerodispersi tenere conto di tutte le possibili vie di penetrazione e del fatto che il limite viene definito per la persona media e non per tutti i lavoratori (tra cui ad esempio quelli ipersuscettibili). In particolare si deve sottolineare che per non ridurre i livelli di prevenzione in ambiente di lavoro, sia nella fase di valutazione che in quella di gestione del rischio moderato, è necessario non scindere il binomio tecnico creato dal D.Lgs 626/94, costituito dal Responsabile del Servizio di Prevenzione e Protezione e dal Medico Competente, che con l'ausilio dei Responsabili dei Lavoratori per la Sicurezza hanno il compito di mettere in atto le norme di tutela in tema di rischi per la salute e la sicurezza.

Sulla base delle considerazioni soprariportate non appare proprio condivisibile la proposta avanzata dal Comitato Consultivo di definire il rischio moderato in base al solo uso dei valori limite occupazionali, soprattutto considerando che tutti questi sono definiti per via inalatoria.

Si sottolinea al riguardo che si dovrebbe definire a quale tipo di limite ci si riferisce, ricordando che la direttiva 91/322/CEE riporta un primo elenco di 24 sostanze e la direttiva 96/94/CEE, in applicazione della direttiva 80/1107/CEE, riporta un elenco di 23 sostanze. Questa direttiva, peraltro, sarebbe stata abrogata (ai sensi dell'art. 13 della direttiva 94/24/CE di cui il D.Lgs 25/02 è l'attuazione) alla data di cui all'art. 14, ovvero il 5 maggio 2001. Infine, la direttiva 2000/39/CE riporta un elenco di 63 sostanze per le quali sono stati fissati i valori limite indicativi di esposizione professionale sia per quanto riguarda l'esposizione di 8 ore giornaliere sia per quanto riguarda l'esposizione a breve termine di 15 minuti.

Si prevede che siano altresì stabiliti i valori limite nazionali anche tenuto conto dei valori limite indicativi predisposti dal Comitato Consultivo medesimo e sono aggiornati gli allegati VIII-ter, quater, quinquies e sexies in funzione del progresso tecnico, dell'evoluzione di normative e specifiche comunitarie o internazionali e delle conoscenze nel settore degli agenti chimici pericolosi.

#### Uso di algoritmi

Altrettanto criticabile appare l'uso di algoritmi, meglio sarebbe chiamarli classificazioni basate su indici, già proposte precedentemente (4) ed adottate dal Comitato Consultivo per ovviare alle difficoltà connesse con l'effettuazione di costose e complesse indagini di igiene industriale ritenute troppo gravose per le piccole e medie imprese (che peraltro rappresentano la stragrande maggioranza dell'apparato produttivo nel nostro paese). Tali metodiche sono intese come un percorso di "facilitazione" atto a consentire la classificazione del rischio al di sopra o al di sotto del livello di quello definito come moderato.

Tali sistemi risultano molto utili nelle fasi preliminari della valutazione del rischio (gerarchizzazione dei rischi) o in quelle situazioni nelle quali palesemente il rischio è poco rilevante. Deve essere anche sottolineata la scarsa scientificità e l'astrazione del loro uso, soprattutto in assenza di un qualsiasi riscontro o verifica con dati oggettivi di monitoraggio ambientale e/o biologico. Non può inoltre sfuggire l'estrema pericolosità dell'uso di tali strumenti da parte di tecnici e/o soggetti non sufficientemente esperti.

#### Commenti specifici al documento del Comitato Consultivo (10)

- 1) Affermazioni come quella che il D.Lgs 25/02 non può essere in contrasto con parte di norme previgenti sono sicuramente apprezzabili: andrebbe però chiarito come la logica dei limiti su cui si fonda il D.Lgs 25/02 si combina con la logica di riduzione al minimo del rischio (art. 3 D.Lgs 626/94). Solo limiti tecnici (e quindi non TLV o OEL della Unione Europea) sembra possano convivere con la logica del D.Lgs 626/94.
- 2) Viene introdotto per la prima volta il concetto che quando il processo valutativo indichi il non superamento della "soglia di rischio moderato", il datore di lavoro è "sollevato dall'applicazione di specifiche misure di tutela quali: la sorveglianza sanitaria e di rischio". Ciò è la sorveglianza del rischio è indicata, difformemente da quanto previsto dalla norma, come misura specifica di tutela. Inoltre "rischio moderato"

viene definito come soglia, concetto indubbiamente da chiarire rispetto ai parametri abituali.

- 3) Nei capoversi relativi alla "valutazione non necessaria" andrebbe precisato che gli elementi che permettono di arrivare a detta conclusione devono essere formalizzati in uno specifico documento/dichiarazione in cui siano chiaramente riportate le informazioni su natura, quantità, modalità di uso, avvalorate da esperti e che non vi sono nei lavoratori evidenti condizioni di maggiore suscettibilità (razza, sesso, età, ecc.). Se la dichiarazione di esistenza di non necessità di ulteriore valutazione è fondata e verificabile, va chiarito che gli "opportuni provvedimenti" non sono altro che quelli che garantiscono il permanere delle condizioni che hanno dato luogo alla conclusione di non necessità.
- 4) Non appare opportuno inserire in un atto che ha la finalità di chiarire il termine "rischio moderato" anche aspetti di metodo che dovrebbero essere lasciati ai principi che regolamentano le specifiche discipline. Se si decide di inserirli, vanno attentamente discussi alla luce delle posizioni tecnico-scientifiche oggi correntemente accettate, senza intrusioni opportunistiche come l'uso degli "algoritmi" che non risulta come tale previsto in nessun modello di valutazione del rischio.
- 5) A proposito dell'esposizione cutanea esistono metodi validati per la sua misura (vedi anche, ad esempio, il monitoraggio biologico). Al riguardo si introduce la distinzione tra "basso" e "molto basso", che ingenera confusione e non si sa perché debba valere solo per la valutazione dell'esposizione per via cutanea. Si introduce inoltre l'aggancio del concetto di rischio moderato alle tecniche analitiche, concetto quest'ultimo fondamentale ma da trattare in ben altro modo.
- 6) Resta aperto il problema della valutazione dei rischi per la sicurezza.

#### Bibliografia

- 1) Apostoli P, Bartolucci GB, Imbriani M, Mutti A, Ambrosi L. Usque tandem? Riflessioni sul Decreto Legislativo 2 febbraio 2002 n. 25. G Ital Med Lav Erg 2002; 24, 99-111.
- 2) Manno M, Mutti A, Apostoli P, Bartolucci GB, Franchini I. Occupational medicine at stake in Italy. Lancet 2002; 359, 1865.
- 3) Apostoli P, Alessio L. Il Decreto Legislativo 25/2002 garantisce ancora la tutela della salute dei lavoratori esposti a piombo? G Ital Med Lav Erg 2002; 24, 355-360.
- 4) Coordinamento Tecnico per la Sicurezza nei luoghi di lavoro delle Regioni e delle Province Autonome. Titolo VII-bis. Decreto Legislativo N. 626/94. Protezione da agenti chimici. LINEE GUIDA. Atti del Convegno "RisCh" 2002. Prevenzione e Protezione da agenti chimici pericolosi. Le novità del D.Lgs.25/02, la valutazione e la giustificazione del rischio, il rischio moderato, le misurazioni e la sorveglianza sanitaria", Modena, 27 settembre 2002, pp. 557-593.
- 5) Apostoli P, Bartolucci GB. Il medico del lavoro nella valutazione del rischio: invitato di pietra o coprotagonista? Atti del 15° Congresso Nazionale della Associazione Italiana degli Igienisti Industriali, Assisi-S.Maria degli Angeli (PG), 13-15 giugno 1996, Le Collane della Fondazione Salvatore Maugeri - I Documenti 6, pp. 317-323.
- 6) ACGIH. 2003 TLVs and BEIs Based on the Documentation of the Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents & Biological Exposure Indices. Cincinnati, Ohio, 2003.
- 7) Abbritti G, Apostoli P, Briatico Vangosa G, Seghizzi P. Formazione continua ed accreditamento del medico del lavoro-medico competente: proposta del Consiglio Direttivo SIMLII. Folia Med, 71, 101-107, 2000.
- 8) Apostoli P, Minoia C. I valori di riferimento in medicina occupazionale e ambientale. G Ital Med Lav Erg 1999; 21, 25-39.
- 9) Mutti A. Biological monitoring in occupational and environmental toxicology. Toxicol Lett 1999; 108, 77-89.
- 10) Comitato Consultivo del Ministero del Lavoro e delle Politiche Sociali. La determinazione del rischio moderato. Giugno 2003. <http://www.medicocompetente.it>
- 11) Bartolucci GB. La sorveglianza sanitaria secondo il D.Lgs. n. 25/2002. G Ig Ind 2003; 28, 35-43.
- 12) Strategie di controllo dei fattori di rischio chimico negli ambienti di lavoro. A cura di: Nano G, Sordelli D. Guide Operative di igiene industriale, AIDII Milano, 1990, pp. 1-63.
- 13) Nano G, Sesana G, Sala C, Cottica D. La valutazione del rischio da agenti chimici: approccio storico. G Ig Ind 2003; 28, 8-14.

P. Hrelia, F. Maffei, S. Angelini, G. Cantelli-Forti

## Biomarcatori di effetto e di suscettibilità per la valutazione del rischio

Dipartimento di Farmacologia, Università degli Studi di Bologna

**RIASSUNTO.** L'inquinamento delle aree urbane costituisce un importante problema di sanità pubblica, in quanto non solo interessa tutte le fasce di popolazione che abitano nelle grandi città, ma rappresenta un ambiente di lavoro per alcune categorie professionali, quali agenti di polizia, manutentori delle strade, addetti ai trasporti. Questi particolari gruppi di popolazione possono essere esposti a concentrazioni spesso rilevanti di sostanze tossiche derivanti dai gas di scarico degli autoveicoli, dagli impianti di riscaldamento o dalle industrie, e di conseguenza sono notevolmente a rischio di patologie cronico-degenerative da inquinamento atmosferico. Gli studi di epidemiologia molecolare si basano sull'impiego di biomarcatori in grado di rilevare le alterazioni biochimiche, molecolari e cellulari che insorgono precocemente nell'organismo in seguito all'esposizione a sostanze tossiche prima della manifestazione di una patologia. In questo ambito, i biomarcatori di effetto e di suscettibilità sempre di più rivestono un ruolo di estrema importanza per la prevenzione del rischio cancerogeno associato all'inquinamento atmosferico.

**Parole chiave:** biomarcatori, biomonitoraggio, inquinamento atmosferico, rischio cancerogeno.

**ABSTRACT.** [www.gimle.fsm.it](http://www.gimle.fsm.it)

**BIOMARKERS OF EFFECT AND SUSCEPTIBILITY IN THE RISK ASSESSMENT.** *The ambient air of urban centres is polluted with potentially toxic chemicals mostly arising from the combustion or fuels used for transport, heating and industrial activities. Alongside the risk to the general public, atmospheric pollution could be considered an occupational health hazard to professional groups, such as traffic police or professional drivers working in urban areas. Molecular epidemiology can facilitate health risk assessment by investigating the relationship between exposure to environmental pollutants and quantification of biomarkers that lie on the pathway of carcinogenesis upstream of clinical disease. In particular, biomarkers of early effects and susceptibility are playing an increase role in the investigation of the impact of air pollution on human carcinogenesis.*

**Key words:** biomonitoring study, biomarkers, air pollution, cancer risk.

### Introduzione

La prevenzione degli effetti dell'esposizione a xenobiotici presenti nell'ambiente o nei luoghi di lavoro è uno dei principali obiettivi della Tossicologia, intesa proprio come scienza della prevenzione. In particolare, l'inquinamento delle aree urbane costituisce un importante problema di sanità pubblica, in quanto non solo interessa tutte le fasce di popolazione che abitano nelle grandi città, ma rappresenta un ambiente di lavoro per alcune categorie professionali, quali agenti di polizia, manutentori delle strade, addetti ai trasporti. Questi particolari gruppi di popolazione possono essere esposti a concentrazioni spesso rilevanti di sostanze chimiche derivanti dai gas di scarico degli autoveicoli, dagli impianti di riscaldamento o dalle industrie, e di conseguenza sono notevolmente a rischio di patologie cronico-degenerative associate all'inquinamento atmosferico (1).

