

P. Apostoli<sup>1</sup>, R. Bergonzi<sup>1</sup>, S. Catalani<sup>1</sup>, G. Neri<sup>1</sup>, M. Sarnico<sup>1</sup>, V. Foà<sup>2</sup>, S. Fustinoni<sup>2</sup>, A. Colombi<sup>2</sup>, M. Buratti<sup>2</sup>, L. Campo<sup>2</sup>, L. Scibetta<sup>2</sup>, N. Sannolo<sup>3</sup>, M. Pieri<sup>3</sup>, A. Basile<sup>3</sup>, G.B. Bartolucci<sup>4</sup>, M. Carrieri<sup>4</sup>, M.L. Scapellato<sup>4</sup>, P. Manini<sup>5</sup>, D. Poli<sup>5</sup>, M. Corradi<sup>5</sup>, R. Andreoli<sup>5</sup>, M. Goldoni<sup>5</sup>, A. Mutti<sup>5</sup>, M. Imbriani<sup>6</sup>, S. Ghittori<sup>6</sup>, L. Maestri<sup>6</sup>, S. Negrì<sup>6</sup>, E. Pira<sup>7</sup>, I. Pavan<sup>7</sup>, G. Discalzi<sup>7</sup>, L. Perbellini<sup>8</sup>

## Nuovi indicatori di esposizione

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

<sup>2</sup> Dipartimento di Medicina del Lavoro, Igiene Industriale e Tossicologia, Università degli Studi di Milano

<sup>3</sup> Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Medicina del Lavoro, Igiene e Tossicologia Industriale, Seconda Università degli Studi di Napoli

<sup>4</sup> Dipartimento di Medicina Ambientale e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Padova

<sup>5</sup> Dipartimento di Clinica Medica, Nefrologia e Scienze della Prevenzione, Laboratorio di Tossicologia Industriale, Università degli Studi di Parma

<sup>6</sup> Dipartimento di Medicina Preventiva Occupazionale e di Comunità, Università degli Studi di Pavia

<sup>7</sup> Dipartimento di Ortopedia e Medicina del Lavoro, Università degli Studi di Torino

<sup>8</sup> Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica, Medicina del Lavoro Università degli Studi di Verona

**RIASSUNTO.** Abbiamo definito nuovi indicatori di esposizione (NIE) a) indicatori validati negli ultimi cinque anni e quindi entrati nelle possibilità analitiche dei laboratori che hanno partecipato allo studio; b) indicatori già proposti, di cui si sia dimostrata l'applicabilità in situazioni in cui non erano stati testati precedentemente, con particolare riferimento alla bassa e bassissima esposizione che sempre più spesso caratterizzano gli ambienti di lavoro; c) indicatori già in uso però misurati in matrici diverse da quelle originali. Gli indicatori sono stati suddivisi in elementi metallici e loro specie, composti organici e loro metaboliti, dosaggi di miscele di elementi e di composti organici, dosaggi in nuove matrici, e sono stati esaminati i risultati conseguiti dal 1999 al 2004 dai gruppi di Brescia, Milano, Napoli, Padova, Parma, Pavia, Torino e Verona. Sono stati così individuati e presentati i NIE di 14 elementi-composti-metaboliti, quattro esempi di miscele, uno di speciazione, tre di nuove matrici, riportando per ognuno in modo particolare il campo di applicazione, i metodi analitici, i risultati in relazione al monitoraggio ambientale, il miglioramento rispetto ai "vecchi" indicatori, la relazione con gli effetti, i valori di riferimento. Sono stati infine discussi interesse, praticabilità ed accessibilità degli indicatori, sottolineando come la ricerca nel campo dei NIE appare cruciale per lo sviluppo stesso del monitoraggio biologico, procedura centrale nella valutazione del rischio e nella sorveglianza sanitaria degli esposti ad agenti chimici pericolosi.

**Parole chiave:** monitoraggio biologico, indicatori biologici di esposizione, valutazione del rischio, medicina del lavoro.

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

**NEW BIOMARKERS OF EXPOSURE.** In this paper we have defined the new biomarkers of exposure (NBE) as those biomarkers discovered in the last five years and, among previously validated biomarkers, also those applied in different ranges of doses or those determined in biological matrices which differ from matrices originally considered. We examined the results from the surveys carried out by the main Italian research units involved in biological monitoring, i.e. those from the Universities of Brescia, Milan, Naples, Padua, Parma, Pavia, Turin and Verona. The data were collected using a standardized model and included the following: type of element or organic compound, type of biomarker, analytical technique and method, their relationship with environmental monitoring data, their relationship with effect indicators or effects in general, improvement with respect to old biomarkers, reference values. Twenty two NBEs were identified: 14 elements and chemical compounds as such or as metabolites, 4 examples of mixtures, 3 of new matrices, one of speciation. Among the others, aspects such as interest in requiring NBE, quality assurance, availability, cost-benefit ratio were discussed. We conclude that development of this specific field of research appears to be a crucial point for future improvement in risk assessment and health surveillance procedures.

**Key words:** biological monitoring, exposure biomarkers, risk assessment, occupational health.

### 1. Introduzione

Gli indicatori biologici (*biomarkers*) di xenobiotici di interesse occupazionale sono tradizionalmente classificati come indicatori di esposizione, di effetto e di suscettibilità. Gli indicatori biologici di esposizione (IBE), a loro volta, sono stati suddivisi in indicatori di esposizione vera e propria, di dose interna, di accumulo. I primi sono anche stati definiti come la misurazione con analisi chimiche dei tossici o dei loro metaboliti nelle matrici biologiche (sangue, urine, aria espirata, sudore, annessi cutanei); quelli di dose interna come indicatori in grado di valutare la concentrazione dei tossici in uno o in più compartimenti dell'organismo; quelli di accumulo come indicatori che, misurando il deposito degli xenobiotici in specifici organi-apparati, possono dare conto del loro carico corporeo. Va ricordato comunque che il significato assunto dai vari tipi di indicatori dipende da variabili diverse, quali la matrice biologica, il tempo trascorso dalla fine dell'esposizione, il tempo di prelievo.

Gli IBE complessivamente considerati sono sicuramente i *biomarkers* più utilizzati e per i quali maggiori sono le sollecitazioni, per aumentarne quantità e qualità, da parte di chi si occupa di valutazione del rischio e sorveglianza sanitaria per agenti chimici pericolosi, Medici del Lavoro *in primis*.

Tra le ragioni di questo rinnovato interesse, possono essere richiamate:

- l'obsolescenza di molti tradizionali IBE, quali alcuni metaboliti ed alcuni elementi metallici, collegata alla ormai nota contrazione delle esposizioni e delle dosi di xenobiotici occupazionali e quindi alla necessità di avere a disposizione IBE più sensibili/specifici;
- la richiesta di IBE per un numero sempre maggiore di xenobiotici;
- l'aspirazione a disporre di indicatori biologici (possibilmente integrati ed in grado di correlarsi con gli eventuali effetti combinati) idonei allo studio dell'esposizione a miscele;
- l'aspirazione a disporre di indicatori di dose efficace, cioè in grado di quantificare la quantità attiva dal punto di vista bio-tossicologico;

- l'accessibilità a matrici diverse da quelle originariamente esaminate e nelle quali i tradizionali IBE garantiscono un migliore apporto conoscitivo.

La sopra richiamata diminuzione delle esposizioni, invece di rappresentare il motore dello sviluppo della ricerca applicata nel campo degli IBE, ha finito per scoraggiarne, in certa misura, lo sviluppo facendo, curiosamente, prevalere la convinzione che, non essendo più utili gli IBE tradizionali, non vi fosse più bisogno di IBE in quanto tali. Vi era e vi è in realtà semplicemente bisogno di più adeguati (nuovi) IBE. Un'altra esigenza che dovrebbe spingere verso lo sviluppo degli IBE deriva dalla necessità di valutare le esposizioni, in genere basse, per xenobiotici presenti anche nell'ambiente generale di vita e/o derivanti dall'alimentazione e/o da abitudini voluttuarie. In questo contesto lo sviluppo di adeguati IBE si accompagna a quello di adeguati valori di riferimento per elementi metallici, sostanze organiche tal quali, loro specie o metaboliti, allo scopo di pervenire ad una sempre più puntuale definizione dell'effettivo grado dell'esposizione occupazionale.

Per cercare di capire come si colloca la capacità della nostra Disciplina di rispondere ad alcune delle domande esplicite od implicite sopra tratteggiate, abbiamo esaminato i risultati conseguiti nel campo degli IBE dal 1999 al 2004 da alcuni gruppi di ricerca italiani attivi in questo specifico campo di ricerca.

---

## 2. Metodi

### 2.1 Definizioni

Abbiamo convenzionalmente definito come nuovi indicatori di esposizione (NIE):

- indicatori scoperti o introdotti nell'uso negli ultimi cinque anni come elementi metallici o composti organici tal quali, loro miscele, loro metaboliti, specie o prodotti di reazioni;
- indicatori già noti dosati in matrici biologiche diverse da quelle originali;
- indicatori già proposti, ma di cui si sia stata dimostrata l'applicabilità in situazioni in cui non erano stati testati precedentemente, con particolare riferimento alle basse e bassissime esposizioni che sempre più spesso caratterizzano gli ambienti di lavoro.

### 2.2 Individuazione e presentazione dei NIE

Seguendo la definizione sopra riportata i NIE sono stati suddivisi in:

- elementi metallici
- specie di elementi metallici
- composti organici tal quali
- metaboliti di composti organici
- miscele di xenobiotici
- IBE già noti, dosati in nuove matrici biologiche

Si è poi passati alla definizione dei criteri per la raccolta delle informazioni riguardanti i NIE, definendone i campi principali in:

- tipo di elemento/composto
- tipo di indicatore
- ambito di applicazione
- tecnica e metodi analitici
- relazione con il monitoraggio ambientale
- relazione con effetti (indicatori di effetto)
- miglioramento rispetto a indicatori noti
- valori di riferimento

Ogni gruppo di ricerca ha compilato le tavole sinottiche che sintetizzavano le informazioni relative ai NIE proposti ed ha redatto una breve nota informativa completa di riferimenti bibliografici. Hanno partecipato a questo studio le unità di ricerca di Igiene e Tossicologia Industriale delle Università di Brescia, Milano, Napoli, Padova, Parma, Pavia, Torino e Verona.

---

## 3. Elementi metallici, composti organici, metaboliti

### 3.1 Berillio urinario

Il numero di attività industriali in cui è stata dimostrata un'esposizione professionale a Berillio (Be) è aumentata negli ultimi vent'anni, probabilmente a seguito del miglioramento della loro identificazione (1). Kauppinen *et al.* (2) ad esempio, hanno dimostrato che il numero di lavoratori finlandesi professionalmente esposti a Be è dello stesso ordine di grandezza di quello degli esposti a fibre ceramiche. Per garantire l'accuratezza nel monitoraggio biologico delle basse esposizioni a Be, sono necessari metodi analitici ad elevata sensibilità e specificità e l'adozione di tecniche più sensibili, quali la spettrometria di massa accoppiata al plasma (ICP-MS) che ha portato al miglioramento dei dosaggi del Be nelle urine (BeU), consentendo di dosarlo in concentrazioni dell'ordine di 0,02-0,03 µg/l, valore notevolmente inferiore a quello misurato nella popolazione generale a fine anni '80 (3-5). In uno studio condotto dall'Università di Brescia in collaborazione con quella di Nurnberg su lavoratori metallurgici è stata dimostrata una correlazione significativa tra le concentrazioni ambientali (comprese nell'intervallo tra 0,3 e 0,9 µg/m<sup>3</sup>) e quelle del BeU, permettendo di calcolare un'escrezione urinaria intorno a 0,15 µg/l per concentrazioni ambientali corrispondenti al TLV-TWA di 2 µg/m<sup>3</sup> (6). È oggi possibile affermare che: (i) concentrazioni urinarie di Be comprese nell'intervallo 0,03-0,05 µg/l sono dosabili mediante ICP-MS; (ii) agli attuali livelli ambientali di 2 µg/m<sup>3</sup>, l'intake giornaliero è di circa 2 µg/giorno, e l'escrezione urinaria dello stesso ordine di grandezza; (iii) il dosaggio del BeU è utile per meglio interpretare alcune evidenze cliniche, come quelle immunologiche, correlate all'esposizione all'elemento.

### 3.2 Tungsteno urinario

L'applicazione di metodiche analitiche in ICP-MS ha reso possibile il deciso miglioramento dei dosaggi di un altro elemento come il tungsteno (W) nelle urine di lavoratori. Le correlazioni evidenziate tra i livelli di tungste-

no urinario (WU) ed i rispettivi valori ambientali sono risultate molto variabili in funzione della solubilità della specie in cui si trova l'elemento e, di conseguenza, della sua biodisponibilità che è maggiore per il tungsteno, intermedia per il carburo di tungsteno (WC) e minore per il W metallico. Va sottolineato come il WC, relativamente poco solubile è però biologicamente molto attivo specie nei tessuti di deposito (ed anche critici) come il polmone (7). Indagini condotte presso l'Università di Brescia hanno riguardato diversi gruppi di lavoratori esposti a W nella produzione e lavorazione di inserti diamantati. Non si sono dimostrate correlazioni molto buone con le concentrazioni ambientali, anche per la presenza frequente di fonti di assorbimento diverse da quella aerea. In alcuni addetti alla finitura di inserti diamantati con esposizione molto contenuta, sono stati misurati livelli di WU nell'intervallo 0,001-0,02 µg/l, a fronte di concentrazioni nell'aria di 0,05-6,5 µg/m<sup>3</sup>. In altri gruppi caratterizzati da maggiori esposizioni (15-80 µg/m<sup>3</sup>), si sono riscontrati valori di WU compresi tra 2.8 e 47 µg/l. Pur in presenza di elevata variabilità interindividuale e di scarsa correlazione con i valori di W nell'aria resta a nostro avviso valida comunque l'indicazione di un dosaggio dell'indicatore su base individuale con dato da utilizzare per interpretare eventuali effetti, specie quelli da esposizioni combinate con il cobalto.