Negli ultimi anni l'epidemiologia molecolare è stata proposta come un efficace strumento per la comprensione e la prevenzione del rischio cancerogeno associato all'esposizione a composti chimici. L'epidemiologia molecolare studia il verificarsi, di alterazioni molecolari, biochimiche e cellulari precoci, definiti biomarcatori, che si verificano prima dell'insorgere di una patologia in popolazioni esposte ad agenti tossici ambientali (2). In questo ambito, i biomarcatori di effetto rivestono un ruolo di estrema importanza, poiché sono in grado di identificare la conseguenza biologica a livello del DNA dell'azione lesiva delle sostanze tossiche, e quindi le alterazioni genetiche che contribuiscono all'induzione della carcinogenesi (3). Parallelamente, evidenze scientifiche hanno indicato che lo sviluppo del cancro dipende non solo dall'entità dell'esposizione individuale, ma anche dall'efficacia delle risposte difensive dell'organismo che possono variare notevolmente da un individuo all'altro. Di particolare interesse sono le differenze inter-individuali (suscettibilità individuale) in geni i cui prodotti intervengono nei processi di attivazione-detossificazione metabolica, o nei meccanismi di riparazione del DNA. Queste osservazioni supportano l'impiego dei biomarcatori di suscettibilità per una più corretta stima del rischio cancerogeno derivante da esposizione ad agenti tossici ambientali (4). Di conseguenza, la realizzazione di strategie d'intervento, che vedono la valutazione comparativa di biomarcatori di effetto e di suscettibilità nella stessa popolazione per la valutazione complessiva degli effetti tossici che possono essere indotti dalla molteplicità dei composti chimici presenti nell'aria delle zone urbane, costituisce attualmente uno dei più efficaci ed innovativi strumenti di prevenzione (5).

### Disegno di studio

Uno degli elementi fondamentali per la realizzazione di studi di biomonitoraggio è la selezione della popolazione. Gli studi sono condotti su un numero rappresentativo di soggetti esposti allo xenobiotico (casi) e in un gruppo di soggetti non esposti a sostanze mutagene/cancerogene (controlli), paragonabili per le caratteristiche demografiche. Inoltre, poiché fattori fisiologici e/o patologici possono interferire con le frequenze dei biomarcatori da analizzare, è importante ottenere tramite questionario o intervista, le principali informazioni anamnestiche di ogni partecipante allo studio (dieta, assunzione di farmaci, gravidanza, abitudine al fumo, consumo di bevande alcoliche e/o caffè).

L'impiego dei biomarcatori di effetto permette la valutazione del danno genetico dei soggetti in studio. Negli ultimi anni, l'analisi dei micronuclei in linfociti di sangue periferico, in prima divisione mitotica operando il blocco della citodieresi con la citocalasina B, è stata una delle tecniche più ampiamente usate (6). I micronuclei sono nuclei accessori, che possono derivare o da frammenti di cromosomici (clastogenesi) o da interi cromosomi (aneuploidia) e quindi forniscono un indice complessivo del danno cromosomico strutturale e numerico. Inoltre, questa metodica per le sue caratteristiche di rapida e semplice esecuzione risulta vantaggiosa per gli studi di biomonitoraggio di ampie popolazioni (7,8). Tra i biomarcatori di suscettibilità, oggi grande attenzione è rivolta alla analisi dei polimorfismi del gene che codifica per la proteina "Xeroderma Pigmentosus D" (XPD), che gioca un ruolo fondamentale nei processi di riparazione del DNA. Parallelamente vengono anche indagati i polimorfismi dei geni i cui prodotti sono coinvolti nei processi di attivazione/detossificazione degli xenobiotici, come il sistema "Glutazione S-transferasi" (GST).

**Tabella I. Studi di biomonitoraggio di popolazioni esposte ad inquinanti atmosferici**

Soggetti in studio	Biomarcatori	Risultato	Bibliografia
Agenti di polizia Municipale	CA, SCE	+	9
Agenti di polizia Municipale	SCE	+	10
Agenti di polizia Municipale	MN	-	11
Agenti di polizia Municipale	MN, SCE	+	12
Addetti ai trasporti	CA	+	13
Agenti di polizia Municipale	SCE	-	14
Controllori del traffico	MN	-	15
Agenti di polizia Municipale	MN	-	16

CA: aberrazioni cromosomiche; SCE: sister chromatid exchange; MN: micronuclei

## Discussione e conclusione

Dalla analisi delle evidenze disponibili in letteratura, emerge chiaramente il ruolo fondamentale dei biomarcatori di effetto e/o di suscettibilità nella valutazione del rischio mutageno/cancerogeno associato all'esposizione occupazionale ad alcune sostanze chimiche o ad agenti fisici, come le radiazioni (2,7,8.). Molto più complessa è invece l'interpretazione dei risultati derivanti dagli studi condotti sulle popolazioni esposte professionalmente ad inquinanti urbani che spesso riportano dati contrastanti (Tabella I). La concordanza o meno dei risultati ottenuti nei diversi studi di biomonitoraggio condotti in città italiane o straniere possono essere riconducibili a diversi fattori. Principalmente la composizione dell'aria urbana può essere significativamente diversa in funzione del tempo e dello spazio. Inoltre, in alcuni studi le informazioni sull'esposizione sono carenti o incomplete, e questo, in associazione alla presenza di numerosi fattori confondenti, rende la comparazione maggiormente difficoltosa. Non da ultimo, gli studi pubblicati impiegano diversi biomarcatori di effetto con sensibilità e specificità peculiari. Una corretta stima dei rischi associati agli inquinamenti atmosferici richiede quindi studi mirati all'analisi contemporaneamente di biomarcatori di esposizione, effetto e suscettibilità, in gruppi di soggetti rappresentativi delle categorie che svolgono la loro attività professionale nelle aree urbane caratterizzate da intenso inquinamento.

## Bibliografia

- 1) Katsouyann K, Pershagen G. Ambient air pollution exposure and cancer. *Cancer Causes Control* 1997; 8: 289-2901.
- 2) Perera F, Whyatt RM. Biomarkers and molecular epidemiology in mutation/cancer research. *Mutat Res* 1994; 313: 117-129.
- 3) Hagmar L, Bonassi S, Stromberg U, Brøgger A, Knudsen L, Norppa H, Reuterwall C, Forni A, Harsteen IL, Högstedt B, Huici-Montagud A, Lambert B, Mitelman F, Nordeson I, Salomaa A, Skerfving S. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res* 1998; 58: 4117-4121.
- 4) Hussian SP, Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer. *Toxicol Let.* 1998; 1002: 219-225.
- 5) Georgiadis P, Kyrtopoulos SA. Molecular epidemiological approaches to the study of the genotoxic effects of urban air pollution. *Mutat Res* 1999; 428: 91-98.
- 6) Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res*; 147: 29-36.
- 7) Fenech M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology* 2002; 181: 411-416.
- 8) Norppa H, Falck GCM. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 2003; 18: 221-233.
- 9) Anwar WA, Kamal AAM. Cytogenetic effects in a group of traffic policemen in Cairo. *Mutat Res* 1998; 208: 225-231.
- 10) Chandraseikaran R, Samy PL, Murthy PB. Increased sister chromatid exchanges (SCE) frequencies in lymphocytes from traffic policemen exposed to automobile exhaust pollution. *Hum Exp Toxicol* 1996; 15:301-304.
- 11) Bolognesi C, Merlo F, Rabboni R, Valerio F, Abbondandolo A. Cytogenetic biomonitoring in traffic police workers: micronuclei test in peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 1997; 30: 396-402.
- 12) Zhao X, Niu J, Wang Y, Yan C, Wang X, Wang J. Genotoxicity and chronic effects of automobile exhaust: a study of the traffic policemen in the city of Lanzhou. *Mutat Res* 2003; 415:185-190.
- 13) Knudsen LE, Norppa h, Gamborg MO, Nielsen PS, Okkels H, Soll-Johanning H, Raffn E, Jarventaus H, Autrup H. Chromosomal Aberrations in human induced by urban air pollution: influence of DNA repair and polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and N-acetyltransferase2. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1999; 8: 303-310.
- 14) Carere A, Andreoli C, Galati R, Leopardi P, Marcon F, Rosati MV, Rossi S, Tomei F, Verdina A, Zijno A, Crebelli R. Biomonitoring of exposure to urban air pollution: analysis of sister chromatid exchanges and DNA lesions in peripheral lymphocytes of traffic policemen. *Mutat Res* 2002; 518: 215-224.
- 15) Violante FS, Sanguinetti G, Barbieri A, Accorsi A, Mattioli S, Cesari C, Fimognari C, Hrelia P. Lack of correlation between environmental or biological indicators of benzene exposure at parts per billion levels and micronuclei induction. *Environ Res* 2003; 91: 135-142.
- 16) Leopardi P, Zijno A, Marcon F, Conti I, Carere A, Verdina A, Galati R, Tomei F, Baccolo TP, Crebelli R. Analysis of micronuclei in peripheral blood lymphocytes of traffic wardens: effects of exposure, metabolic genotypes, and inhibition of excision repair in vitro by ARA-C. *Environ Mol Mutagen* 2003; 41: 126-130.

S. Pavanello, E. Clonfero

## I fenotipi/genotipi CYP1A2, NAT2 e GSTM1 modulano l'esposizione umana ad alcuni mutageni ambientali: la nostra esperienza

Dipartimento di Medicina Ambientale e Sanità Pubblica, Sezione Medicina del Lavoro, Università degli Studi di Padova

**RIASSUNTO.** Da alcuni anni il nostro gruppo di ricerca studia l'influenza dei genotipi metabolici su due indicatori biologici di rischio genotossico (addotti BPDE-DNA e mutagenesi urinaria) in soggetti esposti a idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e ad amine aromatiche. Lo studio ha lo scopo di individuare i possibili fattori di suscettibilità genetica che possono modulare la risposta individuale a questi cancerogeni. La popolazione esaminata è stata la seguente. Esposti ad IPA: pazienti dermatologici trattati a scopo terapeutico con unguenti a base di catrame di carbone (CT), lavoratori di una cokeria e spazzacamini. Esposti ad amine aromatiche: volontari che hanno consumato un pasto a base di hamburger e fumatori. In questo studio viene presentata una rassegna dei risultati ottenuti finora.