### 3.3 Gas anestetici: sevoflurano e desflurano

Per il sevoflurano (S) l'indicatore biologico di esposizione più affidabile sembra essere l'alcool esafluoroisopropilico (HFIP) urinario, che risulta ben correlato con i livelli ambientali; per questo metabolita, non è necessario esprimere il dato in funzione della creatinina urinaria (8, 9). Il meccanismo plausibile di escrezione urinaria, trattandosi di un alcool, è rappresentato dalla semplice diffusione regolata dal coefficiente di ripartizione sangue/urina: questo meccanismo non risente della variabile diluizione dell'urina stessa, come avviene invece per altri metaboliti, in particolare acidi. Dai risultati di uno studio condotto in alcune sale operatorie di ospedali lombardi su 145 soggetti professionalmente esposti a S (8), è stata riscontrata una correlazione significativa tra la concentrazione di HFIP nelle urine prodotte nel corso dell'esposizione ( $C_{urina}$ , µg/l) e la concentrazione ambientale di S ( $C_{ambiente}$ , ppm):  $\text{Log } C_{urina} = 0,813 \times \text{Log } C_{ambiente} + 2,517$  ( $n = 145$ ;  $r = 0,79$ ;  $p < 0,0001$ ). Utilizzando il limite fiduciale inferiore, al fine di calcolare un valore di limite biologico equivalente più restrittivo, sono stati ottenuti i seguenti valori di HFIP: 465 µg/l e 173 µg/l corrispondenti rispettivamente ad un'esposizione a S di 2 e 0,5 ppm. Un altro studio effettuato in ospedali veneti (10) ha confermato l'esistenza di buone correlazioni di tipo lineare tra concentrazione di HFIP nelle urine di fine turno e concentrazione ambientale di S ( $y = 0,308x + 0,034$ ;  $n = 101$ ;  $r = 0,65$ ;  $p < 0,001$ ); lo stesso studio ha evidenziato significative correlazioni anche tra l'esposizione ambientale e il S tal quale nelle urine ( $y = 3,491x + 1,111$ ;  $n = 103$ ;  $r = 0,44$ ;  $p < 0,001$ ), anche se con una certa dispersione dei dati in quanto il suo dosaggio a fine

turno può risentire di eventuali picchi espositivi al termine della seduta operatoria. Tale situazione può spiegare valori di S nelle urine di fine turno piuttosto alti, anche in considerazione del tempo di emivita assai rapido della sostanza.

L'introduzione del desflurano (D) nelle tecniche anestesologiche è in linea con la tendenza a ricercare nuovi farmaci che consentano un controllo ottimale dell'anestesia e inducano minori effetti tossici. Rispetto agli altri gas anestetici alogenati, il D possiede sei atomi di fluoro, che conferiscono alla molecola una maggiore stabilità, nonché un punto di ebollizione ed un peso molecolare più bassi. Inoltre, il D dà luogo ad una scarsa metabolizzazione (0,02% della dose assorbita). Recentemente, 21 soggetti sono stati sottoposti a monitoraggio ambientale e biologico per la valutazione dell'esposizione a D nel corso delle rispettive attività in sala operatoria, durante la somministrazione di anestetico per interventi di chirurgia generale (11). Le concentrazioni di D sono state stimate per mezzo di campionatori passivi posti in zona respiratoria del lavoratore. Il monitoraggio biologico è stato effettuato mediante dosaggio dell'escrezione urinaria di D immodificato alla fine del turno operatorio. È stata riscontrata una correlazione significativa tra la concentrazione di D nelle urine prodotte nel corso dell'esposizione ( $C_{urina}$ , µg/l) e la concentrazione ambientale dell'anestetico stesso ( $C_{ambiente}$ , ppm):  $\text{Log } C_{urina} = 0,914 \times \text{Log } C_{ambiente} - 0,16$  ( $n = 221$ ;  $r = 0,916$ ;  $p < 0,0001$ ). Dall'equazione della retta di regressione, si ricava che ad una concentrazione ambientale di D pari al TLV-TWA di 2 ppm corrisponde una concentrazione urinaria di 1,3 µg/l.

### 3.4 Ciclofosfamide

Il monitoraggio dei farmaci chemioterapici antitumorali (CA) aerodispersi non fornisce utili indicazioni sull'esposizione degli addetti. Le Linee Guida Italiane per la manipolazione in sicurezza dei CA (G.U. del 7/10/1999) prevedono la determinazione di alcuni farmaci considerati traccianti dell'esposizione a tutti i CA utilizzati. Fra questi, quello a cui si fa più frequentemente ricorso, sia per la pericolosità della sostanza che per il rilevante utilizzo clinico, è il dosaggio della ciclofosfamide (CF) urinaria che rappresenta un buon indicatore di esposizione in quanto consente di tenere conto delle dosi cumulative assorbite dall'operatore attraverso le diverse vie e di valutare l'efficacia dei sistemi di protezione individuale e la correttezza delle procedure di lavoro seguite.

Da uno studio condotto in vari siti di preparazione e somministrazione (12) si è rilevato che, a fronte di diversi quantitativi di farmaci manipolati (da 140 a 8000 mg) e di differenziati livelli di contaminazione di superfici (wipe test:  $< 0,1 - 2001,68 \text{ ng/cm}^2$ ) e indumenti (pads:  $< 0,1 - 94,28 \text{ ng/cm}^2$ ), sono stati riscontrati nella quasi totalità dei lavoratori esaminati (con una sola eccezione) livelli di CF urinaria inferiori al limite di rilevabilità della metodica utilizzata (1 µg/l). Il solo caso nel quale è stato trovato un valore indice di un qualche assorbimento del farmaco (2,29 µg/l) era relativo ad un somministratore per il quale era stata evidenziata una

contaminazione significativa della flebo manipolata e che non usava idonei dispositivi di protezione individuale ed indossava una divisa spezzata a maniche corte. Benché la metodica utilizzata in questo studio (GC-MS) non sia particolarmente sensibile (13), anche tecniche analitiche più sofisticate (GC-MS/MS, HPLC-MS/MS) consentono di rilevare valori dosabili di CF, solo in pochissimi casi (14). Uno studio multicentrico nazionale più recente ha evidenziato una ulteriore riduzione dell'esposizione a CF negli ultimi anni (15). Pertanto, la pratica del monitoraggio biologico dell'esposizione ad antiblastici non dovrebbe essere incoraggiata, destinando le risorse risparmiate a più congrue iniziative, per favorire l'adozione di corrette procedure di preparazione dei farmaci antiblastici.

### 3.5 Tricloroetilene

L'esposizione occupazionale a tricloroetilene (TCE) può essere valutata attraverso la misura della concentrazione urinaria della quota immodificata del solvente. In uno studio effettuato su 49 lavoratori (16), è stata osservata una correlazione significativa tra la concentrazione ambientale ( $C_{\text{ambiente}}$ ,  $\text{mg}/\text{m}^3$ ) di TCE e la concentrazione urinaria ( $C_{\text{urina}}$ ,  $\mu\text{g}/\text{l}$ ) dello stesso. Dalla retta di regressione:  $C_{\text{urina}} = 0.081 \times C_{\text{ambiente}} + 4.27$  si ricava che ad una esposizione a TCE pari al valore TLV-TWA di  $269 \text{ mg}/\text{m}^3$  corrisponde una concentrazione urinaria di  $26.0 \mu\text{g}/\text{l}$ .

### 3.6 Percloroetilene

Per il monitoraggio biologico dell'esposizione a percloroetilene (PCE), il solvente tal quale dosato in sangue o urina risulta un indicatore specifico ed affidabile: il PCE ematico (in  $\text{mg}/\text{l}$ ) ed urinario (in  $\text{mg}/\text{l}$ ) sono risultati ben correlati con l'esposizione ambientale (espressa in  $\text{mg}/\text{m}^3$ ), in particolare se dosati al termine della settimana lavorativa, il primo il venerdì a inizio turno ( $y = 0,003x + 0,145$ ;  $n = 71$ ;  $r = 0,70$ ;  $p < 0,001$ ) ed il secondo il giovedì a fine turno ( $y = 0,0003x + 0,009$ ;  $n = 72$ ;  $r = 0,68$ ;  $p < 0,001$ ). L'acido tricloroacetico (TCA) urinario non risulta invece ben correlato con l'esposizione, in quanto indicatore non specifico; è infatti, come è noto, metabolita anche del TCE che è spesso presente come impurezza nel PCE, con conseguente aumento dei livelli di escrezione di TCA urinario non riconducibili alla sola esposizione a PCE (17).

### 3.7 N,N-Dimetilformammide

La N,N-dimetilformammide (DMF) è un solvente utilizzato nelle lavorazioni industriali per la preparazione di tessuti e di pelli sintetiche. Questo solvente può essere facilmente assorbito sia attraverso l'apparato respiratorio, che attraverso la cute. Gli indicatori più comunemente utilizzati (N-idrossimetil-N-metilformammide, N-idrossimetilformammide) permettono di valutare l'esposizione giornaliera; al contrario, il mercapturato specifico della DMF, la N-acetil-S-(N-metil-carbamoil)ci-

steina (AMCC), permette di stimare la dose media settimanale del solvente. Recenti studi (18) hanno valutato il potenziale utilizzo dell'AMCC urinaria come indicatore di esposizione a DMF. La concentrazione ambientale della DMF, valutata come media ambientale ponderata sulle 8 ore, era compresa tra  $0,4$  e  $75,2 \text{ mg}/\text{m}^3$  con una mediana pari a  $8,9 \text{ mg}/\text{m}^3$ . Una correlazione significativa è stata evidenziata confrontando i valori di AMCC misurati nei campioni urinari raccolti il venerdì mattina ( $\text{AMCC}_{\text{venerdì mattina}} (\text{mg}/\text{l}) = 1,384 \times \text{DMF} (\text{mg}/\text{m}^3) + 8,708$ ;  $r^2 = 0,47$ ;  $p < 0,008$ ) e il valore medio ponderato settimanale dell'esposizione a DMF. La determinazione urinaria dell'acido mercapturato specifico potrebbe fornire informazioni circa la presenza e la biodisponibilità del metil-isocianato e quindi, indirettamente, della sua potenziale genotossicità.

### 3.8 N,N-Dimetilacetammide

L'acido S-acetamido-metilmercapturato (AMMA) è stato recentemente identificato come rilevante metabolita della N,N-dimetilacetammide (DMA) (19). Questo solvente è spesso utilizzato insieme alla DMF nella sintesi di fibre tessili sintetiche del gruppo acrilico. Benché in ambito sperimentale la DMF si sia sempre dimostrata più "tossica" della DMA, non sono ancora state trovate sufficienti motivazioni che permettano di propendere per il secondo dei due solventi. Infatti, mentre la metabolizzazione della DMF ad AMCC passa attraverso la formazione di molecole di metil-isocianato (paragrafo 3.7), l'AMMA si forma dalla DMA per coniugazione diretta della N-metilacetammide al glutatione. Questo processo metabolico sembra molto più "sicuro" di quello della DMF, poiché non darebbe luogo a prodotti intermedi pericolosi quali il metil-isocianato. L'emivita urinaria dell'AMMA è di circa 35 ore, ed è più lunga di quella della N-metilacetammide (il metabolita comunemente utilizzato per il monitoraggio biologico delle esposizioni a DMA). Tale caratteristica permette di sottolineare che l'AMMA esprime esposizioni a DMA di più giorni lavorativi, probabilmente di un'intera settimana.

### 3.9 2,5-Esandione

Attraverso l'applicazione della cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC/MS) è oggi possibile studiare i metaboliti di fase II dei solventi organici (glicuronidi, solfati, mercapturati) senza ricorrere a procedure analitiche, quali l'idrolisi del campione e la derivatizzazione degli analiti, che in alcuni casi portano alla formazione di artefatti. Se da un lato questo ha consentito la caratterizzazione di nuovi metaboliti e la validazione di NIE, dall'altro ha permesso una nuova e più corretta reinterpretazione di "vecchi" indicatori di esposizione. È questo il caso del metabolita del n-esano, il 2,5-esandione (2,5-HD), a proposito del quale la comunità scientifica si divideva tra i sostenitori del 2,5-HD "totale" e di quello "libero", entrambi ben correlati con l'esposizione. Mediante l'utilizzo della tecnica LC-MS sono stati identificati ben quattro glicuronidi (-G) nel-

l'urina di ratti esposti a *n*-esano: 2-esanolo-G, 2,5-esandiolo-G, 5-idrossi-2-esanone-G e 4,5-diidrossi-2-esanone-G (20). È stato dimostrato che gli ultimi due glicuronidi, se isolati e sottoposti ad idrolisi, davano luogo alla formazione artificiale di 2,5-HD e  $\gamma$ -valerolattone. L'importante conclusione che è stata tratta da questi studi è che il 2,5-HD "libero", esente da artefatti analitici e meglio correlato con gli effetti neurotossici del *n*-esano, rappresenta un NIE migliore del vecchio 2,5-HD "totale", dal momento che i metaboliti coniugati vengono rapidamente eliminati e non comportano alcun rischio di neurotossicità (21). Dallo scorso anno, l'ACGIH propone il 2,5-HD "libero" come indicatore di esposizione a *n*-esano e *n*-butil- metil-chetone.