**Parole chiave:** biomarcatori, idrocarburi policiclici aromatici, ammine aromatiche, genotipi.

**ABSTRACT.** [www.gimle.fsm.it](http://www.gimle.fsm.it)

**THE CYP1A2, NAT2 AND GSTM1 PHENO/GENOTYPES MODULATE HUMAN EXPOSURE TO SOME ENVIRONMENTAL MUTAGENS: OUR EXPERIENCE. Since some years in our research group has been studied the influence of metabolic genotypes on two biomarkers of genotoxic risk (BPDE-DNA adducts and urinary mutagenicity) in humans exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and aromatic amines. The aim was to identify possible genetic susceptible factors capable of modulating individual response to these carcinogens. Humans exposed to PAHs: dermatological patients therapeutically treated with coal tar based ointments (CT), coke oven workers and chimney sweeps. People exposed to aromatic amines will be volunteers after a meal of pan-fried hamburgers and smokers. An overview of the results we found until now will be presented.**

**Key words:** biomarkers, polycyclic aromatic hydrocarbons, aromatic amines, genotypes.

Il nostro gruppo di ricerca studia da alcuni anni la modulazione da parte di alcuni fenotipi/genotipi metabolici di due indicatori di dose interna di esposizione a composti mutageni/cancerogeni, l'attività mutagenica urinaria e l'addotto Benzo(a)pirene diolo epossido al DNA (BPDE/DNA) linfomonocitario, quest'ultima espressione della dose biologicamente efficace. Per quanto riguarda l'attività mutagenica urinaria sono state studiate le esposizioni ad idrocarburi policiclici aromatici (IPA) dei lavoratori di cokeria e dei pazienti psoriasici trattati con pomate a base di catrame di carbone, ad amine aromatiche eterocicliche (AAE) con la dieta e ai mutageni del fumo di tabacco. L'addotto BPDE/DNA linfomonocitario è stato studiato in esposizioni occupazionali ad IPA, cokeria anodi e spazzacamini.

Nei lavoratori di cokeria il 30.4% dei campioni urinari post-turno, tutti meno uno fumatori, sono risultati positivi per attività mutagenica. Il 64.3% dei soggetti con urina positiva appartenevano alla combinazione dei genotipi GSTM1 nullo e NAT2 lento acetilatore. La stessa combinazione di genotipi è stata riscontrata solo nel 29.0% ( $p < 0.05$ ) dei soggetti con urina negativa al test di Ames. I risultati suggeriscono che i lavoratori di cokeria fumatori che possiedono dei genotipi sfavorevoli alla detossificazione delle amine aromatiche (NAT2 lento) e degli IPA (GSTM1 nullo) possano avere un rischio maggiore di cancro della vescica.

L'urina di pazienti dermatologici, per lo più affetti da psoriasi, non fumatori raccolta dopo tre giorni di trattamento con pomate a base di catrame di carbone (2%) è stata saggiata per mutagenicità sui ceppi TA98 e YG1024 di Salmonella typhimurium in presenza di enzimi microsomiali. L'attività mutagenica urinaria aggiustata per l'intensità dell'esposizione ad IPA dei soggetti con il genotipo GSTM1 nullo è risultata essere doppia rispetto a quella dei soggetti GSTM1 attivo (presente l'attività detossificante glutiontransferasica di tipo  $\mu$ ) ( $136.8 \pm 34.7$  contro  $70.8 \pm 23.3$  revertenti netti/nmoli di 1-pireneolo urinario,  $p < 0.05$ ).

I polimorfismi metabolici su base genetica influenzano anche l'escrezione urinaria di mutageni dopo un pasto a base di carne ben cotta alla piastra. In volontari non fumatori appartenenti al genotipo NAT2 lento è stato dimostrato un significativo aumento rispetto ai soggetti NAT2 rapido dei livelli di attività mutagenica urinaria sul ceppo YG1024 ipersensibile alle AAE. Questo riscontro è stato più evidente nel gruppo di soggetti a più alta esposizione, cioè che avevano cotto "molto bene" la carne ( $1.00 \pm 0.29$  contro  $0.66 \pm 0.32$  escrezione totale corretta di mutageni,  $p < 0.05$ ). I soggetti con fenotipo CYP1A2 elevato metabolizzatore hanno una aumentata escrezione di mutageni dopo il pasto soprattutto se sono anche lenti acetilatori ( $2.18 \pm 1.33$  contro  $0.90 \pm 0.54$  escrezione totale corretta di mutageni,  $p < 0.05$ ). I risultati di questi due studi suggeriscono che l'escrezione di mutageni urinari derivanti da una dieta ricca in AAE è modulata dalle attività enzimatiche CYP1A2 e NAT2 dipendenti. I soggetti poveri metabolizzatori CYP1A2 e quelli NAT2 rapidi acetilatori, questi ultimi noti per essere a rischio di cancro del colon, sembrano invece essere protetti dal rischio di cancro alla vescica.

Infine la mutagenicità urinaria dei fumatori è stata da noi riscontrata essere significativamente correlata sia ai livelli di esposizione al fumo di tabacco che all'attività N-idrossilasi CYP1A2 mediata ed è significativamente più elevata negli elevati che nei poveri metabolizzatori ( $2176 \pm 1525$  contro  $1384 \pm 1206$  revertenti/moli di creatinina,  $p < 0.001$ ). I valori maggiori di attività mutagenica erano presenti nell'urina dei fumatori con la combinazione dei fenotipi CYP1A2 elevato metabolizzatore e NAT2 lento acetilatore.

**Tabella 1. Modulazione dell'esposizione umana ad agenti genotossici: l'esperienza del gruppo Padovano**

Gruppo	Numero soggetti	Esposizione a genotossine	Biomarcatore	Feno/genotipi studiati	Confronto dei feno/genotipi o loro combinazioni con aumento significativo dell'indicatore	Riferimento bibliografico	
Lavoratori cokeria	46	IPA e fumo di tabacco	Mutageni urinari TA98+S9	NAT2 GSTM1	GSTM1 nullo e NAT2 lento contro Altri genotipi	64.3% contro 29.0%	Gabbani et al., 1996
Pazienti psoriasici non fumatori	15	IPA	Mutageni urinari TA98+S9; YG1024+S9	GSTM1	GSTM1 nullo contro GSTM1 attivo	136.8±34.7 contro 70.8±23.3 revertenti netti/nmoli 1-pirenolo	Gabbani et al., 1999
Volontari non fumatori	32	AAE della dieta YG1024+S9	Mutageni urinari TA98+S9;	NAT2 GSTM1	NAT2 lento contro NAT2 rapido	1.00±0.29 contro 0.66±0.32 revertenti netti/nmoli creatinina	Gabbani et al., 1998
Volontari non fumatori	50	AAE della dieta	Mutageni urinari YG1024+S9	CYP1A2 NAT2	CYP1A2 elevato e NAT2 lento contro Altri fenotipi	2.18±1.33 contro 0.90±0.54 revertenti netti/nmoli creatinina	Pavanella et al., 2002
Fumatori	97	Fumo di tabacco	Mutageni urinari YG1024+S9	CYP1A2 NAT2 GSTM1 GSTT1	CYP1A2 elevato CYP1A2 elevato e NAT2 lenti contro CYP1A2 povero	2176±1525 2392±1660 contro 1384±120654 revertenti netti/nmoli creatinina	Pavanella et al., 2002
Lavoratori anodi, cokeria, spazzacamini	68	IPA, fumo di tabacco, dieta	Addotto BPDE/DNA linfomonocitario	GSTM1	GSTM1 nullo	>95° percentile controlli 27.9% contro 100% cokeria	Pavanella et al., 1999
Lavoratori cokeria	95	IPA, fumo di tabacco, dieta	Addotto BPDE/DNA linfomonocitario	GSTM1	GSTM1 nullo GSTM1 attivo	5.90±5.59 contro 3.25±2.01 addotti/10 <sup>8</sup> nucleotidi	Pavanella et al., 2003

Legenda: IPA, idrocarburi policiclici aromatici; AAE, amine aromatiche eterocicliche; NAT2, N-acetiltransferasi di tipo 2; GSTM1, glutationtransferasi di tipo  $\mu$ ; GSTT1, glutationtransferasi di tipo  $\theta$ ; CYP1A2, citocromo P-450 isoforma A2

I genotipi *GSTM1* e *GSTT1* sono risultati non essere in grado di influenzare l'attività mutagena urinaria nell'esposizione umana ai mutageni sia della dieta sia a quelli del fumo di tabacco.

Altri due studi in lavoratori di cokeria, anodi e spazzacamini del nostro gruppo di ricerca hanno riguardato il biomonitoraggio dell'esposizione umana ad IPA con la misura dei livelli dell'addotto BPDE/DNA della frazione linfomonocitaria delle cellule del sangue periferico. Livelli dell'addotto superiori al 95° percentile della popolazione non esposta professionalmente sono stati riscontrati più frequenti nel sottogruppo di soggetti con genotipo *GSTM1* nullo (27.9%) rispetto a quelli *GSTM1* attivo (20%), raggiungendo valori del 100% nel gruppo a più alta esposizione della cokeria ( $p<0.05$ ). Il rischio di avere elevati livelli di addotto cresce con l'aumentare della intensità dell'esposizione, ma anche con la mancanza dell'attività enzimatica detossificante *GSTM1* mediata (RR=5.94; CI=1.15-30.7;  $p<0.05$ ). I maggiori valori di questo biomarker, a parità di esposizione ad IPA, nei lavoratori con genotipo *GSTM1* nullo rispetto a quelli *GSTM1* attivo è stato confermato in un nostro più ampio recente studio su operai di una cokeria Polacca (5.90±5.59 vs 3.25±2.01 addotti / 10<sup>8</sup> nucleotidi,  $p<0.01$ ). Un gran numero di operai *GSTM1* nullo (39%) appartenevano al quartile con il più alto livello di addotti (>4.67 addotti/ 10<sup>8</sup> nucleotidi) di tutta la popolazione studiata. Un livello di addotti significativamente aumentato nei lavoratori *GSTM1* nullo rispetto a quelli con genotipo *GSTM1* attivo è stato ribadito (OR = 4.15, 95% CI 1.0-18.8,  $p<0.05$ ). Dall'analisi della regressione multipla lineare l'aumento dell'addotto BPDE/DNA linfomonocitario risulta significativamente correlato sia con i livelli di esposizione ad IPA ( $t=3.075$ ,  $p<0.001$ ) sia con la mancanza dell'attività *GSTM1* ( $t=3.442$ ,  $p<0.001$ ). I nostri risultati indicano una evidente influenza del genotipo detossificante *GSTM1* sulla formazione dell'addotto anti-BPDE/DNA linfomonocitario dei lavoratori di cokeria. Questa indicazione ci sembra importante per la prevenzione del cancro polmonare nelle esposizioni professionali ad IPA.

## Bibliografia

- Gabbani G, Hou S-M, Nardini B, Marchioro M, Lambert B, Clonfero E. *GSTM1* and *NAT2* genotypes and urinary mutagens in coke oven workers. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1677-1681.
- Gabbani G, Nardini B, Bordin A, Pavanella S, Janni L, Celotti L, Clonfero E. Urinary mutagenicity on TA98 and YG1024 *Salmonella typhimurium* strains after a hamburger meal: influence of *GSTM1* and *NAT2* genotypes. *Mutagenesis* 1998; 13: 187-191.
- Gabbani G, Pavanella S, Nardini B, Tognato O, Bordin A, Veller Fornasa C, Bezze G., Clonfero E. Influence of metabolic genotype *GSTM1* on levels of urinary mutagens in patients treated topically with coal tar. *Mutation Res* 1999; 440: 27-33.
- Pavanella S, Gabbani G, Brugnone F, Maccacaro G, Clonfero E. Influence of *GSTM1* genotypes on ANTI-BPDE-DNA adduct levels in mononuclear white blood cells of humans exposed to PAH. *Int Arch Occup Environ Health* 1999; 72: 238-246.
- Pavanella S, Simioli P, Mastrangelo G, Lupi S, Gabbani G, Gregorio P, Clonfero E. Role of metabolic polymorphisms *NAT2* and *CYP1A2* on urinary mutagenicity after a pan-fried hamburger meal. *Food Chem Toxicol* 2002; 40: 1139-44.
- Pavanella S, Simioli P, Lupi S, Gregorio P., Clonfero E. Exposure levels and *CYP1A2* activity, but not *NAT2*, *GSTM1* AND *GSTT1* influence urinary mutagen excretion in smokers. *Cancer Epidem Biomarkers Prevention* 2002; 11: 998-1003.
- Pavanella S, Sivinska E, Mielzynska D, Clonfero E. *GSTM1* null genotype as a risk factor for anti-BPDE-DNA adduct formation in mononuclear white blood cells of coke oven workers. *Cancer Epidem Biomarkers Prevention*, 2003 (in press).

N. Miraglia<sup>1,3</sup>, G. Genovese<sup>1</sup>, N. Sannolo<sup>1</sup>, A. Acampora<sup>2</sup>

## Fumigazione di terreni agricoli e derrate alimentari: la valutazione dell'esposizione professionale a bromuro di metile

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Medicina del Lavoro, Igiene e Tossicologia Industriale, Seconda Università degli Studi di Napoli

<sup>2</sup> Dipartimento di Medicina Pubblica e della Sicurezza Sociale, Il Policlinico, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

<sup>3</sup> Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Pubblica, Università di Bari

**RIASSUNTO.** Sono state messe a punto procedure analitiche originali per il monitoraggio biologico di lavoratori esposti a bromuro di metile, eseguito mediante determinazione di indicatori di esposizione, quali i bromuri sierici, e di indicatori di dose biologicamente efficace, quali gli addotti emoglobinici. L'utilizzazione delle metodiche sviluppate ai fini del monitoraggio biologico è stata verificata mediante l'analisi di campioni di sangue di fumigatori di terreni agricoli.

**Parole chiave:** bromuro di metile, esposizione professionale, fumigazione.

**ABSTRACT.** [www.gimle.fsm.it](http://www.gimle.fsm.it)

**FUMIGATION OF SOIL AND FOOD-STUFFS: THE EVALUATION OF OCCUPATIONAL EXPOSURE TO METHYL BROMIDE.** Innovative procedures were developed for the biological monitoring of workers exposed to methyl bromide, through the determination of biomarkers of exposure, such as bromide in serum, and of biomarkers of the biologically effective dose, such as haemoglobin adducts. The effectiveness of the developed techniques for the biological monitoring was tested through the analysis of blood samples from workers employed in soil fumigation.

**Key words:** methyl bromide, occupational exposure, fumigation.

### Introduzione

Il bromuro di metile (MeBr), un biocida ad ampio spettro di azione, è un gas altamente tossico (1), utilizzato principalmente per sterilizzare il suolo prima di passare alla fase della coltivazione; trova impiego, inoltre, nella conservazione degli alimenti nei depositi e nella disinfestazione delle coltivazioni in serra.

Nonostante le buone caratteristiche economiche e tecniche, l'impiego di tale sostanza è stato messo in discussione per motivi di natura tossicologica ed ambientale. Il bromuro di metile è, infatti, un potente elettrofilo, in grado di reagire con i siti nucleofili di DNA, RNA e proteine, risultando mutageno in esperimenti condotti *in vitro* (2). Inoltre, l'accumulo dei residui di bromuro nel terreno e nelle falde acquifere si è rivelato nocivo per tutti gli organismi acquatici e per l'uomo. Infine, il MeBr è tra i responsabili della distruzione dello strato di ozono atmosferico e del conseguente assottigliamento della fascia protettiva stratosferica.

Sulla base di queste considerazioni sono state promulgate normative internazionali volte a regolamentare l'utilizzo del MeBr, prima tra tutte il protocollo di Montreal del 1997, che sancisce la graduale riduzione nei paesi industrializzati dell'uso di tale pesticida rispetto alle quantità usate nel 1991, fino ad una completa messa al bando del prodotto prevista entro il 2005.

Il destino di tale fumigante, però, non è ancora certo. L'amministrazione Bush, infatti, ha sottoposto all'EPA e all'ONU una richiesta di autorizzazione all'uso del bromuro di metile per diverse compagnie e gruppi commerciali che ritengono non esistere, al momento, valide alternative. Le richieste americane, già approvate dall'EPA, avrebbero l'effetto di provocare addirittura un aumento dell'uso del pesticida rispetto ai livelli di riferimento del 1991.

Qualunque sia il futuro di questo agente di rischio, rimane di fondamentale importanza, per la tutela dei lavoratori addetti alle attività di fumigazione o che operano in aree fumigate, la valutazione dell'esposizione professionale a bromuro di metile mediante monitoraggio biologico. A tale scopo, nel presente lavoro, sono stati scelti come indicatori di esposizione i bromuri sierici e come indicatori di dose biologicamente efficace gli addotti emoglobinici, essendo stata provata la relazione quantitativa tra la reattività di molti cancerogeni chimici verso il DNA e l'emoglobina (3, 4). Tra gli addotti emoglobinici si è deciso di quantificare il peptide  $\beta(83-95)\text{-CH}_3$ , ottenuto per idrolisi triptica delle catene globiniche. Tale peptide contiene il residuo di cisteina 93, individuato, mediante esperimenti condotti *in vitro*, quale sito preferenziale di alchilazione e correlabile, quindi, anche a bassi livelli di esposizione a bromuro di metile (5-8).

### Metodi

#### 1. Determinazione dei bromuri sierici:

- Retta di calibrazione.* La curva di calibrazione è stata ottenuta analizzando campioni preparati come riportato in letteratura (9).
- Analisi di sangue di soggetti esposti.* I campioni di sangue di fumigatori sono stati centrifugati per separare il siero, in cui sono

stati determinati i bromuri. A 50µl di siero è stato addizionato lo standard interno e i campioni sono stati trattati in modo da provocare la precipitazione di bromuro di cianogeno, che è stato quantificato.

- ❑ *Analisi GC del bromuro di cianogeno.* L'analisi dei campioni di siero è stata eseguita adoperando un gascromatografo Autosystem XL, dotato di autocampionatore di spazio di testa e rivelatore ECD.

## 2. Determinazione del peptide $\beta(83-95)\text{Me}$ :

- ❑ *Retta di calibrazione.* I campioni adoperati per la costruzione delle rette di calibrazione sono stati preparati secondo la procedura riportata in letteratura (8).
- ❑ *Analisi di sangue di soggetti esposti.* I campioni di sangue di fumatori sono stati centrifugati per separare il siero dai globuli rossi. Questi ultimi sono stati lisati e le catene globiniche purificate mediante precipitazione; a queste è stato aggiunto standard interno, e i campioni così preparati sono stati sottoposti ad idrolisi triptica.
- ❑ *Analisi LC/ESI/MS dei peptidi triptici.* I peptidi triptici sono stati separati mediante HPLC in fase inversa e identificati mediante spettrometria di massa ad elettrospray, adoperando uno spettrometro di massa a trappola ionica, interfacciato con un sistema modulare HP 1100.

## Risultati

La linearità del metodo è stata verificata per i bromuri sierici in un intervallo compreso tra 5 e 50 mg/l, e per il peptide alchilato tra 40 e 644 pmol di addotto/g di globina.

Nel primo caso sono stati calcolati valori di inaccuratezza percentuale (Diff%) compresi tra  $\pm 6\%$ ; il coefficiente di variazione (CV%) varia tra 0.5 e 3.1%; il coefficiente di correlazione è prossimo all'unità ( $r^2=0,997$ ).

La procedura analitica messa a punto per la determinazione quantitativa degli addotti emoglobinici fornisce valori di Diff% compresi tra -4.0 e 0.2%; il CV% è compreso tra 1.3 e 22.0%; il coefficiente di correlazione, anche in questo caso, è prossimo all'unità ( $r^2=0,986$ ).

In soggetti esposti a MeBr sono stati rilevati livelli di bromuro sierico tra 26.5 e 50.0 mg/l e livelli di addotto  $\beta(83-95)\text{-CH}_3$  tra 70.5 e 624 pmol di addotto/g di globine. I dati ottenuti sono comparabili con i range di concentrazione riportati in letteratura per l'analisi di campioni di fumatori (5, 10).

	Bromuri sierici (mg/l)	$\beta(83-95)\text{-CH}_3$ (pmol/g)
Campione A	26.5	70.5
Campione B	39.8	624
Campione C	49.6	321
Campione D	50.0	270

Nel caso dei campioni A, C e D all'aumentare dei livelli di bromuri sierici aumentano anche i livelli di peptide alchilato e concentrazioni simili di bromuro corrispondono a livelli comparabili di peptide modificato (campioni C e D). Nel campione B, invece, si nota una discrepanza: il livello di peptide  $\beta(83-95)\text{-CH}_3$  risulta molto più elevato di quello atteso tenendo conto del livello di bromuro sierico. Ciò può essere spiegato considerando che gli addotti emoglobinici rispecchiano anche esposizioni prolungate nel tempo (la vita media dei globuli rossi è di circa quattro mesi), mentre il bromuro sierico rivela esposizioni recenti (l'emivita dei bromuri nel siero è circa 100h).

## Conclusioni

Dai risultati ottenuti si evince che il monitoraggio biologico basato sulla quantificazione del peptide  $\beta(83-95)\text{-CH}_3$  e dei bromuri sierici, quali biomarcatori, permette un'accurata valutazione dell'esposizione professionale, occasionale o prolungata, a bromuro di metile.

## Bibliografia

- 1) U.S. Environmental Protection Agency, U.S. EPA, Integrated Risk Information System (IRIS) on Bromomethane 1999.
- 2) International Agency for Research on Cancer, IARC, Summary and Evaluation. 1999; 71: 72.
- 3) Calleman CJ, Ehrenberg L, Jansson B, Osterman-Golkar S, Stevenson K, Wachtmeister CA. Monitoring and risk assessment by means of alkyl groups in hemoglobin in persons occupationally exposed to ethylene oxide. J Environ Pathol Toxicol 1978; 2(2): 427-442.
- 4) Neumann HG. Analysis of hemoglobin as a dose monitor for alkylating and arylating agents. Arch Toxicol 1984; 56(1): 1-6.
- 5) Mamone G, Malorni A, Scaloni A, Sannolo N, Basile A, Pöcsfalvi G, Ferranti P. Structural analysis and quantitative evaluation of the modifications produced in human hemoglobin by methyl bromide using mass spectrometry and Edman degradation. Rapid Commun Mass Spectrom 1998; 12(22): 1783-1792.
- 6) Ferranti P, Sannolo N, Mamone G, Fiume I, Carbone V, Tornqvist M, Bergman A, Malorni A. Structural characterization by mass spectrometry of hemoglobin adducts formed after in vivo exposure to methyl bromide. Carcinogenesis 1996; 17(12): 2661-2671.
- 7) Sannolo N, Mamone G, Ferranti P, Basile A, Malorni A. Biomonitoring of human exposure to methyl bromide by isotope dilution mass spectrometry of peptide adducts. J Mass Spectrom 1999; 34(10): 1028-1032.
- 8) Miraglia N, Genovese G, Acampora A, Malorni L, Sannolo N. A novel mass spectrometry technique for the evaluation of occupational exposure to methyl bromide. J. Mass Spectrom 2002; 37: 1171-1174.
- 9) Acampora A, Moscarello C, Miraglia N, Della Casa E, Liotti F, Sannolo N. Analisi diretta dei bromuri ematici con un nuovo metodo gas cromatografico: determinazione dei valori di riferimento normali e dei livelli nei soggetti esposti a bromuro di metile. Folia Medica 2002; 73(1-2): 43-50.
- 10) Campbell C, Ward NI, Peet M. Increased bromide levels in serum and hair during lithium treatment. J. Affect Disord. 1986; 11(2): 161-164.