### 3.10 Stirene

Il metabolismo dello stirene nell'uomo è stato rivisitato e completato grazie all'utilizzo della tecnica LC/MS, con l'identificazione di "nuovi" metaboliti coniugati, quali gli acidi mercapturici, ed i glicurono- e solfo-coniugati del 4-vinilfenolo (21, 23). Una via minore del metabolismo dello stirene nell'uomo è quella che prevede la coniugazione dello stirene-7,8-ossido (7,8-SO) con glutatione e successiva escrezione degli acidi mercapturici N-acetil-S-(1-fenil-2-idrossietil)-L-cisteina (M1) e N-acetil-S-(2-fenil-2-idrossietil)-L-cisteina (M2), ognuno dei quali presente in due forme diastereoisomeriche. L'escrezione dei mercapturati dello stirene è fortemente influenzata dal polimorfismo genetico della glutatione-S-transferasi GSTM1-1 (24-27). Benché siano stati proposti due diversi indici biologici di esposizione (IBE) per la somma M1+M2 in campioni di urina di fine turno per concentrazioni ambientali di stirene di 20 ppm, ovvero 1330  $\mu\text{g/g}$  creatinina per i soggetti privi di attività GSTM1-1 (*GSTM1null*) e 2878  $\mu\text{g/g}$  creatinina per quelli che esprimono il GSTM1-1 (*GSTM1+*) (26), l'utilizzo dei mercapturati dello stirene come indicatori di esposizione non risulta proponibile nella pratica, richiedendo un prelievo di sangue per la caratterizzazione del polimorfismo genetico.

L'interesse è stato quindi recentemente rivolto verso un'altra via metabolica minore, che passa attraverso l'ossidazione diretta dell'anello aromatico a stirene-3,4-ossido (3,4-SO), con sintesi di 4-vinilfenolo (4-VF), escreto con le urine dopo coniugazione con acido glicuronico e acido solforico. Si ritiene che il 3,4-SO, intermedio altamente reattivo, possa essere implicato nella tossicità dello stirene. Il 4-VF è ritenuto un indicatore specifico di esposizione a stirene, in quanto è l'unico metabolita che non deriva né dall'etilbenzene né dal 7,8-SO. L'escrezione dei coniugati del 4-VF (glicuronide e solfato) è stata studiata in 174 lavoratori e 26 volontari esposti a stirene (28). Le concentrazioni di 4-VF sono risultate ben correlate con quelle degli altri indicatori di esposizione e sembrano correlarsi anche con gli effetti genotossici dello stirene, in particolare con il numero di micronuclei, correlazione modulata dal genotipo *NQO1* (29). Nonostante l'attesa specificità dell'indicatore, concentrazioni non trascurabili di 4-VF sono state misurate nelle urine di

soggetti non professionalmente esposti a stirene. Tali concentrazioni risultavano particolarmente elevate nei soggetti fumatori, essendo il 4-VF un importante costituente del fumo di sigaretta (31,3  $\mu\text{g/sigaretta}$ ).

Alla luce di questo risultato, i principali metaboliti urinari dello stirene, gli acidi mandelico e fenilgliossilico (AM e AFG) si confermano come gli indicatori più sensibili ed affidabili per il monitoraggio delle basse esposizioni a stirene. L'utilizzo della LC-MS in questo caso ha consentito un miglioramento della sensibilità analitica di circa tre ordini di grandezza, con il risultato che le concentrazioni di AM e AFG possono essere misurate anche nella popolazione generale. Gli intervalli di riferimento ottenuti per AM e AFG sono rispettivamente 0,084-2,339 e 0,009-1,238 mg/g creatinina (30). Questo esempio dimostra che la determinazione dei valori di riferimento e la caratterizzazione di esposizioni professionali a basse concentrazioni richiedono tecniche analitiche sufficientemente sensibili e selettive.

### 3.11 1,3-Butadiene

L'esposizione a 1,3-butadiene (BD) riguarda sia i lavoratori dell'industria petrolchimica, dove è utilizzato per la sintesi di polimeri, che la popolazione generale, dal momento che il BD è presente nei gas di scarico degli autoveicoli e nel fumo di sigaretta. Come indicatori biologici di esposizione a BD sono stati valutati BD nell'aria esalata, BD tal quale nel sangue e nell'urina, gli acidi mercapturici N-acetil-S-(3,4-idrossibutil)-L-cisteina (MI) e N-acetil-S-(1-idrossi-2-propenil)-L-cisteina e N-acetil-S-(2-idrossi-3-butenil)-L-cisteina (MII), e gli addotti all'emoglobina (31-33). A fronte di esposizioni personali molto basse (media 1,5  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  per lavoratori di un'industria petrolchimica e 0,4  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  per soggetti di controllo), BD tal quale nel sangue e nell'urina si sono mostrati gli unici indicatori in grado di differenziare le casistiche indagate e sono risultati fortemente associati tra loro ( $r = 0,8$ ).

### 3.12 Toluene

Per il monitoraggio biologico dell'esposizione a toluene sono correntemente adottate la determinazione dell'acido ippurico e dell'orto-cresolo urinari (ACGIH) e quella dell'orto-cresolo urinario e del toluene ematico (DFG). Il toluene urinario è stato messo a confronto con il toluene ematico e con l'orto-cresolo urinario per valutare vantaggi e svantaggi di ciascun indicatore (34, 35). A questo scopo sono stati studiati lavoratori addetti alla stampa rotocalcografica, esposti a toluene aerodisperso nell'intervallo 3-309 mg/m<sup>3</sup>. Il toluene urinario misurato su campioni estemporanei di urina raccolta alla fine del turno di lavoro è risultato ben correlato con gli altri indicatori biologici; la sua correlazione con l'esposizione ( $r \sim 0,8$ ) è risultata simile a quella ottenuta per il toluene ematico e superiore a quella dell'orto-cresolo urinario ( $r \sim 0,6$ ). Inoltre l'orto-cresolo urinario, al contrario degli altri due indicatori, è risultato influenzato dall'abitudine al fumo di sigaretta.

Il dosaggio del toluene presente nell'aria espirata di lavoratori esposti può essere effettuato attraverso un metodo semplice, rapido e sensibile, sviluppato recentemente (36). Lo strumento utilizzato consiste di una vial di vetro da 58 ml con al suo interno una cartuccia di Tenax. Quest'ultima funziona da campionatore passivo una volta che una quota di aria espirata è raccolta e sigillata nella vial. L'aria espirata è stata raccolta in fabbrica la mattina del giorno dopo l'esposizione a toluene. I livelli ambientali del solvente in questione erano compresi tra 13 e 191 mg/m<sup>3</sup>, mentre le concentrazioni nell'aria alveolare, nel sangue e nelle urine variavano rispettivamente tra 159 e 3354 ng/l; 3,6 e 53,5 µg/l; 8,7 e 142,4 µg/l. È stata riscontrata una correlazione significativa tra la concentrazione del toluene nell'aria alveolare e la concentrazione ambientale di toluene del giorno precedente (gp):  $Toluene_{alveolare} (ng/l) = 13.82 \times Toluene_{ambientale(gp)} (mg/m^3) + 675.47$ ; n = 36, r = 0,822, p < 0,0001.

### 3.13 Benzene

Per le sue caratteristiche di tossicità, il benzene riveste una posizione di particolare rilievo tra i solventi di uso industriale e tra gli inquinanti dell'aria urbana. Benché le concentrazioni di benzene siano notevolmente diminuite negli ultimi anni, l'attenzione nei confronti di questo contaminante rimane sempre alta. Numerosi laboratori italiani hanno sviluppato nuove metodiche per il monitoraggio biologico dell'esposizione alle basse dosi di benzene. Dal confronto delle recenti esperienze maturate dai singoli gruppi di ricerca sono emerse alcune importanti considerazioni: (i) le esposizioni a benzene in Italia in ambito urbano si attestano a valori intorno a 3-10 µg/m<sup>3</sup>, mentre quelle professionali sono, nella quasi totalità dei casi, ampiamente inferiori ai valori limite per gli ambienti di lavoro proposti dalla vigente normativa (3200 µg/m<sup>3</sup> o 1 ppm) e dall'ACGIH (TLV-TWA 1600 µg/m<sup>3</sup> o 0,5 ppm); (ii) il fumo di sigaretta rappresenta un'importante fonte di esposizione personale a benzene, il cui peso può superare quello dell'esposizione professionale e la cui influenza sugli indicatori biologici ne può inficiare l'utilizzo; (iii) gli indicatori di esposizione più sensibili sono il benzene urinario (BU), l'acido S-fenilmercapturico (AFM) e l'acido *trans,trans*-muconico (AM).

Il BU nella popolazione generale presenta valori medi compresi tra 40-150 e tra 300-500 ng/l, rispettivamente per i non fumatori e per i fumatori. BU risulta essere un indicatore specifico e sensibile, utilizzabile per distinguere lavoratori caratterizzati da basse esposizioni ambientali, quali addetti a lavori d'ufficio, vigili urbani, benzinai, operai petrolchimici; esso risulta inoltre correlato con l'esposizione e con i metaboliti urinari del benzene (37, 38). La determinazione analitica viene effettuata in GC-MS campionando il benzene nello spazio di testa (39-41). I maggiori problemi dell'impiego di BU sono ascrivibili alla mancanza di risultati pienamente confrontabili tra i diversi laboratori, che consentano l'adozione di un indice biologico equivalente. Sulla base di queste esperienze, infatti, il BU risulta influenzato da vari fattori legati alla gestione del campione in termini di: momento e procedure di

raccolta, tempi e temperature di conservazione, fasi di trattamento ed analisi. Secondo Perbellini *et al.* (42) la semplice acidificazione di un campione di urina di un fumatore aumenta la concentrazione di BU anche di 20-30 volte rispetto al campione non acidificato, evidenziando inoltre come campioni posti a temperature crescenti presentino concentrazioni di BU crescenti. Contrariamente a quanto ci si attenderebbe, campioni mantenuti a temperatura ambiente ed analizzati in tempi successivi (almeno due giorni) mostrano concentrazioni di BU crescenti (Ghittori, dati non pubblicati). È auspicabile un'azione coordinata, per approfondire problemi metodologici ancora aperti ed individuare procedure standardizzate che consentano di ottenere valori confrontabili.

Le concentrazioni urinarie di AFM nei soggetti non esposti, rispettivamente per i non fumatori e per i fumatori, sono 0,3-2 e 3,5-10 µg/g creatinina (BEI ACGIH 25 µg/g creatinina). L'AFM è un indicatore specifico, utilizzabile per distinguere lavoratori caratterizzati da basse esposizioni ambientali e correlato con l'esposizione e con altri indicatori biologici. I dati disponibili non sono però ancora sufficienti a consentire l'individuazione di una soglia di sensibilità dell'AFM rispetto al benzene aerodisperso. La determinazione di AFM richiede sistemi analitici molto sensibili e può essere effettuata utilizzando complesse metodiche di preparazione del campione seguite da analisi in cromatografia liquida con rivelazione a fluorescenza (43), con semplice iniezione in LC-MS (44) o mediante purificazione via HPLC-UV seguita da analisi LC-MS/MS (45). Un approccio analitico meno complesso ed applicabile simultaneamente a parecchi campioni è rappresentato da un sistema immunochimico/luminometrico commercialmente disponibile (Molecular Light Technology, Cardiff, Wales, UK). Questo kit sembra utile per finalità di *screening*, dal momento che esso non fornisce falsi negativi. I risultati positivi (in genere sovrastimati) vanno confermati con metodi cromatografici.

Le concentrazioni urinarie di AM nei soggetti non esposti rispettivamente non fumatori e fumatori si attestano intorno a 45-60 e 80-200 µg/g creatinina (BEI ACGIH 500 µg/g creatinina). È stato ripetutamente confermato che AM risente di interferenze da parte dell'acido sorbico (AS), un conservante ampiamente utilizzato nell'industria alimentare e parzialmente metabolizzato ad AM. Livelli urinari particolarmente elevati di AM nelle urine dei lavoratori possono avere quindi un'origine diversa dall'esposizione a benzene; tuttavia, l'influenza dell'AS può manifestarsi anche per livelli di AM nel range dei valori di riferimento (46-48). AM è quindi poco adatto alla valutazione delle basse esposizioni professionali, ma può essere senz'altro applicato per esposizioni di benzene dell'ordine delle centinaia di µg/m<sup>3</sup>. Un modo per minimizzare l'effetto confondente (variabile individualmente a seconda della dieta) sarebbe quello di stimare per ciascun soggetto la quantità di AS realmente ingerita, in modo da distinguere la quota di AM prodotta per metabolismo dell'additivo da quella dovuta all'esposizione a benzene (49). I risultati ottenuti su due soggetti che hanno consumato AS confermano che, anche nell'uomo, questa sostanza elude in piccola percentuale (< 1%) i sistemi metabolici e viene escre-

ta tal quale con le urine in proporzione alla dose eliminata sotto forma di AM. Questi risultati pongono le basi per un possibile utilizzo del dosaggio di AS urinario come fattore di correzione dei livelli di AM totale misurati in soggetti esposti a basse concentrazioni di benzene.