A. Gelormini, D. Cidaria

## Gestione dell'esposizione combinata ad agenti chimici: una proposta operativa

Direzione Salute, Sicurezza e Ambiente, Medicina e Igiene Industriale - Polimeri Europa S.p.A., San Donato (MI)

**RIASSUNTO.** Il D.Lgs. 25/2002 introduce la prescrizione di valutare, in presenza di esposizione a più agenti chimici, il "rischio che comporta la combinazione di tutti i suddetti agenti chimici".

Nel Decreto non sono però definiti principi e metodi formali per condurre questa valutazione. In attesa di indicazioni tecniche specifiche, viene formulata una proposta di schema operativo per la gestione del "rischio combinato", ispirata ai criteri formali ed alle indicazioni delle Agenzie americane ACGIH ed OSHA. Sono presentati vantaggi e limiti dello schema proposto.

**Parole chiave:** esposizione combinata ad agenti chimici, gestione dell'esposizione professionale.

**ABSTRACT.** [www.gimle.fsm.it](http://www.gimle.fsm.it)

**MANAGEMENT OF EXPOSURE TO CHEMICAL AGENTS IN COMBINATION: AN OPERATIVE PROPOSAL.** The Decree 25/2002 introduces the duty, in case of activities involving exposure to several chemical agents, to evaluate the risk "on the basis of the risk presented by all such chemical agents in combination".

Yet, in the Decree, no principles or formal methods are defined to perform such evaluation. Waiting for specific technical instructions, we propose a scheme for the management of the "combined risk", inspired to the formal criteria and suggestions of the American Agencies ACGIH and OSHA. Advantages and limits of the proposed scheme are discussed.

**Key words:** exposure to chemical agents in combination, management of occupational exposure.

### Discussione

La valutazione del rischio derivante dalla presenza di più agenti chimici costituisce un problema molto complesso a causa dei numerosi fattori che intervengono nella interazione tra gli agenti presenti e tra essi e l'organismo umano<sup>1</sup>. Tuttavia, nella realtà quotidiana, il Datore di Lavoro necessita di metodi di gestione operativi, anche sulla base di semplificazioni, purché basate su assunzioni cautelative.

Si ritiene che per una quantificazione del "rischio combinato" si possa fare riferimento al concetto di rischio di esposizione alle "miscele di sostanze" trattato sia dall'ACGIH<sup>2</sup> che dall'OSHA<sup>3</sup>. Per miscela di sostanze si devono intendere sia i casi in cui gli agenti chimici costituiscono effettivamente una miscela nell'atmosfera respirata dal lavoratore (ovvero sono presenti contemporaneamente nello spazio e nel tempo), sia i casi in cui l'esposizione a più agenti avvenga comunque nell'arco della giornata lavorativa standard<sup>1</sup>.

Nel trattare formalmente l'esposizione alle miscele, entrambe le Agenzie citate adottano sostanzialmente lo stesso principio (anche se i termini formali sono diversi): viene calcolato un "indice di rischio" (o "esposizione equivalente per la miscela") che si ottiene sommando i rapporti tra le esposizioni ed i rispettivi limiti riferiti alle 8 ore lavorative, per ciascuno degli agenti presenti, ovvero, per  $n$  agenti:

$$\sum_{i=1}^n \frac{E_i}{VL_i} = \frac{E_1}{VL_1} + \frac{E_2}{VL_2} + \dots + \frac{E_n}{VL_n} \quad (1)$$

dove: VL è il valore limite considerato (ovvero il TLV-TWA<sup>®</sup> per ACGIH ed il PEL-Permissible Exposure Level per OSHA).

Il rispetto del limite per la miscela è garantito quando la sommatoria (1) è inferiore all'unità, mentre valori superiori all'unità comportano una condizione di non conformità al limite.

Malgrado le due Agenzie adottino lo stesso principio metodologico, esse si differenziano tuttavia per un aspetto importante: mentre l'OSHA considera indistintamente tutte le sostanze presenti, l'ACGIH considera solo le sostanze che esercitano lo stesso effetto critico (organo o sistema bersaglio) e solo su queste calcola l'esposizione equivalente per la miscela, secondo un principio di additività della dose.

Ne consegue che in presenza di sostanze con più di un effetto critico verranno calcolati tanti indici di rischio quanti sono gli effetti critici presenti.

Lo schema che proponiamo prevede la possibilità di utilizzare entrambe queste modalità per la gestione efficace del "rischio combinato", avendo i due approcci caratteristiche specifiche che ne consentono usi e finalità differenziate.

L'approccio ACGIH:

- è di applicazione più complessa, poiché necessità del raggruppamento degli agenti in base agli effetti critici, ma si basa su un razionale scientifico più puntuale;

<sup>1</sup> La validità di questa assunzione è confermata dalla proposta di modifica della Appendice C nel manuale ACGIH ed. 2003, pag. 65.

**Tabella I. Esempio di valutazione - Rischi semplici, rischi combinati "secondo OSHA", rischi combinati "secondo ACGIH"**

agente presente	TLV Basis - Critical Effect(s)	esposizioni rilevate (ppm)	Limite
1,3-butadiene	Cancer	0.01	TLV 2 ppm
1,4-vinilcloruro	irritation, CNS, reproductive	0.005	TLV 0.1 ppm
toluene	CNS	0.045	TLV 50 ppm
stirene	neurotoxicity, irritation, CNS	0.005	TLV 20 ppm
acrilnitrile	Cancer	0.01	TLV 2 ppm
			<b>Limite</b>
<b>"Rischio combinato" secondo OSHA (tutti gli agenti)</b>		$\frac{0.01}{2} + \frac{0.005}{0.1} + \frac{0.045}{50} + \frac{0.005}{20} + \frac{0.01}{2} = 0.061$	1
			<b>Limite</b>
<b>"Rischi combinati" secondo ACGIH</b>	<b>agenti aggregati</b>		
effetto critico "cancer"	1,3-butadiene + acrilnitrile	$\frac{0.01}{2} + \frac{0.01}{2} = 0.01$	1
effetto critico "irritation"	1,4-vinilcloruro + stirene	$\frac{0.005}{0.1} + \frac{0.005}{20} = 0.050$	1
effetto critico "CNS"	1,4-vinilcloruro + toluene + stirene	$\frac{0.005}{0.1} + \frac{0.045}{50} + \frac{0.005}{20} = 0.051$	1

- consente di identificare con migliore precisione gli organi/sistemi maggiormente a rischio dalla esposizione combinata, anche se l'indice calcolato risulta meno sensibile (in quanto influenzato da meno addendi).

L'approccio OSHA:

- è di più immediata applicazione in quanto il solo criterio per l'inclusione nel calcolo è la presenza dell'agente;
- calcola un indice di carattere generale, intuitivamente molto sensibile in quanto influenzato da più addendi e nel quale assume un "peso" significativo il numero degli agenti chimici, oltre che la loro concentrazione.

Una campagna di misurazioni ambientali dimostrerà conformità ai limiti quando dalle esposizioni risulterà che (vedi esempio di valutazione in Tab. I):

- non vi è superamento dei limiti di esposizione professionale per ciascuna delle sostanze presa singolarmente;
- non vi è superamento del valore unitario per l'indice OSHA, considerando tutte le sostanze presenti;
- non vi è superamento del valore unitario per ognuno degli indici, secondo ACGIH, dopo aver aggregato le sostanze sulla base degli effetti critici.

### Assunzioni e limitazioni dello schema

Il principale limite dello schema è che entrambi gli approcci escludono, per semplificazione, i casi in cui più sostanze possano esplicare effetti sinergici, di potenziamento o di attenuazione o altre interazioni complesse. Pertanto, in presenza di informazioni su meccanismi di azione di tipo non additivo la significatività dell'indice di esposizione alla miscela dovrà essere attentamente valutata.

Un secondo limite è costituito dal fatto che per l'applicazione dello schema è necessario disporre di misurazioni ambientali per tutti gli agenti chimici presenti, e che per ciascuno sia disponibile un limite di esposizione professionale.

### Conclusioni

Nella gestione del rischio combinato ad agenti chimici, l'approccio ACGIH è da applicare in via prioritaria, sotto il profilo medico e prevenzionistico, in quanto fornisce al Medico Competente uno strumento ulteriore per selezionare specifici protocolli di sorveglianza sanitaria. È certamente l'approccio da applicare quando siano noti con sufficiente certezza gli organi/sistemi effettivamente impattati dagli agenti chimici presenti.

Alternativamente, quando, per gli agenti presenti, non siano noti con sufficiente precisione gli organi/sistemi impattati verrà scelto l'approccio OSHA che risulta più conservativo e utile da adottare sotto il profilo igienistico per individuare immediatamente eventuali situazioni che richiedono interventi ambientali di mitigazione dei rischi.

### Bibliografia

- 1) Zapponi GA, Marcello I, Valente P. Ambiente di lavoro ed esposizione combinata a più agenti chimici. RISCH 2002, p. 123-141, Modena 27/9/2002.
- 2) TLVs and BEIs 2003, pp. 65-68 - ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists), Cincinnati, 2003.
- 3) OSHA Standard 29 CFR - Air contaminants. - 1910.1000 - Occupational Safety and Health Administration.

G. Maina<sup>1</sup>, F. Larese Fillon<sup>2</sup>, P. Sartorelli<sup>3</sup>, G.A. Boario<sup>1</sup>, F. D'Agostin<sup>2</sup>, L. Montomoli<sup>3</sup>

## Valutazione dell'esposizione cutanea professionale: proposta di una check-list

<sup>1</sup> UOADU Servizio di Tossicologia ed Epidemiologia Industriale, Dipartimento di Traumatologia, Ortopedia e Medicina del Lavoro, Università degli Studi di Torino

<sup>2</sup> UCO Medicina del Lavoro, Università di Trieste

<sup>3</sup> Sezione di Medicina del Lavoro, Dipartimento di Medicina Clinica e Scienze Immunologiche, Università degli Studi di Siena

**RIASSUNTO.** Nella valutazione dell'esposizione a tossici industriali c'è la necessità di metodologie semplificate e di facile applicazione che permettano di considerare il contributo fornito dalla cute all'assorbimento generale. I modelli sviluppati a questo proposito si fondano su assunti teorici e dati sperimentali e la loro applicazione nelle reali situazioni lavorative risulta spesso complessa: al fine di mettere a disposizione una metodologia di agevole utilizzo è stata elaborata una check-list che consenta una valutazione preliminare del rischio derivante dall'esposizione cutanea. La check-list, articolata in sei sessioni che rappresentano altrettanti fattori determinanti il rischio di contaminazione, permette di ottenere una valutazione in fasce di rischio su cui promuovere interventi di prevenzione tecnica e/o di ulteriori approfondimenti mediante le tecniche messe a disposizione dall'Igiene Industriale.

**Parole chiave:** esposizione professionale cutanea, check-list.

**ABSTRACT.** [www.gimle.fsm.it](http://www.gimle.fsm.it)

**OCCUPATIONAL DERMAL EXPOSURE ASSESSMENT: PROPOSAL FOR A CHECK-LIST.** The dermal risk assessment requires simplified methodologies to understand the role played by the skin. The conceptual models proposed to this aim are founded on theoretical assumptions and experimental data, but their use in occupational settings shows many difficulties. For this end we have drawn up a check-list that includes six sessions and allows to obtain a preliminary dermal exposure evaluation subdivided on hazard bands.

**Key words:** dermal risk assessment, check-list.

Il crescente interesse nei confronti della valutazione integrata delle vie di assorbimento degli xenobiotici ha stimolato ricercatori di diverse discipline (farmacologi, tossicologi, ecc.) a valutare il potenziale contributo che la via cutanea fornisce agli effetti della esposizione sistemica.

L'entità di tale contributo è funzione di: 1) variabili biologiche: a) la cute può fungere da barriera, b) possiede attività metaboliche, c) contiene diversi tipi di cellule e di annessi, d) è il più esteso organo del corpo umano, e) l'assorbimento cutaneo è controllato dalla fisiologia della cute, varia in funzione della sede e dell'estensione dell'esposizione, è specie-specifico; 2) variabili ambientali: a) la concentrazione, b) la durata, c) il veicolo, d) la temperatura, e) le condizioni locali che concorrono a definire l'esposizione. Tutte queste variabili definiscono nel loro insieme il complesso problema della valutazione della quantità di sostanza chimica assorbita attraverso questa via e pongono una affascinante sfida alla quantificazione del contributo che l'assorbimento cutaneo ha nei confronti della dose sistemica.

In ambito occupazionale i composti che possono essere assorbiti attraverso la cute vengono identificati, nelle liste dei valori limite dei vari Paesi (1), con la notazione "skin", "H", etc: peraltro non esiste attualmente un generale consenso sui criteri per l'assegnazione di tale annotazione (4, 10). Proprio in funzione di queste incertezze sono stati sviluppati diversi modelli predittivi teorici (*conceptual models*) che si propongono di stimare l'assorbimento percutaneo: Fiserova-Bergerova (6) ha elaborato un algoritmo per predire il passaggio transcutaneo di sostanze chimiche; Schneider (11) ha proposto un modello semi-quantitativo basato su un approccio analogo a quanto previsto da EN 689 per la valutazione dell'esposizione per via inalatoria; il modello EASE (2) prevede la stima dell'esposizione cutanea con alcune limitazioni che ne rendono di fatto imprecisa la valutazione; Brouwer (3) ha elaborato un modello predittivo per valutare i livelli di esposizione dermica applicabile in condizioni di esposizione ad aerosol; Van-Wendel-De Jooede (12) propone un modello semi-quantitativo da utilizzare nella pratica dell'Igiene Industriale in sede di valutazione dell'esposizione a sostanze chimiche ed ad agenti biologici.

Negli ambienti di lavoro vi è, tuttavia, la necessità di valutare la contaminazione cutanea ed il conseguente rischio di assorbimento in modo agevole e semplificato al fine di poter dare indicazioni di rischio sul posto di lavoro. A tal fine gli autori, a valle delle esperienze maturate dalla partecipazione alla Dermal Network (7) ed ai progetti di ricerca europei RISKOFDERM (8, 9) ed EDETOX (4) e sulla base dei dati presenti in letteratura, hanno elaborato una check-list semplificata, di facile applicazione da utilizzare nella valutazione ragionata della contaminazione dermica in ambito lavorativo e nella sua gestione.

### La check-list

La check-list si compone di sei sessioni che identificano i fattori cruciali per l'esposizione (compito lavorativo, dispositivi di protezione individuali, descrizione della contaminazione nelle condizioni di osservazione, lavoratore, ambiente di lavoro, prodotto chimico).

Ogni sessione è costituita da un insieme di items che condizionano la contaminazione cui è attribuito un valore predefinito. Questi valori sono

assegnati secondo un rationale che è legato sia all'esperienza che ad indicazioni di letteratura. Per la sessione "prodotto", in particolare, la suddivisione in categorie delle frasi R è stata ripresa dal modello HSE.

Dal momento che, in via preliminare, non è possibile né corretto quantificare il contributo che ogni singola sessione fornisce alla valutazione della contaminazione, il valore arbitrario "10" rappresenta il punteggio massimo attribuibile ad ognuna delle 6 sessioni. Per ottenere quindi il punteggio finale di ogni sessione, si è stabilito di rapportare a tale valore arbitrario l'effettivo risultato dalla somma dei punteggi dei diversi items di ogni singola sessione: il punteggio di ogni sessione risulta quindi compreso nel range 1-10.

Per la valutazione della pericolosità della contaminazione cutanea si procede applicando la formula seguente:

$$CC_{(p)} = CC_{(r)} \times P_{(p)} \times t_{(esp)}$$

dove:

- $CC_{(p)}$  = pericolosità della contaminazione cutanea
- $CC_{(r)}$  = rischio di contaminazione cutanea
- $P_{(p)}$  = pericolosità del prodotto
- $t_{(esp)}$  = durata dell'esposizione

Il rischio di contaminazione cutanea è rappresentato dalla somma dei punteggi delle prime 5 sessioni (attività lavorativa, dispositivi di protezione individuale, contaminazione cutanea osservata, lavoratore, ambiente di lavoro). Gli items che compongono le singole sessioni rappresentano altrettante variabili identificate come elementi determinanti il rischio di contaminazione della cute: ad esempio la frequenza e le modalità di pulizia delle mani quali elementi caratterizzanti l'attenzione igienica del lavoratore; la tipologia, la frequenza di sostituzione, la durata di utilizzo dei guanti protettivi in funzione del grado di protezione offerto dai dispositivi di protezione individuali; il formarsi di particelle solide e le loro dimensioni, la distanza e l'orientamento degli strumenti di lavoro come elementi costitutivi del rischio proprio dell'attività lavorativa svolta.

Il punteggio della terza sessione serve per il calcolo della superficie cutanea contaminata e come controllo dell'efficacia degli interventi correttivi apportati in conseguenza della prima valutazione.

Il valore ( $CC_{(r)}$ ) viene moltiplicato per il fattore "prodotto chimico" (sessione n° 6, per la cui redazione è necessario analizzare le schede di sicurezza dei prodotti che vengono utilizzati nel compito lavorativo in esame) che definisce il grado di pericolosità intrinseca della sostanza/e. In questa sessione ha particolare importanza il punteggio assegnato alle frasi "R" che, di fatto, condiziona per oltre l'80% la pericolosità del prodotto.

Infine si effettua la ponderazione per il tempo di effettiva durata del compito lavorativo oggetto di valutazione, moltiplicando il valore precedentemente ottenuto per il valore che esprime la durata del compito in osservazione rispetto ad un intero turno di lavoro.

Il risultato finale ( $CC_{(p)}$ ) rappresenta il grado di pericolosità della contaminazione cutanea e viene inserito in una delle fasce di valutazione. (fig. 1).

Il valutatore addestrato esegue l'osservazione, compila le 6 schede e perviene ad una prima valutazione. Se al termine ci si trova in una fascia superiore alla verde il valutatore ripete l'osservazione dopo avere individuato e corretto le fasi che sono risultate critiche: al termine della seconda valutazione il risultato sarà tanto migliore quanto più efficace sarà stato l'intervento correttivo.

La check-list è stata validata mediante 75 osservazioni condotte in ambienti di lavoro scelti come significativi in aziende di piccole e medie dimensioni: è risultata uno strumento efficace ad identificare le situazioni critiche su cui poter intervenire.

## Conclusioni

La check-list permette di valutare in modo semplificato il rischio di contaminazione cutanea per esposizione a sostanze chimiche e può diventare uno strumento agevole ed efficace per l'identificazione di un rischio spesso sottovalutato. Essa consente di ordinare per priorità attività lavorative, caratteristiche dei dispositivi di protezione individuale, lavoratori, ambienti di lavoro, su cui promuovere interventi migliorativi e verificarne l'efficacia. Anche le caratteristiche dei prodotti non sfuggono alla valutazione potendo consigliarne la sostituzione in determinate situazioni.

Come ovvio essa presenta alcune inevitabili semplificazioni: dal momento che le conoscenze disponibili sul peso dei singoli determinanti è assente, incerta o controversa, i valori assegnati agli items sono attribuiti prevalentemente sulla base di assunzioni di esperienza, ma tale semplificazione consente comunque un approccio al problema ed una sua valutazione ragionata.

Uno dei fattori limitanti è il tempo necessario per la compilazione (15-20 minuti) e per il training dei valutatori.

Nella sessione "prodotto" è inserita la variabile "pericolosità": tale inclusione non è direttamente pertinente dal momento che non influenza di per sé la contaminazione cutanea: peraltro, in considerazione delle finalità strettamente pratiche della check-list, è ragionevole distinguere tra sostanze pericolose e non e, tra le prime, tra sostanze con gradi di pericolosità diversa.

La sessione "contaminazione cutanea" ha una duplice applicazione: da un lato permette di verificare l'efficacia degli interventi migliorativi messi in atto a seguito della prima valutazione; dall'altro consente di stimare l'estensione della contaminazione cutanea. Quest'ultima costituisce un elemento essenziale nella valutazione dell'assorbimento, valutazione che potrà essere condotta in una fase successiva utilizzando gli strumenti propri dell'Igiene Industriale (es. pads, etc...).

Si tratta pertanto di uno strumento pratico che potrebbe essere base di partenza da un lato per migliorare le condizioni di lavoro dall'altro servire per una valutazione più puntuale del rischio di assorbimento con l'applicazione di alcuni modelli predittivi di assorbimento cutaneo. In questo caso la check-list fungerebbe da primo approccio a cui seguirebbe un'analisi non della contaminazione ma dell'assorbimento stesso della sostanza conoscendo da un lato la superficie cutanea contaminata e dall'altra il flusso della sostanza attraverso la cute.

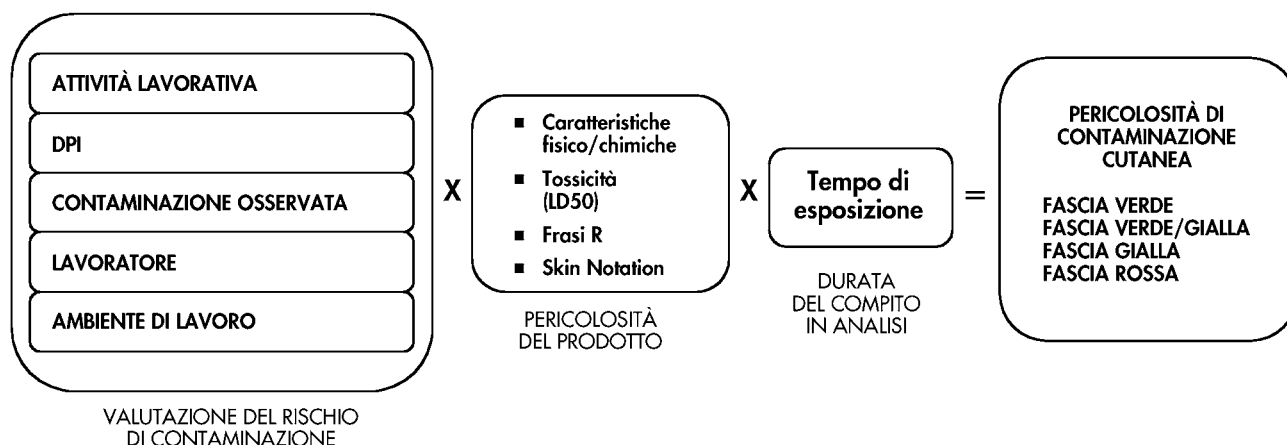


Figura 1. Rappresentazione schematica della check-list

---

**Bibliografia**

- 1) ACGIH Threshold limit values (TLVs) for chemicals substances and physical agents and biological exposure indices (BEIs). ACGIH. 2003; Cincinnati.
- 2) Brooke IM. A UK scheme to help small firms control health risks from chemicals: toxicological considerations. *Ann Occup Hyg* 1998; 377-389.
- 3) Brouwer DH, Semple S, Marquat J, Cherrie JW. A dermal model for spray painters. Part I. Subjective exposure modelling of spray paint deposition. *Am Occup Hyg* 2001; 45: 15-23.
- 4) Drexler H. Assignment of skin notation for MAK values and its legal consequences in Germany. *Int Arch Occup Environ Health* 1998; 71: 503-505.
- 5) EDETOX Contract No. QLK 4-2000-00196 5 th Framework Programme of the European Community.
- 6) Fiserova-Bergerova V, Pierche TJ, Droz Pon. Dermal absorption potential of industrial chemicals: criteria for skin notation. *Am J Indust Med* 1990; 17: 617-635.
- 7) Larese F, Sartorelli P, Scansetti G. Assorbimento percutaneo dei tossici industriali: il Dermal Exposure Network (DEN) dell'Unione Europea. *Med Lav* 1998; 89: 538-544.
- 8) Maina G, Larese F, Sartorelli P, Montomoli L, Boario GA, Polone A., Sisinni AG, Bagnato E. RISKOFDERM: Un progetto europeo per la valutazione dell'esposizione per via cutanea a tossici industriali. *Med Lav* 2002; 93, 2: 73-79.
- 9) RISKOFDERM. Contract No. QLK 4-CT-1999-01107. 5 th Framework Programme of the European Community.
- 10) Sartorelli P, Montomoli L, Sisinni AG. Il rischio cutaneo da tossici industriali. *G Ital Med Lav Erg* 2002; 24, 3: 192-194.
- 11) Schneider T, Vermeulen R, Brouwer DH, Cherrie JW, Kromhout H, Fogh CL. Conceptual model for assessment of dermal exposure. *Occup Environ Med* 1999; 56: 765-773.
- 12) Van-Wendel-De-Joode B, Brouwer DH, Vermeulen R, V Hemmen JJ, Heederick D, Kromhout H. DREAM: a method for semi-quantitative dermal exposure assessment. *Ann Occup Hyg* 2003; 1: 71-87.