Il fumo di sigaretta contribuisce in modo rilevante al carico corporeo di benzene e, indipendentemente dall'indicatore utilizzato, rappresenta un interferente da considerare nella valutazione dell'esposizione professionale.

Nonostante ciascuno di questi NIE, singolarmente considerati, presenti problemi analitici o pre-analitici, i risultati integrati di più indicatori consentono di interpretare i dati ottenuti e rendono così possibile il monitoraggio biologico di gruppi di soggetti professionalmente esposti anche a basse concentrazioni. Questo potrebbe risultare assai vantaggioso non solo per i lavoratori e per la popolazione generale esposta, in quanto consente di quantificare la dose - pur modesta - di un cancerogeno noto, ma anche per le aziende, che potrebbero documentare l'evoluzione nel tempo dell'esposizione a benzene.

### 3.14 Esposizione a etilenbisditiocarbammati e etilentiourea

L'esposizione a etilenbisditiocarbammati (EBDTC), fungicidi largamente utilizzati in Italia, e al loro principale metabolita etilentiourea (ETU) riguarda i lavoratori addetti alla loro produzione, gli agricoltori che li utilizzano e, in misura inferiore, la popolazione generale in seguito all'ingestione di cibi contaminati. È stato sviluppato un metodo analitico sensibile e specifico per la determinazione dell'ETU urinaria, che prevede l'estrazione dell'analita dall'urina, la sua derivatizzazione e la successiva analisi in GC-MS. Il metodo è stato applicato con successo sia alla valutazione dell'esposizione professionale (agricoltura) che in soggetti appartenenti alla popolazione generale (50, 51).

### 3.15 3,3-dicloro benzidina

Le ammine aromatiche (AA) sono derivati dall'ammoniaca di cui almeno un atomo di idrogeno è sostituito da un radicale aromatico ed il cui capostipite è l'anilina. Tra i differenti e molteplici effetti patogeni attribuiti alle AA sicuramente di maggior rilevanza è quello correlato alla potenziale azione neoplastica sulla vescica. Ad oggi, l'Unione Europea ha classificato 3 AA come cancerogene certe per l'uomo (benzidina, 2-naftilammina, 4-amminodifenile), 20 AA come probabili cancerogene per l'uomo e 13 AA come possibili cancerogene per l'uomo. L'esposizione a tali composti avviene principalmente in ambito occupazionale, tuttavia una certa esposizione extraprofessionale può avvenire a causa della loro presenza in talune matrici ambientali (cibo, acqua, suolo, cosmetici, medicinali) e, soprattutto, nel fumo di sigaretta.

Con particolare riferimento alle AA certamente cancerogene per l'uomo, occorre rilevare come il D.Lgs. 77/92 ne abbia vietato espressamente la produzione e l'impiego, pur consentendone l'utilizzo in ambito sperimentale: ne consegue che, se da un lato si possono ritenere concluse le

esposizioni importanti, responsabili delle epidemie di tumori vescicali degli anni '60-'70, dall'altro possono continuare ad esistere esposizioni a livelli molto contenuti, ma comunque potenzialmente significativi. Esiste, inoltre, e non è trascurabile, il problema dell'eventuale inquinamento da AA a potenziale azione cancerogena, ad esempio, di coloranti azoici. Da tali considerazioni è derivata la necessità di individuare metodiche in grado di dosare le AA a concentrazioni urinarie pari o inferiori a 1 µg/l, metodiche che, al contempo, consentano di avere elevata sensibilità e specificità, nonché prevedano una facile preparazione del campione. A tal scopo, è stato parzialmente modificato il metodo proposto da Lichtenstein *et al.* (52) che utilizza un sistema GC-MS, con una sensibilità analitica pari a 0,01 µg/l. Tale metodo è stato utilizzato per il monitoraggio biologico di addetti alla preparazione di vernici in polvere, esposti a 3,3'-diclorobenzidina (53). Allo scopo di determinare valori di riferimento, è in corso il dosaggio nelle urine di soggetti professionalmente esposti (100 maschi e 100 femmine, 50 fumatori e 50 non fumatori per ogni gruppo) delle seguenti ammine aromatiche: benzidina, isopropilfenilendiammina, 2-naftilammina, 4-amminodifenile, *o*-toluidina, 3,3'-diclorobenzidina, *p*-amminofenolo, fenil-2-naftilammina, *p*-fenilendiammina, *m*-fenilendiammina (54).

---

## 4. Miscela

### 4.1 Miscela di elementi metallici

La crescente diffusione di tecniche multielemento permette oggi la determinazione di un ampio spettro di analiti sul medesimo campione biologico, anche nel caso di piccoli volumi di campione (urina, sangue intero, siero). La tecnica più usata è l'ICP-MS, che offre, rispetto a quelle che l'hanno preceduta, vantaggi indiscutibili in termini di numero e tipo di elementi misurabili e di bassi limiti di rivelabilità. Molte sono le attività lavorative che causano un'esposizione inalatoria a miscele di metalli. Nella valutazione del rischio e nella sorveglianza sanitaria sarebbe opportuno disporre di analisi biologiche in grado di misurare il maggior numero possibile di elementi di interesse tossicologico (55,56). In questi casi, l'analisi può essere articolata in due tempi: una fase iniziale di *screening* per l'identificazione dei metalli di maggiore interesse tossicologico, ed una più mirata di tipo quantitativo limitata a questi ultimi. L'analisi multielemento può consentire inoltre la determinazione di elementi essenziali e di evidenziare una loro eventuale modificazione indotta dall'aumento di quelli tossici.

Tali tecniche sono state applicate dall'Università di Brescia per il monitoraggio delle concentrazioni urinarie di 13 elementi metallici in due gruppi di lavoratori: uno di addetti ad acciaierie elettriche (57) ed uno a vetrerie (58). Nella prima casistica, le concentrazioni urinarie di tutti i metalli dosati sono risultate sempre inferiori ai limiti (BEI-BAT-EKA). Esse erano generalmente comprese all'interno

dell'intervallo dei valori di riferimento, a conferma delle basse-molto basse esposizioni ambientali in ripetute indagini. I valori più elevati (ai limiti superiori dei valori di riferimento e al di sopra degli stessi) si sono registrati per Pb, Al, Mn, Ni e Ba. In alcuni casi si sono osservate escrezioni di elementi come Sb, Be e Cs. Per i principali e più noti elementi, l'analisi ha quindi consentito di escludere l'assorbimento di quantità tossicologicamente rilevanti, evidenziando però un assorbimento superiore a quello della popolazione generale. Per elementi meno frequentemente reperibili nelle urine, come quelli sopra citati, si possono raccogliere informazioni utili per l'individuazione di esposizioni da porre sotto controllo o per l'interpretazione di dati relativi a particolari alterazioni cliniche o strumentali nella sorveglianza sanitaria. Diverso era l'andamento osservato nella seconda casistica. Le concentrazioni urinarie di alcuni elementi caratterizzanti la miscela, quali As e Sb, erano superiori ai valori biologici proposti da agenzie e/o singoli ricercatori, mentre i valori degli altri metalli erano generalmente superiori ai valori di riferimento. Inoltre, nelle urine di alcuni lavoratori sono stati dosati elementi, quali alcuni lantanidi, che possono avere non poco valore per l'interpretazione di evidenze clinico strumentali come quelle di alcune pneumoconiosi o di altre broncopneumopatie croniche.

#### 4.2 Miscele di solventi: vapori di benzina

Il metil-*tert*-butiletere (MtBE) può rappresentare fino al 15% (v/v) dei prodotti che compongono la benzina ed è quindi facilmente quantificabile, laddove siano presenti vapori derivati da questa miscela complessa. A causa del microinquinamento dell'aria e dell'acqua, tale composto risulta rilevabile anche nei campioni di sangue e urina di soggetti di controllo (59). Inoltre, il MtBE non essendo presente nel fumo di sigaretta, non interferisce nel monitoraggio biologico delle possibili esposizioni professionali (benzinai, addetti alla distillazione di petrolio). Anche nel caso di esposizioni modeste rispetto al limite ambientale proposto da ACGIH o DFG (anche 1000 volte inferiori), si osserva un considerevole incremento del MtBE nei liquidi biologici (sangue e urina) alla fine del turno di lavoro. La citata non interferenza con il fumo di sigaretta permette di osservare buone correlazioni con la concentrazione ambientale, quando essa viene valutata per i singoli lavoratori sottoposti a controllo biologico. Al contrario, la contemporanea analisi del benzene (ematico e/o urinario) può evidenziare che le concentrazioni ambientali di benzina erano così basse da non riuscire a modificare le concentrazioni biologiche del benzene da inizio a fine turno. Inoltre, nel caso del benzene il fumo di sigaretta rappresenta un fattore di confondimento così importante da non permettere di discriminare un'eventuale esposizione a vapori di benzina. Solo nel caso di significative concentrazioni ambientali di benzina l'analisi del benzene in materiali biologici assume valori che permettono di confermare l'esposizione a vapori di benzina. L'analisi contemporanea di MtBE e di benzene in campioni biologici può essere utile per valutare in modo piuttosto preciso e specifico questo ri-

schio riducendo le possibili difficoltà interpretative determinate dalla diffusa abitudine al fumo e dalle modeste esposizioni che sempre più frequentemente vengono riscontrate (60, 61).

#### 4.3 Idrocarburi policiclici aromatici

Il monitoraggio biologico dell'esposizione a idrocarburi policiclici aromatici (IPA) viene generalmente effettuato mediante la misura dell'escrezione urinaria di 1-idrossipirene, metabolita del pirene, un composto sempre presente nelle miscele aerodisperse di IPA (62). La composizione delle diverse miscele di IPA varia però in funzione dei differenti processi di combustione, e l'1-idrossipirene può quindi fornire solo una stima indiretta dell'esposizione complessiva a IPA. In alternativa all'1-idrossipirene, è stata valutata la possibilità di determinare gli IPA non metabolizzati presenti nell'urina di soggetti esposti a fumi di bitume e a fumi diesel (64). Il metodo utilizzato prevede l'utilizzo della tecnica della microestrazione in fase solida dello spazio di testa (HS-SP-ME) seguita da analisi mediante GC-MS (63). Sono stati così quantificati otto IPA bassobolenti: naftalene, acenaftene, acenaftilene, fluorene, fenantrene, antracene, fluorantene e pirene urinari. La presenza di IPA non metabolizzati è stata evidenziata in tutti i campioni di urina analizzati. I valori di escrezione urinaria osservati sono risultati diversi nei due gruppi di soggetti e per alcuni analiti sono risultati associati ai rispettivi livelli di esposizione ambientale. Inoltre i valori osservati nei campioni raccolti prima del turno sono diversi da quelli osservati a fine turno (64).

#### 4.4 Miscele di composti organici persistenti

Pur essendo bandita la loro produzione da più di 20 anni, i policlorobifenili (PCB) possono rientrare nell'area di interesse dei NIE in alcuni settori come la metallurgia, la lavorazione dei rifiuti, le sempre più frequenti attività di bonifica di siti inquinati. Mentre è nota da tempo la misura dei PCB totali e di alcune loro classi (65), metodiche analitiche più recenti e che utilizzano la GC-MS ad alta risoluzione (HR) o a ionizzazione negativa, consentono il dosaggio un numero di congeneri variabile da 10 a 50 o più. Permangono però alcuni punti critici sulla loro determinazione e sull'interpretazione dei dosaggi ottenuti quali: (i) la variabilità dei congeneri presenti nel campione di siero in termini qualitativi e/o quantitativi; (ii) la specificità e sensibilità della tecnica utilizzata; (iii) il numero e tipo di congeneri cui viene attribuita importanza; (iv) la modalità sull'espressione dei risultati (volume, peso dei lipidi). È inoltre da valutare la proposta di dosare alcuni congeneri come traccianti dell'esposizione complessiva e per correlarla ad alcuni effetti. È il caso del PCB 153 ritenuto responsabile di interferenze con gli ormoni tiroidei, o di alcuni congeneri ortosostituiti a sospetta azione neurotossica. Nel tentativo di fornire un orientamento in merito a quali congeneri dosare per la corretta valutazione dei dati epidemiologici in popolazioni esposte a PCB, Gladen *et al.* (66) hanno dimostrato

che, tra i 40 congeneri dosati, 10 erano tra loro fortemente intercorrelati, 5 lo erano solo moderatamente e 9 erano poco correlati. Il dosaggio di 14 PCB non fornivano, a detta degli autori, alcune informazioni, in quanto presenti in meno del 30% dei soggetti esaminati. Per quelli fortemente intercorrelati, la determinazione di tutti i congeneri non forniva informazioni aggiuntive rispetto alla determinazione di un singolo congenero che li rappresentasse: a tal proposito, il PCB 153 poteva essere considerato rappresentativo di altri 10 congeneri. Sarebbero così i 6 congeneri non correlati ai congeneri principali (PCB 180, 74, 105, 118, 99 e 66) ad essere candidati, insieme al PCB 153, all'inclusione nelle misure di dose per gli studi epidemiologici. Il modello proposto per i PCB da Gladen e coll. appare di notevole interesse teorico non solo per lo studio delle miscele di composti organoclorurati persistenti ma anche per lo studio delle miscele di xenobiotici in senso lato.