M.V. Vettori<sup>1,2</sup>, M. Goldoni<sup>1,2</sup>, A. Caglieri<sup>2</sup>, S. Palmi<sup>3</sup>, L.C. Ursini<sup>3</sup>, A. Mutti<sup>2</sup>

## Definizione del rischio neurotossico in base alla dose di riferimento ("benchmark dose") *in vitro*: esemplificazioni con modelli sperimentali basati sull'uso di sostanze neurotossiche note

<sup>1</sup> Centro Studi e Ricerche ISPESL presso l'Università di Parma

<sup>2</sup> Laboratorio di Tossicologia Industriale dell'Università di Parma, Parma

<sup>3</sup> Dipartimento di Medicina del Lavoro, ISPESL, Monteporzio Catone, Roma

**RIASSUNTO.** Nel presente studio è stato utilizzato un approccio matematico per determinare le dosi soglia (EC50 e BMDs) in cellule nervose umane (SK-N-MC e D384, neuronali e gliali, rispettivamente) e di ratto trattate (PC12 e C6, neuronali e gliali, rispettivamente) per 24 ore con diverse sostanze neurotossiche (MnCl<sub>2</sub>, Me-Hg e i due enantiomeri dello stirene ossido, R-SO e S-SO). I dati ottenuti utilizzando il saggio di vitalità dell'MTT sono stati confrontati con i valori di BMDs e LOAEL estrapolati dalla letteratura *in vivo*.

Da questa analisi è stato possibile confrontare la potenza dei composti esaminati, che è risultata essere la seguente: MnCl<sub>2</sub> < S-SO < R-SO < Me-Hg. Inoltre, il confronto preliminare con dati *in vivo* estrapolati dalla letteratura evidenzia un accordo ragionevole tra le dosi estrapolate *in vivo* e *in vitro* per l'esposizione a MnCl<sub>2</sub> e SO. La grande variabilità di valori di LOAEL riportati *in vivo* per il Me-Hg rende più difficile il confronto con i dati *in vitro*.

**Parole chiave:** dose di riferimento, rischio neurotossico, studi *in vitro*.

**ABSTRACT.** [www.gimle.fsm.it](http://www.gimle.fsm.it)

**BENCHMARK DOSES IN VITRO TO ASSESS NEUROTOXIC RISK: EXAMPLES RELYING ON EXPERIMENTAL MODELS BASED ON KNOWN NEUROTOXIC SUBSTANCES.** The BMD approach has been used to compare the cell viability (MTT assay) of different rat (C6 and PC12, glial and neuronal, respectively) and human cell lines (D384 and SK-N-MC, glial and neuronal, respectively) after 24-h exposure to the following neurotoxic substances: Manganese Chloride (MnCl<sub>2</sub>), Methyl-mercury (Me-Hg) and the enantiomers of Styrene Oxide (SO). For all rat and human cell lines, the potency of the examined compounds was: MnCl<sub>2</sub> < S-SO < R-SO < Me-Hg. A preliminary comparison with *in vivo* toxicity data for these substances gave rise to consistent results. Whereas a reasonable agreement between *in vitro* and *in vivo* data has been found for Mn and styrene oxide, a wide scatter of LOAEL has been reported for Me-Hg and these appear to be either much higher or lower than the BMD for the MTT assay we observed *in vitro*.

**Key words:** benchmark dose, neurotoxic risk, *in vitro* studies.

### Introduzione

È attualmente oggetto di dibattito e di verifica a livello scientifico la possibilità di sviluppare tecniche alternative all'impiego di animali da laboratorio nel processo di valutazione del rischio. Alcuni metalli (manganese e mercurio) e composti organici volatili (stirene) sembrano causare effetti neurocomportamentali in soggetti esposti a basse dosi (1,2,3). Tali effetti presentano peraltro diverse incertezze interpretative, che rendono aleatoria la valutazione del rischio, anche a causa delle scarse conoscenze relative al meccanismo di azione. Diversi approcci *in vitro* (colture primarie, linee cellulari continue, colture di slide di tessuto) forniscono dati di neurotossicità. Sebbene queste procedure siano importanti per lo studio dei meccanismi di tossicità delle sostanze, il loro utilizzo per l'identificazione del rischio chimico per l'uomo non è universalmente accettato (4).

Gli studi *in vivo* sono utilizzati per caratterizzare le relazioni dose-risposta tra esposizione ad agenti chimici e tossicità. Generalmente la procedura che viene seguita per considerare accettabile un dato livello di esposizione consiste nell'estrapolare una concentrazione in corrispondenza della quale non si osservano effetti (NOAEL), o la più bassa concentrazione in corrispondenza della quale si osservano effetti (LOAEL) (5,6). Un approccio alternativo è quello della stima della dose di riferimento Benchmark Dose (BMD), definita come il limite di confidenza inferiore di una dose corrispondente ad uno specifico livello di rischio (7, 8).

Nel presente studio è stato utilizzato un approccio statistico per determinare le dosi soglia (EC50 e BMDs) in cellule nervose trattate con diverse sostanze neurotossiche. I dati ottenuti sono stati confrontati con i valori di EC50 e BMDs estrapolati dalla letteratura *in vivo*.

### Materiali e metodi

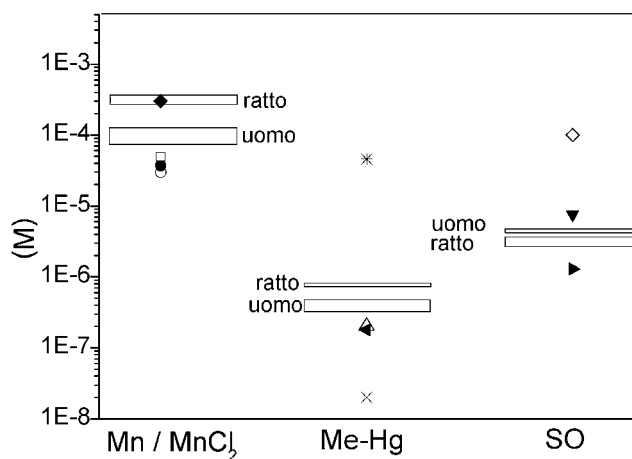
Linee cellulari gliali e neuronali umane (D384 e SK-N-MC) e di ratto (C6 e PC12) sono state trattate per 24 ore con diverse sostanze neurotossiche (MnCl<sub>2</sub>, Me-Hg e i due enantiomeri dello stirene ossido, R-SO e S-SO). Al termine dell'incubazione, i dati di vitalità cellulare (valutata con il saggio dell'MTT) sono stati analizzati utilizzando come modello matematico la funzione di Hill. Per ciascuna linea cellulare e ciascun composto sono stati estrapolati i valori di EC50, BMD e BMDL. Inoltre sono stati calcolati i valori di un parametro definito "indice di cooperatività" ( $\gamma$ ), che fornisce indicazioni relative alle modalità di interazione tra la sostanza tossica e la cellula. In particolare,  $\gamma$  maggiore di 1 indica che l'interazione della sostanza tossica con la cellula favorisce l'interazione con altre molecole della sostanza; al contrario, se  $\gamma$  è inferiore di 1 l'interazione della sostanza tossica, diminuisce l'affinità di altre molecole della stessa sostanza con le cellule.

### Risultati e discussione

Dall'analisi delle relazioni dose-risposta, per ciascuna linea cellulare trattata con i diversi composti, sono stati estrapolati i valori di EC50 e BMD BMDL (Tabella I).

**Tabella I. EC<sub>50</sub>, BMD (Benchmark Dose), BMDL (Lower Benchmark Dose),  $\gamma$  (indice di cooperatività) e R<sup>2</sup> (goodness-of-fit indicator) calcolati dopo 24 ore di esposizione a MnCl<sub>2</sub>, Me-Hg, R-SO e S-SO utilizzando il saggio dell'MTT**

Sostanze tossiche	Linea cellulare	EC50 (M)	BMD (M)	BMDL (M)	$\gamma$	R <sup>2</sup>
MnCl <sub>2</sub>	C6	(1.7±0.4)e-2	4.7e-3	3.3e-3	1.7±0.2	0.99
	PC12	(1.3±0.2)e-3	3.7e-4	2.9e-4	1.7±0.5	0.96
	D384	(5.0±0.5)e-3	1.6e-3	1.1e-3	2.0±0.3	0.99
	SK-N-MC	(7.1±0.9)e-4	1.3e-4	7.2e-5	1.3±0.2	0.98
Me-Hg	C6	(2.2±0.3)e-6	8.1e-7	6.7e-7	2.2±0.4	0.96
	PC12	(2.2±0.2)e-6	9.5e-7	8.4e-7	2.7±0.4	0.99
	D384	(8.2±0.5)e-6	4.3e-6	NC	3.4±0.7	0.98
	SK-N-MC	(2.1±0.5)e-6	4.6e-7	3.1e-7	1.5±0.3	0.97
R-SO	C6	(1.1±0.3)e-4	9.4e-6	3.9e-6	0.9±0.2	0.98
	PC12	(6.6±0.5)e-6	1.4e-6	7.8e-7	1.4±0.1	0.99
	D384	(2.9±0.3)e-5	1.7e-6	1.0e-6	0.8±0.1	0.99
	SK-N-MC	(2.0±0.4)e-5	3.0e-6	2.3e-6	1.2±0.2	0.99
S-SO	C6	(4.4±1.0)e-4	6.6e-5	4.5e-5	1.2±0.3	0.98
	PC12	(1.6±0.2)e-5	4.1e-6	3.1e-6	1.6±0.2	0.99
	D384	(5.8±0.7)e-4	1.7e-4	1.2e-4	1.7±0.3	0.99
	SK-N-MC	(4.1±0.4)e-5	7.5e-6	6.1e-6	1.3±0.2	0.99



- = dosi efficaci *in vitro* (intervallo: BMDL - BMD)
- = LOAEL nel cervello dopo esposizione cronica nell'uomo-EPA
- = alterata attività motoria e riduzione dello spessore della corteccia in ratti neonati
- ◆ = compromissione dell'attività motoria e calo del 50% dei livelli di dopamina
- = manifestazioni cliniche di manganismo in scimmie
- \* = effetti neurotossici in uomo e gatto
- △ = compromissione dell'attività motoria in neonati
- ◀ = attività motoria alterata in ratti neonati
- × = esposizione sub-cronica in conigli
- ▼ = esposizione sub-cronica a stirene nell'uomo
- ▶ = BMD per effetti neurocomportamentali nell'uomo
- ◇ = effetti neurotossici in ratti

**Figura 1. Confronto tra dosi che hanno effetti neurotossici in vivo (estrapolate dalla letteratura) e dosi efficaci *in vitro* (estrapolate dalle linee cellulari neuronali di ratto e umane)**

Da questa analisi è stato possibile confrontare la potenza dei composti esaminati ( $MnCl_2 < S-SO < R-SO < Me-Hg$ ) e stabilire la sensibilità delle diverse linee cellulari nei confronti dei composti analizzati. Il Me-Hg è risultato essere più tossico del  $MnCl_2$  di diversi ordini di grandezza. Inoltre la linea di neuroblastoma umano è risultata essere la più sensibile ai metalli analizzati rispetto alle altre linee cellulari. L'applicazione del modello matematico per lo studio delle relazioni dose-risposta utilizzando i due enantiomeri dello SO ha dimostrato che l'enantiomero R- è sempre più tossico dell'enantiomero S- in tutte le linee cellulari utilizzate. I valori di  $\gamma$  indicano che, ad eccezione di entrambe le linee gliali trattate con R-SO, per tutte le sostanze esaminate e le linee cellulari trattate, le modalità di interazione sono tali che il legame di una molecola tossica favorisce il legame di altre molecole tossiche alla cellula ( $\gamma > 1$ ).

Il confronto preliminare con dati *in vivo* estrapolati dalla letteratura (Figura 1) evidenzia un accordo ragionevole tra le dosi estrapolate *in vivo* e *in vitro* per l'esposizione a  $MnCl_2$  e SO. La grande variabilità di valori di LOAEL riportati *in vivo* per il Me-Hg rende più difficile il confronto con i dati *in vitro*. Le discrepanze nelle dosi di riferimento estrapolate possono essere spiegate dalla necessità di applicare alcune approssimazioni rappresentate principalmente da differenti modalità di esposizione *in vivo* e *in vitro*, in particolare in relazione alle evidenti difficoltà concettuali di poter fare esposizioni croniche utilizzando cellule *in vitro*.

In conclusione, il presente lavoro aggiunge informazioni promettenti relative allo studio della neurotossicità di sostanze presenti nell'ambiente di lavoro. L'eventuale dimostrazione di una soglia coerente con le osservazioni epidemiologiche potrebbe fornire basi scientifiche e razionali per la stima del rischio attraverso l'utilizzo di modelli *in vitro*.

## Bibliografia

- Mergler D, Huel G, Bowler R, Iregren A, Belanger S, Baldwin M, Tardif R, Smargiassi A, Martin L. Nervous system dysfunction among workers with long-term exposure to manganese. *Environ Res* 1994; 64(2): 151-80.
- Mutti A, Mazzucchi A, Rustichelli P, Frigeri G, Arfini G, Franchini I. Exposure-effect and exposure-response relationships between occupational exposure to styrene and neuropsychological functions. *Am J Ind Med* 1984; 5(4): 275-86.
- Budtz-Jorgensen E, Grandjean P, Keiding N, White RF, Weihe P. Benchmark dose calculations of methylmercury-associated neurobehavioral deficits. *Toxicol Lett* 2000; 112-113: 193-9.
- Harry GJ, Billingsley M, Bruinink A, Campbell IL, Classen W, Dorman DC, Galli C, Ray D, Smith RA, Tilson HA. In vitro techniques for the assessment of neurotoxicity. *Environ Health Perspect* 1998; 106 Suppl 1: 131-58.
- Tardiff R, Rodricks J, "Comprehensive Risk Assessment," In: Tardiff R, Rodricks J, eds. Toxic substances and human risk- principles of data interpretation. New York: Plenum press, 1987, 391-430.
- Rabovsky J, Fowles J, Hill M, Lewis D. A Health Benchmark for the Neurologic Effects of Styrene: Comparison with NOAEL/LOAEL Approach. *Risk Analysis* 2001; 21: 117-26.
- Crump K. A New Method for Determining Allowable Daily Intakes. *Fund Appl Toxicol* 1984; 4: 854-71.
- Murrell J, Portier C, Morris R. Characterizing Dose-Response I: Critical Assessment of the Benchmark Dose Concept. *Risk Anal* 1998; 18: 13-26.

M. Maroni<sup>1,2</sup>, M. Tiramani<sup>1</sup>, A. Fait<sup>1</sup>, B. Iversen<sup>1</sup>, C. Colosio<sup>1</sup>

## La definizione di livelli accettabili di esposizione ad antiparassitari per l'operatore (AOELs)

<sup>1</sup> International Centre for Pesticides and Health Risk Prevention (ICPS) - Ospedale Luigi Sacco (MI)

<sup>2</sup> Dipartimento di Medicina occupazionale e Ambientale dell'Università degli Studi di Milano

**RIASSUNTO.** Nell'ambito del piano di ricerca del 5° programma quadro della Comunità Europea è stato prodotto un "guidance document" relativo ai "Metodi per la definizione dei limiti accettabili di esposizione per l'operatore (AOEL)". Nel lavoro vengono descritti i principali risultati del progetto oltre ai problemi principali riferiti ai lavoratori agricoli e agli astanti e le difficoltà di sviluppare un approccio condiviso. Vengono discusse le basi scientifiche del processo, i cui risultati potranno essere utilizzati dalla Commissione Europea e dagli Stati membri nel corso delle procedure di valutazione per l'inclusione di sostanze attive nell'Allegato I della Direttiva EU 91/414.

**Parole chiave:** lavoratori, agricoltura, limiti di esposizione, progetto, Unione Europea.

**ABSTRACT.** [www.gimle.fsm.it](http://www.gimle.fsm.it)

**ESTABLISHMENT OF ACCEPTABLE OPERATOR EXPOSURE LEVELS - AOELs - FOR PESTICIDES.** A guidance document entitled "Recommended method for the establishment of Acceptable Operator Exposure Levels" has been prepared within the EU 5th Framework program. The paper describes the main outcomes of the project and the issues that apply particularly to agricultural workers and bystanders and the difficulties in developing an agreed uniform approach. The scientific basis of the process is discussed, to be used by the European Commission and Member States when making decision about the inclusion of an active substance in Annex I of Directive 91/414/EEC.

**Key words:** workers, agriculture, exposure limits, project, European Union.

### Introduzione

La normativa europea, accanto ai limiti di esposizione professionale (OEL), ha introdotto livelli di esposizione accettabili per l'operatore esposto ad antiparassitari (AOELs).

Esistono numerose differenze tra AOELs e i limiti di esposizione professionale (OELs) usati per sostanze chimiche in altri contesti professionali:

1. gli antiparassitari sono sostanze ad elevata tossicità intrinseca, deliberatamente immesse nell'ambiente in quanto dirette ad eliminare forme di vita indesiderate;
2. mentre gli OELs sono definiti come concentrazioni nell'aria, in quanto l'inalazione rappresenta la principale via di esposizione nell'industria, in agricoltura l'esposizione avviene soprattutto per via cutanea e quindi gli AOELs rappresentano una dose interna espressa come mg/kg di peso corporeo
3. gli OELs vengono stabiliti come concentrazioni ponderate sulle 8 ore al giorno, per 40 ore alla settimana, mentre gli AOELs si riferiscono ad una esposizione di un giorno di lavoro
4. gli AOELs si applicano anche ai cosiddetti "astanti", cioè alla popolazione non esposta per ragioni professionali che si trovi ad essere occasionalmente esposta durante i trattamenti
5. gli AOELs vengono stabiliti senza tenere conto di elementi di fattibilità economica e tecnica.

### Il contesto legislativo

La Direttiva Europea 91/414, relativa all'immissione in commercio dei prodotti fitosanitari (recepita in Italia con il D.L. 194/95), stabilisce alcune regole circa la composizione dei prodotti, il loro uso e la valutazione del rischio di potenziali effetti su uomo e ambiente. I principi attivi rispondenti alle condizioni stabilite vengono iscritti in una lista positiva (Allegato I) che autorizza produzione e uso in Europa, previa valutazione nazionale a livello degli Stati Membri. Tale autorizzazione non viene concessa qualora la stima dell'esposizione per l'operatore, nelle condizioni d'uso proposte, superi l'AOEL, ovvero "la quantità massima di sostanza a cui l'operatore può essere esposto senza effetti avversi per la salute".

### Il progetto

Alla luce della necessità di sviluppare un metodo standardizzato e una base scientifica di riferimento, nel 1998 è stato sponsorizzato dalla Commissione Europea un progetto per sviluppare una procedura standardizzata per definire gli AOELs in Europa. Il consorzio di ricerca era costituito da Italia (ICPS - coordinatore), Olanda (TNO, Zeist), Regno Unito (Università di Leicester), Germania (GSF di Monaco) e Finlandia (FIOH, Helsinki).

---

## Il "Guidance Document"

Il confronto tra i vari Paesi partecipanti ha portato alla redazione, alla fine del 2000, di un documento comune su gran parte degli argomenti trattati, ad eccezione di alcuni aspetti relativi al meccanismo di estrapolazione dai dati sperimentali su cui non si è raggiunta una posizione comune. Il Documento è stato portato in discussione presso gli Stati membri ed il processo di revisione ha portato a una versione definitiva del "Guidance Document" da parte della Commissione Europea che gli Stati Membri utilizzano nel corso del processo decisionale di autorizzazione dei prodotti fitosanitari.

---

## Criteri di definizione dell'AOEL

1. L'AOEL è definito come una dose interna globale espressa in mg/kg/die; che risulta dalla somma delle dosi assunte attraverso differenti vie di esposizione. Solo per i gas vengono invece stabiliti limiti di concentrazione nell'aria, concettualmente simili agli OELs;
2. gli AOELs sono limiti "health-based" che vengono stabiliti sulla base dei dati tossicologici sull'animale prodotti secondo protocolli standardizzati;
3. l'effetto avverso "critico" deve essere identificato e riflettere l'end point tipico della sostanza in questione. Su questa base è possibile stabilire il tipo di studio ed il NOEL/NOAEL da cui derivare l'AOEL;
4. la definizione quantitativa dell'AOEL a partire dal NO(A)EL, avviene con l'utilizzo di "fattori di incertezza" o "fattori di estrapolazione" il cui impiego discrezionale da parte del valutatore avviene secondo criteri definiti nelle linee guida.

---

## Sviluppi futuri

Il "Guidance Document" sviluppato dalla CE per definire l'AOEL potrà essere ulteriormente sviluppato ed affinato man mano che si renderanno disponibili maggiori informazioni relative a:

- effetti derivanti da esposizioni brevi, intermittenti e a basse dosi
- chiarimento della tossicocinetica di molti principi attivi
- studi meccanicistici per meglio chiarire la rilevanza delle estrapolazioni interspecie
- valutazioni di specifici end points tossicologici (endocrini, immunotossici, neurotossici)
- effetti di esposizioni multiple e combinate
- definizione migliore dell'incertezza, per evitare approcci eccessivamente conservativi

---

## Bibliografia essenziale

- 1) Recommended Method For The Establishment Of Acceptable Operator Exposure Levels (Aoels). August 2000. FAIR PL98-3663. A shared-cost action under the FAIR (Food, Agriculture and Fisheries) programme of the European Union 4th Framework Programme for Research and Technological Development, managed by Directorate General VI. Final document under discussion.
- 2) Development of Criteria to Establish Health-Based Occupational Exposure Limits for Pesticides. (PROJECT FAIR CT98-3663). June 1st, 1998 - August 30, 2000. Final document under discussion.