In un'indagine condotta in un'acciaieria elettrica su esposti a varie concentrazioni ambientali di PCB totali comprese tra 5 e 100  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , sono state misurate nel siero dei lavoratori le concentrazioni di una miscela di 24 PCB, comprese tra 1 e 19  $\mu\text{g}/\text{l}$  ed abbastanza correlate con i dati espositivi nelle aree prima delle fusioni dei rottami. Benché l'apporto lavorativo al totale della dose di PCB sia stata calcolata intorno al 10% della dose totale, prevalendo come noto l'apporto di origine alimentare, è stato possibile differenziare i lavoratori operanti in aree a minore o maggiore esposizione. Non si sono evidenziati variazioni nei livelli biologici di ormoni tiroidei, steroidei e sessuali maschili nei soggetti a diverso livello di PCB nel siero, dato questo confermato anche in soggetti di altre casistiche non occupazionali esposti a livelli superiori dei xenobiotici persistenti presi in esame.

## 5. Specie di elementi metallici

La speciazione degli elementi è la separazione e misurazione di stati ossidativi ( $\text{Cr}^{+3}$  e  $\text{Cr}^{+6}$ ,  $\text{As}^{+3}$  e  $\text{As}^{+5}$ ,  $\text{HgO}$  e  $\text{Hg}^{+2}$ ); di etil, metil, aril, alchil composti di As e Sn; di complessi di Cu, Se, Cd, Zn con aminoacidi e proteine; di complessi con ormoni (Al, I). Attraverso essa si dovrebbe migliorare l'apporto conoscitivo del monitoraggio biologico, consentendo di meglio correlare le quantità di xenobiotico (sue specie) con gli indicatori di effetto funzionale od organico (67). L'importanza della speciazione in medicina del lavoro è già stata dimostrata per la comprensione di aspetti rilevanti della tossicocinetica di alcuni elementi (maggiore o minore assorbimento/eliminazione dei diversi stati ossidativi di Cr, Hg o As), della comparsa di alcuni effetti dei metalli (inibizione degli enzimi zincodipendenti da parte del Cd non più chelabile da parte della metallotioneina a livello del tubulo prossimale), nonché del diverso significato delle specie organiche ed inorganiche nel monitoraggio delle esposizioni lavorative ad As.

Lo sviluppo della speciazione in ambito biologico dipende in larga misura dalla disponibilità di metodi analiti-

ci idonei. Tali metodi sono generalmente assai complessi a causa della concentrazione molto bassa della specie, della sua possibile modificazione indotta dal trattamento del campione nelle diverse fasi dell'analisi, dell'interferenza delle matrici biologiche. L'altro aspetto in grado di condizionare lo sviluppo della speciazione è il livello di conoscenza su esistenza, significato, destino di diverse specie di un elemento. La speciazione degli elementi nel monitoraggio biologico appare ancora oggi una procedura complessa, costosa, spesso non interamente valutabile rispetto alla sua qualità. Dovendo pertanto decidere se applicarla deve essere attentamente verificata l'esistenza di alcuni requisiti riguardo al significato della specie che si vuole determinare, alla disponibilità di metodi accettabili rispetto ai (dichiarati) livelli di qualità, alla praticabilità ed eticità dei campionamenti, ma soprattutto ad una valutazione del rapporto costi-benefici rispetto alla determinazione dell'elemento come tale.

Come esempio di miglioramento nello studio delle esposizioni ottenuto mediante speciazione viene presentato quello sull'arsenico (As) descritto da Apostoli *et al.* (68), riguardante 51 lavoratori maschi impiegati nell'industria del vetro con esposizione a triossido di As (valore mediano 42  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) e 39 soggetti di controllo non esposti a As. Sono state studiate 5 specie di As [ $\text{As}^{3+}$ ,  $\text{As}^{5+}$ , acido monometilarsonico (MMA), acido dimetilarsonico (DMA) e arsenobetaina (AsB)]: quella escreta in proporzione maggiore era l'AsB (34% dell'As totale per i lavoratori esposti e 66% nel gruppo di controllo), cioè una specie non correlata con l'esposizione. Il DMA, anch'esso forse non interamente ascrivibile all'esposizione professionale, era la seconda specie escreta, con valori pari al 21% nei soggetti esposti ed al 36% nel gruppo di controllo. Seguiva tra le specie metilate il MMA (21% negli esposti ed 26% nei controlli). Le specie inorganiche ( $\text{As}^{3+} + \text{As}^{5+}$ ) sono risultate misurabili in 21 lavoratori tra quelli più esposti, con valori tra 1 e 68  $\mu\text{g}/\text{l}$ ; nei controlli sono state misurate in 4 soggetti, con valori tra 0,5-1  $\mu\text{g}/\text{l}$ . Per valori di esposizione pari a 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  si sono osservate le seguenti concentrazioni urinarie:  $\text{As}^{3+}$  4,3  $\mu\text{g}/\text{l}$ ,  $\text{As}^{3+} + \text{As}^{5+}$  5,3  $\mu\text{g}/\text{l}$ , MMA 7,5  $\mu\text{g}/\text{l}$ , DMA 26,9  $\mu\text{g}/\text{l}$ ,  $\text{As}_{\text{inorg}} + \text{DMA} + \text{MMA}$  43,7  $\mu\text{g}/\text{l}$ . Negli esposti le migliori correlazioni con la concentrazione ambientale del metallo si avevano per  $\text{As}_{\text{inorg}} + \text{MMA} + \text{DMA}$  e per  $\text{As}^{3+} + \text{As}^{5+}$ . Di particolare interesse, perché più direttamente correlato con gli effetti dell'As, appare la possibilità di misurare la specie  $\text{As}^{3+}$ .

## 6. Nuove matrici

### 6.1 Cute e correlati

Nel rapporto con l'esposizione ad elementi, la cute può essere vista da tre diversi punti di vista: come substrato di deposizione-azione, come via di assorbimento di composti organici ed, in misura minore, di alcune specie e composti di metalli, e come una via di eliminazione attraverso cellule esfoliate, annessi, sudore e sebo (69). Il meccanismo di trasferimento cellulare verso l'esterno degli xenobiotici è

caratterizzato dal passaggio dalla papilla dermica alle cellule epidermiche durante il processo di maturazione-cheratinizzazione-esfoliazione. Nel sudore gli xenobiotici vengono eliminati con un meccanismo di ultrafiltrazione del siero, attraverso il quale la quota libera (non legata alle proteine plasmatiche) diffonde nelle ghiandole sudoripare. In parte minore, gli xenobiotici vengono poi eliminati con il sebo una volta incorporati nelle soluzioni idrolipidiche prodotte dalle ghiandole sebacee. Accanto all'analisi sul sudore è stata sviluppata negli ultimi anni una tecnica di prelievo mediante *wipe test*. Il test si avvale di un campionamento estemporaneo, solitamente effettuato alla fine del turno di lavoro, strofinando con cura un'area cutanea pre-determinata (solitamente 10 cm x 10 cm) mediante un adeguato supporto in cellulosa a doppio velo. Il supporto deve essere umidificato con una soluzione di TRITON X 100 diluito allo 0,05% in acqua. Il prelievo consente il dosaggio degli elementi presenti nel sudore, secreti come il sebo, e nelle cellule esfoliate. I risultati di uno studio condotto dall'Università di Brescia su lavoratori esposti a cobalto (Co) nella produzione di inserti diamantati hanno dimostrato l'esistenza di una correlazione assai significativa tra la concentrazione del metallo nell'aria, urina e sangue e quella negli *wipe test* di fine turno lavorativo, con valori mediani rispettivamente di 6  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , 56  $\mu\text{g}/\text{l}$  nell'urina e di 0,5  $\mu\text{g}/\text{dm}^2$  nello *wipe*. Si segnala che il Co cutaneo è risultato meglio correlato ( $r = 0,9$ ) con i valori del metallo nel sangue e che, per i lavoratori con maggiore esposizione, anche nei test del giorno dopo si sono dimostrati livelli ben correlati con le esposizioni del giorno prima.

## 6.2 Plasma: determinazione del piombo

Circa il 90-95% del piombo (Pb) presente nel sangue è legato agli eritrociti, la restante parte è nel plasma (PbP). Qui il piombo è distribuito in tre distinte frazioni: una associata a componenti a basso peso molecolare (soprattutto aminoacidi, quali la cisteina); un'altra legata a componenti ad alto peso molecolare con i quali forma complessi con siti leganti che contengono zolfo, azoto e ossigeno; una frazione più modesta è infine presente nel plasma in forma libera, ionizzata e diffusibile. Soltanto quest'ultima costituisce la frazione metabolicamente attiva di tutto il pool corporeo di Pb. Essa è in equilibrio con la quantità assorbita, la quantità escreta e con i livelli del Pb nei compartimenti extracellulari. Dal momento che il dosaggio della frazione plasmatica realmente diffusibile non è attualmente possibile, da tempo viene effettuato il dosaggio della frazione plasmatica totale, già di per sé difficoltoso a causa dei suoi bassi livelli. Un miglioramento delle capacità analitiche è avvenuto con la maggiore disponibilità nei nostri laboratori dell'ICP-MS, tecnica che oltre ad essere tra le più sensibili per la misura di singoli elementi nelle matrici biologiche offre il vantaggio di poter escludere complessi pretrattamenti sul campione analizzato.

Attraverso le misure condotte con questa tecnica alcuni autori hanno ipotizzato che la concentrazione di PbP aumenterebbe secondo una relazione lineare con la concentrazione atmosferica del Pb, mentre la concentrazione

ematica raggiungerebbe un plateau in corrispondenza di alti valori di esposizione, in conseguenza alla saturazione dei siti di legame delle proteine eritrocitarie. Altri autori hanno avanzato l'ipotesi che tra le concentrazioni di PbP e Pb ematico (PbB) esista una relazione di tipo logaritmico, valida per un ampio intervallo di valori di PbP (2,13-39,7  $\mu\text{g}/\text{l}$ ). Inoltre i dati raccolti indicano che la concentrazione di PbP si mantiene all'incirca costante, attorno allo 0,29% della piombemia, e comunque sempre inferiore allo 0,5%, con valori di PbP intorno a 2 (range 1-2,5)  $\mu\text{g}/\text{l}$  per PbB di 400  $\mu\text{g}/\text{l}$  (70-72).

Nello studio policentrico MIUR concluso nel 2003 (73) la concentrazione media di PbP negli esposti (con PbB mediana attorno ai 30  $\mu\text{g}/\text{l}$ ) è risultata pari a 1,5  $\mu\text{g}/\text{l}$ , con mediana 0,95  $\mu\text{g}/\text{l}$  e range 0,01-8,9  $\mu\text{g}/\text{l}$ . Nei controlli (con PbB attorno ai 5  $\mu\text{g}/\text{l}$ ) il PbP è risultato avere una concentrazione media di 0,55  $\mu\text{g}/\text{l}$ , mediana 0,34  $\mu\text{g}/\text{l}$ , range 0,07- 6,4  $\mu\text{g}/\text{l}$ . La relazione con il PbB è risultata di tipo esponenziale, con livelli di PbP significativamente diversi nei quattro gruppi caratterizzati da esposizione crescente di PbB (da  $\leq 212$  a  $>402$   $\mu\text{g}/\text{l}$ ). Dai nostri risultati emerge che la proposta di introdurre il PbP quale indicatore di dose biologicamente efficace nella pratica routinaria appare ostacolata da una notevole variabilità biologica legata alle tecniche di raccolta ed al trattamento del campione. Un suo uso può essere tuttavia indicato su base individuale per una migliore interpretazione di singoli quadri clinici, laboratoristici o strumentali.

## 6.3 Condensato dell'aria esalata

Il condensato dell'aria espirata (CAE), liquido che si forma raffreddando l'esalato, è stato proposto come nuovo metodo per campionare il fluido di rivestimento bronco-polmonare. I principi generali che ne regolano la formazione non sono del tutto noti, tuttavia si ipotizza che le goccioline di fluido polmonare siano liberate e trasportate dalla corrente di vapore espirata e possono in seguito essere raccolte nel condensatore. Il CAE si ottiene facendo respirare il soggetto a volume corrente per un determinato tempo entro un apposito condensatore, dove l'aria è raffreddata a temperatura variabile e la condensa raccolta in appositi contenitori. La raccolta del CAE è effettuata per due obiettivi importanti: i) avere informazioni sul meccanismo fisiopatologici nelle vie aeree rilevando i cambiamenti nei livelli dei mediatori; ii) avere informazioni sulla composizione del fluido di rivestimento broncolaveolare. Questa seconda caratteristica lo rende particolarmente adatto nello studio degli effetti polmonari legati all'esposizione a sostanze pneumotossiche. Infatti, il CAE può essere utilizzato sia per stimare le dose al bersaglio che per valutare eventuali effetti precoci sul polmone (74). La stima della dose al bersaglio potrebbe rappresentare un complementare approccio ai comuni metodi utilizzati per il monitoraggio biologico, nei quali si utilizzano matrici come il sangue e l'urina, la cui concentrazione dell'indicatore riflette la dose sistemica e non, o solo in parte, la dose al bersaglio.

Una recente indagine ha dimostrato l'utilità del CAE come nuova matrice da utilizzare per il monitoraggio

biologico in lavoratori esposti alle miscele di metalli duri [cobalto (Co) e tungsteno (W)] (75). Brevemente, in un gruppo di lavoratori esposti, un campione di CAE e di urina è stato raccolto ad inizio e fine turno per il dosaggio di Co e W; un'aliquota di CAE è stata anche utilizzata per il dosaggio della malondialdeide (MDA) esalata, quale indicatore polmonare di stress ossidativo. Nel CAE dei soggetti di controllo, il Co era rilevabile a livelli molto bassi, mentre il W non era dosabile. Nei lavoratori esposti, i livelli di Co nel CAE variavano da alcune a diverse centinaia di nmol/l. I corrispettivi livelli di W nel CAE andavano da livelli non dosabili a parecchie decine di nmol/l. I livelli sia di Co che di W nel CAE e nell'urina erano più alti alla fine del turno lavorativo rispetto all'inizio del turno. Nel CAE, i livelli di MDA erano positivamente correlati con i rispettivi livelli di Co, e laddove era presente co-esposizione a W, questa determinava un ulteriore incremento nei livelli di MDA. Al contrario, i livelli di MDA nel CAE non correlavano con le concentrazioni urinarie di Co. La determinazione di indicatori a livello del CAE potrebbe quindi essere di aiuto complementare per la valutazione, non invasiva, delle proprietà tossicocinetiche delle sostanze e per quantificare la loro dose a livello dell'organo bersaglio.

## 7. Discussione

Si riapre periodicamente la discussione se gli indicatori di esposizione siano o no da considerare biomarker. Si può riportare come esempio quanto sostenuto da Gil e Pla (76), e cioè che indicatore biologico è una risposta biologica a un tossico e non la presenza dell'agente o dei suoi metaboliti nell'organismo. In questo in realtà si rifacevano ad una ben nota definizione della National Academy of Science ("gli indicatori biologici sono alterazioni causate da un tossico in componenti cellulari o in processi biochimici, in strutture o funzioni, tale da essere misurabile nel sistema biologico stesso o in un suo campione"). Gli stessi autori, peraltro, avevano dovuto ammettere che non si commettevano errori nel sostenere che la misurazione dei tossici e dei loro metaboliti fornivano un'indicazione importante sull'esposizione, potendo così essere considerata misura di "indicatore biologico".

Già qualche anno prima Sildeberg e Davis (77) avevano a loro modo risolto il problema definendo l'indicatore di esposizione come "segnale fisiologico in grado di riflettere un'esposizione". Non dovrebbero esistere pertanto dubbi che al di là di alcune sottigliezze semantiche quelli che noi usiamo da anni per la misura attraverso dosaggi nelle matrici biologiche vanno a tutti gli effetti considerati come indicatori biologici.

### 7.1 Requisiti essenziali degli indicatori biologici

Gli indicatori di esposizione sono comunemente utilizzati per riconoscere e classificare i singoli soggetti (o loro gruppi) come o in quanto esposti a determinati xenobioti-

ci. Tuttavia è necessario, per una loro corretta applicazione, conoscerne la validità, componendola, come ad esempio consiglia Aitio (78), in:

- qualità analitica necessaria e standardizzabile rivolta non solo ai fattori tecnici di misurazione (calibrazione, specifiche procedure, *proficiency test*), ma anche standardizzazione nella preparazione dei soggetti e nella raccolta, trasporto, conservazione e preparazione dei campioni;
- conoscenze tossicocinetiche (assorbimento, trasporto, deposito, metabolizzazione, escrezione) nelle quali devono essere considerate le possibili influenze che le abitudini di vita, le condizioni fisiologiche, ambiente ed alimentazione possono avere.

### 7.2 Specificità e sensibilità

Specificità e sensibilità del metodo sono tra le componenti essenziali della misura degli indicatori di esposizione. Con il termine di "specificità analitica" si intende la capacità di un metodo analitico di dosare esclusivamente la sostanza chimica che si desidera misurare. Per "specificità metabolica" si intende, invece, la percentuale di analita dosato che deriva dai processi metabolici che coinvolgono il tossico e non da altri processi.

La sensibilità (correntemente misurata attraverso il limite di quantizzazione) è un parametro essenziale specie nelle basse-bassissime dosi in quanto consente di definire l'esistenza stessa dell'esposizione e dell'assorbimento di uno xenobiotico. Molti giudizi del passato circa l'assenza di esposizione erano in realtà il frutto di una tecnica o di un metodo analitico non sufficientemente sensibili.

La specificità nel ricercare l'origine del metabolita (o del tossico) è particolarmente importante nelle azioni di prevenzione, in quanto la popolazione professionalmente esposta può assorbire i tossici attraverso altre sorgenti (ambiente di vita, dieta). Tuttavia gli indicatori di esposizione non sono in grado di distinguere l'esposizione generale da quella occupazionale. Pertanto la distinzione tra popolazione professionalmente esposta e popolazione generale è basata sul confronto con i valori di riferimento appropriati. Quando l'esposizione occupazionale si verifica per dosi elevate, la distinzione è relativamente semplice. Al contrario, se l'esposizione si verifica per dosi molto simili a quelle che si riscontrano nella popolazione generale distinguere la popolazione occupazionalmente esposta diviene più difficoltoso. Questa situazione ha un importante riscontro sul metodo utilizzato per dosare gli indicatori di esposizione: infatti esposizioni a elevate dosi possono essere riconosciute anche attraverso l'applicazione di metodi con bassa specificità analitica e metabolica, al contrario di esposizioni a dosi molto basse che invece richiedono una maggiore sensibilità.

### 7.3 Rapporto tra monitoraggio ambientale e biologico

La valutazione quantitativa dell'esposizione si basa sulla conoscenza della relazione tra dose esterna e indicatore biologico. Centrale è pertanto la dimostrazione

della relazione tra indicatori biologici misurati e monitoraggio ambientale. Tale relazione è nota per molte sostanze tossiche assorbite per via respiratoria. Eventuali discrepanze non devono stupire e possono essere giustificate dall'assorbimento per altre vie, in particolare per via percutanea, o da misure inappropriate dell'esposizione (ad es. imbrattamento dei campionatori) o, infine, da errori nella scelta dei termini da mettere a confronto, specie nel caso di sostanze a cinetica molto rapida o che presentino una lunga latenza tra esposizione ed assorbimento. Nel valutare l'esposizione attraverso gli indicatori biologici è importante tenere conto di tutte le vie di assorbimento, della concentrazione dei tossici e della loro emivita: il dosaggio a fine turno dell'indicatore biologico di esposizione per un tossico con emivita di 4-8 ore riflette in genere l'esposizione avvenuta durante la giornata, con emivita di 50-100 ore il campionamento alla fine della settimana lavorativa è in grado di rappresentare l'esposizione di più giorni precedenti. Va peraltro sempre ricordato che stime per difetto (indicatori biologici bassi per esposizioni elevate) possono trovare giustificazioni di ordine fisiologico, mentre la situazione opposta (indicatori biologici elevati per bassi livelli di esposizione) può avere diverse spiegazioni, che in ordine di frequenza comprendono: sottostima dell'esposizione complessiva (che può essere avvenuta in tempi diversi da quelli campionati o attraverso vie non considerate), aspecificità della sostanza o del metabolita, che potrebbero derivare dal metabolismo endogeno o anche dalla biotrasformazione di xenobiotici non considerati, mancata normalizzazione dei dati urinari ottenuti in campioni particolarmente concentrati.

#### 7.4 Priorità

Nelle attuali condizioni, lo sviluppo di nuovi indicatori di esposizione dovrebbe essere condizionato dalle possibili combinazioni tra interesse per un determinato xenobiotico e la sua fruibilità. L'interesse, a sua volta, può essere in una fase iniziale limitato come applicazione pratica, ma sostenuto da forti motivazioni di ricerca o dall'essere paradigma per altri indicatori di xenobiotici.

A nostro avviso, vi dovrebbe essere un rinnovato interesse per questo tipo di indicatori e conseguentemente una scelta di nuovi investimenti in questo ambito, specie su alcuni dei temi presentati, come indicatori più sensibili, indicatori di miscela, analisi di nuove matrici, individuazione delle forme/specie metabolicamente attive. Va infatti sottolineato che, come ricordato in premessa, la gran parte dell'attuale monitoraggio biologico si fonda sugli indicatori di esposizione. Il monitoraggio biologico (in cui il ruolo del medico del lavoro è fuori discussione) richiede continui investimenti per sviluppare NIE.

#### 7.5 Indicatori biologici e valori limite

Il ricorso agli IBE è da considerare un approccio molto pragmatico, come dimostrato dalle due principali entità di riferimento in questo campo: ACGIH e DFG (79, 80). I biomarkers ammessi sono inseriti nelle liste quando i pro-

ponenti hanno ritenuto che fossero stati raggiunti sufficienti livelli di predittività dell'esposizione e di affidabilità analitica. In questo modo si è arrivati a 9 elementi metallici, 18 composti organici tal quali, 30 metaboliti, 3 indicatori per gruppi di composti per ACGIH; a 10 (3 EKA) elementi metallici, 19 (8 EKA) composti organici tal quali, 27 (8 EKA) metaboliti per DFG. Va sottolineato come DFG dia conto, pur precisandone un grado di incompleta valutazione, della possibilità di misurare 7 composti/metaboliti e 4 elementi metallici.

Vale la pena ricordare che nel periodo da noi qui considerato per i NIE (1999-2004) ACGIH ha inserito i seguenti BEI: 2,5-esandione senza idrolisi ed indicato anche per metil-*n*-butil-chetone; solo acido mandelico di fine turno per stirene, unitamente a stirene in sangue venoso; tetraidrofurano; N-acetil-S-(N-metilcarbamoil)cisteina in urina; acido *tt*-muconico per benzene. Da parte sua, DFG ha introdotto per i BAT *n*-butil-alcòl; cumene; cicloesano; N,N-dimetilacetammide; lindano; manganese urinario; per gli EKA: diclorometano; e per gli EKA non completamente valutabili: Sb, Be; 1-4-dicloro-benzene; etilbenzene.

#### 7.6 Aspetti pratici

Accessibilità e costi sono stati spesso posti come fattori limitanti la fruibilità dei NIE. Pur condividendo in linea di principio una tale valutazione, pensiamo sia giusto sottolineare che in questa fase le discriminanti vere siano la validità del NIE ed un giudizio di sua necessità nella situazione data per migliorare la valutazione del rischio e/o la sorveglianza sanitaria. Così come nessuno si meraviglia dei costi del set di marcatori virali necessari per il controllo degli esposti a rischio biologico, appunto perché validi e necessari, sorprende che problemi siano posti per indicatori di altri fattori di rischio, a condizione che, come detto, siano validi e necessari. Per quanto attiene alla accessibilità in un Paese di limitata estensione e facilità di comunicazione come il nostro, non dovrebbe rappresentare un problema spostare i campioni a qualche centinaia di chilometri utilizzando, fino a quanto la metodica sia più diffusamente disponibile, i centri che l'hanno messa a punto.

#### 7.7 Informazione

Molto spesso l'informazione sulla disponibilità di NIE è affidata a articoli su riviste a volte internazionali che a fatica raggiungono i potenziali utenti. Adeguati livelli informativi sono inoltre necessari anche sui punti precedentemente illustrati. Sarebbe utile un riferimento il più possibile completo sullo stato dell'arte, comprese le ricerche in atto su singoli NIE. La costituzione di un network NIE sotto l'egida SIMILI che inizi quanto meno collegando i centri che hanno collaborato a questa relazione e che parta con la messa in comune dei contenuti della stessa pare a noi un'occasione da non perdere. Sarà anche l'occasione per migliorare in generale i rapporti tra i centri di ricerca e quindi il lavoro che tutti svolgiamo nell'ambito del monitoraggio biologico.

Tabella I. Nuovi indicatori di esposizione (NIE) per il monitoraggio biologico dell'esposizione a metalli

Sostanza	Nuovo indicatore di esposizione	Applicazione	Relazione con l'ambiente	Metodo	Miglioramento rispetto ai precedenti indicatori	Relazione con gli effetti	Valori di riferimento	Bibliografia
BERILLIO	Be urinario (Be U)	Lavoratori settore metallurgico	Significativa per concentrazioni ambientali di 0,03 - 0,9 µg/m <sup>3</sup>	ICP-MS; LR 0,03 µg/l	Maggiore sensibilità e specificità	Proposta per effetti immunitari	LR -0,06 µg/l	Apostoli e Schaller 1999 (6)
TUNGSTENO	W urinario (W U)	Lavoratori della produzione, lavorazione ed impiego metalli duri	Significativa, ma variabile in funzione delle specie e della loro solubilità	ICP-MS	Possibilità di misura	Utile in particolare per lo studio degli effetti combinati con il cobalto	LR-1 µg/l	Krauss et al., 2001(7)

Legenda: ICP-MS, plasma ad accoppiamento induttivo-spettrometria di massa; LR, limite di rivelabilità.

Tabella II. Nuovi indicatori di esposizione (NIE) per il monitoraggio biologico dell'esposizione a gas anestetici e farmaci antiblastici

Sostanza	Nuovo indicatore di esposizione	Applicazione	Relazione con l'ambiente	Metodo	Miglioramento rispetto ai precedenti indicatori	Relazione con gli effetti	Valori di riferimento	Bibliografia
SEVOFLURANO	Alcool esafluoro-isopropilico (HFIP)	Lavoratori esposti a gas anestetici	Permette di evidenziare esposizioni all'anestetico impiegato. Sono stati calcolati LBE (Limite Biologico Equivalente)	spazio di testa GC-MS; LR 2,0 µg/l; specifico	Nuovo indicatore	Non valutati	Non applicabili	Imbriani et al., 2001 (8)
DESFLURANE	Desfluorane urinario (D U)	Lavoratori esposti a gas anestetici	Permette di evidenziare esposizioni all'anestetico impiegato. Sono stati calcolati LBE (Limite Biologico Equivalente)	spazio di testa GC-MS; LR 0,05 µg/l; specifico	Nuovo indicatore	Non valutati	Non applicabili	Alessio et al., 2003 (11)
CICLOFOSFAMIDE <sup>a</sup>	Ciclofosfamide urinaria (CP U)	Lavoratori coinvolti nella manipolazione di farmaci antiblastici	Non relazione con dati ambientali in aria e su superficie	GC-MS; previa SPE e derivatizzazione con anidride trifluoroacetica; LR 1,0 µg/l	valutazione di procedure operative ed efficacia dei DPI	-	Non applicabili	Carrieri et al., 2003 (12) Carrieri et al., 2000 (13)

Legenda: GC-MS, gascromatografia-spettrometria di massa; LR, limite di rivelabilità; SPE, estrazione in fase solida.

**Tabella III. Nuovi indicatori di esposizione (NIE) per il monitoraggio biologico dell'esposizione a solventi**

Sostanza	Nuovo indicatore di esposizione	Applicazione	Relazione con l'ambiente	Metodo	Miglioramento rispetto ai precedenti indicatori	Relazione con gli effetti	Valori di riferimento	Bibliografia
TRICLOROETILENE (TCE)	TCE urinario	Lavoratori	Correlazione significativa	Spazio di testa GC-MS	-	Non valutati	Non disponibili	Imbriani et al., 2001 (15)
PERCLOROETILENE (PCE)	PCE ematico pre-turno fine settimana; PCE urinario post-turno fine settimana	Lavoratori esposti a PCE in diversi settori	Correlazioni significative tra l'esposizione ambientale individuale ed i due indicatori biologici	Spazio di testa GC-ECD	Indicatori specifici e sensibili che non risentono della presenza di TCE (come il TCA urinario)	Non valutati	Non disponibili	Maccà et al., 2000 (16)
N,N-DIMETIL FORMAMMIDE (DMF)	N-acetil-S-(N-metil-carbamoyl) cistina (AMCC) urinaria	Lavoratori esposti a DMF nella produzione di tessuti e pelli sintetiche	Correlazione significativa dell'AMCC nei campioni raccolti il venerdì e il valore medio ponderato di DMF ambientale	HPLC	Il dosaggio dell'AMCC permette di stimare la dose media settimanale del solvente	Non valutati	Non disponibili	Imbriani et al., 2002 (17)
DIMETIL ACETAMMIDE (DMA)	Acido S-acetamidometil mercapturico (AMMA) urinario	Lavoratori esposti nella preparazione di fibre tessili sintetiche (acriliche)	Poco correlato con le concentrazioni ambientali a causa dell'assorbimento cutaneo	LC-MS	Il dosaggio dell'AMMA esprime esposizioni di più giornate lavorative	Non valutati	Non disponibili	Perbellini et al., 2003 (18)
<i>n</i> -ESANO	2,5-Esandione "libero" urinario	Ratto	Già note	LC-MS; iniezione diretta LR 50 µg/l	Esenza da artefatti analitici e più pertinente rispetto agli effetti neurotossici, legati alla quota libera	Già nota	Non disponibili	Manini et al., 1998 (19) Manini et al., 1999 (20)
STIRENE	Acidi mercapturici urinari	Lavoratori della vetroresina	Non valutata per l'uso di DPI. Correlati con gli indicatori di dose interna, con effetto modulante del polimorfismo della GST-M1	LC-MS; iniezione diretta, LR 1 µg/l	No, in quanto il suo utilizzo come indicatore di esposizione richiederebbe la conoscenza del polimorfismo della GST-M1	Non valutata	Non rivelabili	De Palma et al., 2001(23)
STIRENE	4-Vinilfenolo (glicuronide e solfato) urinario	Lavoratori e volontari	Correlato con l'esposizione e con gli altri metaboliti dello stirene, influenzato dall'abitudine al fumo di sigaretta	LC-MS; determinazione dei glicuro- e solfo-coniugati, iniezione diretta, LR 10 µg/l	E' l'unico indicatore che rende ragione dell'ossidazione sull'anello aromatico dello stirene	Correlazione con effetti genotossici, valutati mediante il test del micronucleo, modulata dal genotipo NQO1	0,16 NF 0,45 F (mg/g creat)	Manini et al., 2003 (27)
STIRENE	Acido mandelico (AM) e acido femigiossifico (AFG) urinari	Popolazione generale	Già nota	LC-MS; iniezione diretta, LR 10 µg/l	Miglioramento della sensibilità	Già nota	AM 84-2339 AFG 9-1238 (µg/g creat)	Manini et al., 2004 (29)

(segue)

(segue Tabella III)

Sostanza	Nuovo indicatore di esposizione	Applicazione	Relazione con l'ambiente	Metodo	Miglioramento rispetto ai precedenti indicatori	Relazione con gli effetti	Valori di riferimento	Bibliografia
BUTADIENE (BD)	BD aria esalata BD sangue BD urina	Lavoratori coinvolti nella sintesi e polimerizzazione del BD in un impianto petrolchimico	Indicatori sensibili e specifici, che distinguono gruppi a diversa e bassissima esposizione, correlano con l'esposizione personale a BD e tra loro, sono influenzati dal fumo di sigaretta	Spazio di testa GC-MS; LR alcuni ng/l, molto specifico	Incremento di specificità e sensibilità rispetto ad acido mercapturico MI	Non valutati	BD urinario < 3 ng/l NF < 15 ng/l F	Fustinoni et al., 2004 (31)
BUTADIENE (BD)	Addotti all'emoglobina Acido mercapturico MI	Lavoratori coinvolti nella sintesi e polimerizzazione del BD in un impianto petrolchimico	Indicatori poco correlati all'esposizione personale; influenzati dal genotipo degli enzimi metabolici GST e CYP2E1	Addotti: degradazione di Edman, analisi GC-MS alta risoluzione	No	Non valutati	MI < 1000 µg/l	Fustinoni et al., 2002 (30) Begemann et al., 2001(32)
TOLUENE	Toluene nell'aria espirata, la mattina del giorno dopo l'esposizione	Lavoratori	Correlazione significativa tra la concentrazione nell'aria alveolare e quella ambientale del giorno precedente	Campionamento in un vial che contiene un tubo di Tenax di un Radello; desorbimento termico; Analisi GC-MS	Rende facilmente praticabile un "vecchio" indicatore valido solo nel caso di esposizioni consistenti; facile esecuzione	Non valutati	Non disponibili	Ghittori et al., 2004 (35)
TOLUENE	Toluene urinario	Lavoratori dell'industria rotocalcografica	Toluene urinario più sensibile e specifico dell'o-cresolo e confrontabile al toluene ematico. Campione biologico più facile da ottenere	SPME-GC-MS; Semplicità di metodo, automatizzabile, no preparazione del campione	Correla meglio con l'esposizione ed è più specifico dell'o-cresolo urinario, richiede una matrice meno invasiva del toluene ematico	Non valutati	0,1- 1 µg/l	Fustinoni et al., 2000 (33) Fustinoni et al., 2004 (34)
BENZENE	Acido muconico corretto/acido sorbico	Esposizione a benzene	Dovrebbe permettere di discriminare valori "falsi positivi" di acido muconico	LC-MS	Nuovo indicatore, maggiore specificità	Non valutati	-	Negri et al., 2003 (46)
ETILENEBISDITIO CARBAMATI	Etilenitiourea urinaria (ETU)	Esposizione a pesticidi in agricoltura	Distingue esposti e controlli.	Estrazione liquido/liquido, derivatizzazione; analisi GC-MS	È uno dei pochi indicatori biologici per l'esposizione ad antiparassitari	In corso di valutazione gli effetti sul sistema immunitario	Fino a 2 µg/g creatinina	Fustinoni et al., 2004 (47) Colosio et al., 2002 (48)
AMMINE AROMATICHE	3,3'-diclorobenzidina urinaria post-turno	Lavoratori esposti a 3,3'-diclorobenzidina nella produzione di vernici in polvere	-	GC-MS equipaggiato per l'analisi in frammentografia ionica	Sensibilità analitica portata a 0,01 µg/l	-	-	Pavan et al., 2000 (50)

Legenda: GC-MS, gascromatografia-spettrometria di massa; GC-ECD, gascromatografia con rivelatore a cattura di elettroni; LC-MS-(MS), cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (*tandem*); LR, limite di rivelabilità; SPME, microestrazione in fase solida; NF, soggetti non fumatori; F, soggetti fumatori.

**Tabella IV. Nuovi indicatori di esposizione (NIE) per il monitoraggio biologico dell'esposizione professionale a benzene (i dati sono espressi come mediana e, tra parentesi, valori minimo e massimo)**

Nuovo Indicatore (NIE)	Applicazione (n)	Esposizione ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	Livelli osservati (ng/l)	Relazione con ambientale e altri metaboliti	Metodo	Miglioramento rispetto a precedenti indicatori e metodi	Valori di Riferimento	Bibliografia
Benzene urinario (B u)	Benzinai	44	NF 224 (30-1749) F 1103 (26-4702)	Significative correlazioni tra dati ambientali e biologici	GC-MS; LR 10 ng/l	Facilità di preparazione del campione e rapidità di analisi	NF 40 (13-456) F 393 (5-1693)	Perbellini et al., in preparazione
	Lavoratori raffineria di petrolio	10	NF 64 (10-5525) F 345 (32-6193)					
	Vigili (77)	22 (9-316)	NF 256 (98-846) F 2055 (313-6430)	Distingue tra i gruppi e correla con esposizione ambientale a partire da 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	HS-SPME GC-MS; LR 15 ng/l	Sensibile e specifico	NF 133 (<15-409) F 331 (64-4615)	Fustinoni et al., 2003 (36)
	Benzinai (78)	61 (11-478)	NF 342 (42-2836) F 1168 (55-5111)					
Acido S-fenilmercapturico (AFM)	Applicazione (n)	Esposizione ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	Livelli osservati ( $\mu\text{g}/\text{g}$ di creatinina)	Relazione con ambientale e altri metaboliti	Metodo	Miglioramento rispetto a precedenti indicatori e metodi	Valori di Riferimento	Bibliografia
	Tassisti (36)	6 (3-9)	NF 1,8 (0,8-15,3) F 3,8 (1,9-8,5)	Nei fumatori si osserva un aumento significativo a fine turno; correlazione con i valori di AM	LC-MS-MS; diluizione isotopica, iniezione diretta; LR 1 $\mu\text{g}/\text{l}$	Nessuna manipolazione del campione, effetti matrice compensati dallo standard interno marcato	NF (0,3-2) F (3,5-10)	Manini et al., in preparazione
	Lavoratori industria petrolchimica (30)	21 (3-208)	NF 1,1 (0,4-11,0) F 0,9 (0,4-8,0)	Buone correlazioni tra dati ambientali e biologici	HP LC-fluorimetro; LR 1 $\mu\text{g}/\text{l}$	Migliore correlazione per le basse esposizioni rispetto all'AM		Bartolucci et al., in preparazione
Lavoratori industria petrolchimica (144)	13 (<3-534)	NF 1,9 (<0,5-6,5) F 3,3 (0,4-14,0)	Basse ma significative correlazioni con esposizione ambientale; buone correlazioni con i valori di AM	Immunochimico/luminometrico (Kit MLT Research); LR 0,5 $\mu\text{g}/\text{l}$	Rapidità di esecuzione, utile per finalità di screening (non da falsi negativi)		Carrieri et al., in preparazione	
Acido <i>trans, trans</i> -muonico (AM)	Applicazione (n)	Esposizione ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	Livelli osservati ( $\mu\text{g}/\text{g}$ di creatinina)	Relazione con ambientale e altri metaboliti	Metodo	Miglioramento rispetto a precedenti indicatori e metodi	Valori di Riferimento	Bibliografia
	Tassisti (36)	6 (3-9)	NF 100 (50-325) F 163 (27-250)	Nessuna correlazione con benzene ambientale, correlazione con AFM	LC-MS-MS; diluizione isotopica, iniezione diretta; LR 10 $\mu\text{g}/\text{l}$	Nessuna manipolazione del campione, effetti matrice compensati dallo standard interno marcato	NF 58 (24-209)	Manini et al., in preparazione
	Benzinai (77)	62 (15-431)	NF 38 (<8-171) F 41 (<8-114)	Basse ma significative correlazioni tra dati ambientali e biologici; risente di interferenze (fumo e acido sorbico) che diventano rilevanti alle basse esposizioni	HP LC-UV; LR 8 $\mu\text{g}/\text{l}$		33 (3-282) estate 74 (12-273) inverno	Bartolucci et al., 1999 (43, 44)
	Lavoratori industria petrolchimica (174)	14 (<3-534)	NF 56,7 (8,1-303,7) F 82,2 (7,6-369,6)	Non distingue i gruppi a diversa esposizione, ma correla con gli altri indicatori biologici	HP LC-UV; LR 10 $\mu\text{g}/\text{l}$		NF 33 (<10-1089)* F 71 (<10-270)*	Fustinoni et al., 2003 (36)
Autisti di autobus estate (144) inverno (90)	23 (5,9-52) estate 5,5 (2-46) inverno	39 (3-201) estate 53 (5-277) inverno						
Vigili (77)	22 (9-316)	NF 82 (<10-416)* F 213 (52-909)*						
Benzinai (78)	61 (11-478)	NF 51 (<10-181)* F 144 (15-321)*						

Legenda: NF, soggetti non fumatori, F, soggetti fumatori; GC-MS, gascromatografia-spettrometria di massa, LR, limite di rivelabilità; HS-SPME, microestrazione in fase solida dello spazio di testa; LC-MS-MS, cromatografia liquida-spettrometria di massa (*tandem*); HP LC-UV, cromatografia liquida con rivelazione UV. \* =  $\mu\text{g}/\text{l}$

Tabella V. Nuovi indicatori di esposizione (NIE) per il monitoraggio biologico dell'esposizione a miscele

Sostanza	Nuovo indicatore di esposizione	Applicazione	Relazione con l'ambiente	Metodo	Miglioramento rispetto ai precedenti indicatori	Relazione con gli effetti	Valori di riferimento	Bibliografia
MISCELE METALLICHE	Pb, Al, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Sn, Ba, Fe, Cr, Cs	Lavoratori dei comparti della metallurgia, saldatura e metalmeccanica (acciaieria elettrica)	Buona	ICP-MS	Possibile valutazione di effetti combinati	Da verificare	Abituali per i singoli elementi	Apostoli e Cortesi, 2003 (54)
MISCELE METALLICHE	As, Cd, Al, Cu, Mn, Ni, Pb, Sb, Zn, terre rare	Lavoratori coinvolti nella produzione e lavorazione del vetro	Molto significativa	ICP-MS	Possibile valutazione di effetti combinati	Da verificare	Abituali per i singoli elementi	Apostoli et al., 1999 (55)
BENZINA	Metil-tert-butiletere MIBE* in urina (U-MTBE)	Lavoratori esposti a vapori di benzina (benzina) e a gas di scarico autoveicoli (vigili urbani)	Non valutati	HS-SPME GC-MS	Adatto a valutare l'esposizione a vapori di benzina, ma non a gas di scarico del traffico autoveicolare	Non valutati	Da produrre	Scibetta et al., 2004 (56)
BENZINA	MIBE* in urina e/o sangue + benzene in urina e/o sangue	Lavoratori esposti a vapori di benzina (benzina), raffinerie di petrolio, meccanici	MIBE ematico e urinario in buona relazione con le concentrazioni ambientali; non vi sono interferenze date dal fumo di sigaretta	Spazio di testa GC-MS	L'analisi del solo benzene non sempre è in relazione con l'ambiente e risente dell'interferenza del fumo	Non valutati	Non disponibili	Saarinen et al. 1998 (57) Perbellini et al., 2003 (58)
IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI (IPA)	Idrossipirene urinario	Lavoratori esposti ad IPA nel particolato atmosferico	Buona correlazione con IPA totali e pirene ambientale	Estrazione/purificazione mediante HPLC e rivelazione fluorimetrica	Tracciato cromatografico più pulito	Non valutati	<500 ng/l NF <1500 ng/l F	Buratti et al., 2000 (59)
IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI (IPA)	IPA non metabolizzati in urina	Lavoratori esposti ad IPA nel particolato atmosferico	Buona correlazione con IPA totali per fenantrene, fluorantene e pirene	SPME-GC-MS, Semplicità di metodo, automatizzabile, nessuna preparazione del campione	Fornisce il profilo di esposizione	Non valutati	Da produrre	Campo et al., 2004 (61)
POLICLOROBIFENILI (PCB)	Congeneri 28, 31, 52, 77, 81, 101, 105, 114, 118, 123, 126, 128, 138, 153, 156, 157, 167, 169, 170, 180, 189, 194, 206, 209 Congeneri 153 rappresentativo di 138, 153, 156, 157, 170, 183, 187, 194, 199, 203 (i 10 PCB intercorrelati con gli effetti) Congeneri 180, 74, 105, 118, 99, 66.	Lavoratori di settori metallurgici in cui si usano rottami; incenerimento rifiuti, bonifica aree inquinate	Correlazione con la dieta; la frazione inalatoria è correlata con dati ambientali	GC-MS ad alta risoluzione; GC-MS con ionizzazione negativa.	Maggiore specificità e sensibilità, possibilità di studiare le relazioni con effetti ormonali o sul sistema nervoso	II PCB153 è correlato con gli effetti tiroidei; altri congeneri con effetti neurotossici	Definiti in via metanalitica o sulla popolazione generale (mediana compresa tra 0,5 e 5 ng/ml)	Apostoli e Cortesi 2002 (54) Gladen et al., 2003 (63)

Legenda: ICP-MS, plasma ad accoppiamento induttivo-spettrometria di massa; HS-SPME, microestrazione in fase solida dello spazio di testa; GC-MS, gascromatografia-spettrometria di massa. \*MIBE: Metil ter butil etere.

**Tabella VI. Specificazione**

Sostanza	Nuovo indicatore di esposizione	Applicazione	Relazione con l'ambiente	Metodo	Miglioramento rispetto ai precedenti indicatori	Relazione con gli effetti	Valori di riferimento	Bibliografia
ARSENICO	As <sup>3+</sup> , As <sup>5+</sup> , acido monometilarsinico (MMA), acido dimetilarsinico (DMA), arsenobetaina (AsB)	Esposizione occupazionale a As inorganico (iAs), considerando il possibile ruolo di confondimento dell'As contenuto nei cibi e nell'acqua	Per valori di esposizione di 10 µg/m <sup>3</sup> si è osservato che sono escrete nelle urine: As <sup>3+</sup> +As <sup>5+</sup> = 4,3 µg/l, MMA = 7,5 µg/l, DMA = 26,9 µg/l, iAs+MMA+DMA = 43,7 µg/l La miglior relazione individuata è quella tra concentrazione nell'aria e iAs+DMA+MMA	HPLC ICP-MS	Distinzione tra le specie a diversa tossicità; possibilità di misurare la specie As <sup>3+</sup> , direttamente responsabile degli effetti	Possibile miglioramento per lo studio dell'effetto critico (cancro), rispetto agli altri indicatori dell'elemento	As tot 5-350 µg/l, As <sup>3+</sup> , As <sup>5+</sup> , MMA, DMA 2 - 25 µg/l As <sup>3+</sup> +As <sup>5+</sup> n.d - 1,5 µg/l	Apostoli et al., 1998 (65) Apostoli 2003 (53)

Legenda: HPLC, cromatografia liquida ad alta pressione; ICP-MS, plasma ad accoppiamento induttivo-spettrometria di massa.

**Tabella VII. Nuove matrici per il monitoraggio biologico**

Sostanza	Nuova matrice	Applicazione	Relazione con l'ambiente	Metodo	Miglioramento rispetto ai precedenti indicatori	Relazione con gli effetti	Valori di riferimento	Bibliografia
COBALTO E TUNGSTENO	Correlati cutanei	Monitoraggio esposizione a metalli duri	Buone correlazione con i dati ambientali alla fine del turno, ottima con indicatori ematici, anche il giorno dopo	Wipe per prelievo ETAAS o ICP-MS per analisi	Facilità di esecuzione; correlazione con effetti locali	Da dimostrate	Da produrre	Apostoli et al., 2002 (66)
PIOMBO	Plasma	Monitoraggio esposizione a piombo	Buona correlazione, anche con PB ematico	ICP-MS previa separazione adeguata del plasma	Informazioni sulla frazione metabolicamente attiva	Ben dimostrata per effetti su eme	0,1 - 0,6 µg/l	Apostoli 2002 (53)
ELEMENTI DI TRANSIZIONE	Condensato dell'aria espirata (CAE)	Monitoraggio biologico di lavoratori esposti a carburo di tungsteno e cobalto	Non riscontrata	Il CAE è raccolto raffreddando l'aria esalata. Le misure sono eseguite in ICP-MS o ETAAS-Z (solo Co)	Consente di avere informazioni sulla dose efficace al bersaglio	Dimostrata tra livelli di Co e W esalato con livelli di malondialdeide esalata.	Non disponibili	Goldoni et al., 2004 (72)

Legenda: ETAAS spettroscopia di assorbimento atomico con fornetto di grafite; ICP-MS plasma ad accoppiamento induttivo-spettrometria di massa; LR limite di rivelabilità.

## Bibliografia

- 1) AAVV. Conference on beryllium related diseases. Environ Health Perspect 1996; 104: 935-1001.
- 2) Kauppinen T, Toikkanen J, Pedersen D, *et al.* Occupational exposure to carcinogens in the European Union. Occup Environ Med 2000; 57: 10-18.
- 3) Apostoli P, Minoia C, Gilberti ME. Determination of beryllium in urine by Zeeman graphite furnace atomic adsorption spectrometry in chemical laboratory and toxicology. Pergamon Press, London, 1992, pp. 495-516.
- 4) Angerer J, Schaller KH. Beryllium. Analysis of hazardous substances in biological materials, vol. 5°, Wiley-VCH, Weinheim, 1997.
- 5) Wegner R, Heinrich-Ramm R, Nowak D, *et al.* Lung function biological monitoring, and biological effect monitoring of gemstone cutters exposed to beryls. Occup Environ Med 2000; 57: 133-137.
- 6) Apostoli P, Schaller KH. A suitable tool for assessing occupational and environmental beryllium exposure? Int Arch Occup Environ Health 2001; 74: 162-167.
- 7) Krauss T, Scramel P, Schaller KH, Zobelein P, Weber A, Angerer J. Exposure assessment in the hard metal manufacturing industry with special regard to tungsten and its compounds. Occup Environ Med 2001; 58: 631-634.
- 8) Imbriani M, Zadra P, Negri S, Alessio A, Maestri L, Ghittori S. Biological monitoring of occupational exposure to sevoflurane. Med Lav 2001; 92: 173-180.
- 9) Haufroid V, Gardinal S, Licot C, Villapando ML, Van Obbergh L, Clippe A, Lison D. Biological monitoring of exposure to sevoflurane in operating room personnel by the measurement of hexafluoroisopropanol and fluoride in urine. Biomarkers 2000; 5: 141-151.
- 10) Scapellato ML, Carrieri M, Maccà I, Moretto J, Perini M, Virgili A, Gori G, Bartolucci GB. Monitoraggio ambientale e biologico dell'esposizione a sevoflurano in sala operatoria. G Ital Med Lav Erg 2003; 25: 253-257.
- 11) Alessio A, Zadra P, Negri S, Maestri L, Imberti R, Ghittori S, Imbriani M, Cavalleri A. Biological monitoring of occupational exposure to desflurane. G Ital Med Lav Ergon 2003; 25: 137-141.
- 12) Carrieri M, Scapellato ML, Maccà I, Virgili A, Perini M, Saia B, Bartolucci GB. Valutazione dell'esposizione a chemioterapici antitumorali del personale sanitario. G Ital Med Lav Erg 2003; 25: 209-214.
- 13) Carrieri M, Scapellato ML, Maccà I, Zoppellaro E, Salamon F, Cavedon F, Bartolucci GB. Determinazione della ciclofosfamide su superfici e nelle urine mediante gas cromatografia-spettrometria di massa. Folia Medica 2000; 71: 201-204.
- 14) Minoia C, Turci R, Sottani C, Perbellini L, Angeleri S, Frigerio F, Draicchio F, Apostoli P. La valutazione del rischio nel personale ospedaliero addetto alla preparazione e alla somministrazione di farmaci antitumorali. G Ital Med Lav Erg 1999; 21: 93-107.
- 15) Soave C, Giuliani C, Bartolucci GB, Carrieri M, Festa D, Sannolo N, Miraglia N, Acampora A, Liotti PL. Cyclophosphamide environmental contamination in drug reconstitution units in twenty one Italian hospitals. Eur. J. Hosp. Pharm. 2003; 9, 80-83.
- 16) Imbriani M, Niu Q, Negri S, Ghittori S. Trichloroethylene in urine as biological exposure index. Ind Health 2001; 39: 225-230.
- 17) Maccà I, Scapellato ML, Carrieri M, Lanzi C, Volpin A, Manno M, Trevisan A, Bartolucci GB. Indicatori di dose e di effetto in soggetti professionalmente esposti a percloroetilene. Folia Medica 2000; 71 (S2): 159-165.
- 18) Imbriani M, Maestri L, Marraccini P, Saretto G, Alessio A, Negri S, Ghittori S. Urinary determination of N-acetyl-S-(N-methylcarbamoyl)cysteine and N-methylformamide in workers exposed to N,N-dimethylformamide. Int Arch Occup Environ Health 2002; 75: 445-452.
- 19) Perbellini L, Princivale A, Caivano M, Montagnoli R. Biological monitoring of occupational exposure to N,N-dimethylacetamide with identification of a new metabolite. Occup Environ Med 2003; 60: 476-751.
- 20) Manini P, Andreoli R, Mutti A, Bergamaschi E, Niessen WM. Determination of *n*-hexane metabolites by liquid chromatography/mass spectrometry. 2. Glucuronide-conjugated metabolites in untreated urine samples by electrospray ionization. Rapid Commun Mass Spectrom 1998; 12: 1615-1624.
- 21) Manini P, Andreoli R, Mutti A, Bergamaschi E, Franchini I. Determination of free and glucuronated hexane metabolites without prior hydrolysis by liquid- and gas-chromatography coupled with mass spectrometry. Toxicol Lett 1999; 108: 225-231.
- 22) Manini P, Andreoli R, Bergamaschi E, De Palma G, Mutti A, Niessen WM. A new method for the analysis of styrene mercapturic acids by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 2000; 14: 2055-2060.
- 23) Manini P, Andreoli R, Poli D, De Palma G, Mutti A, Niessen WM. Liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry characterization of styrene metabolism in man and in rat. Rapid Commun Mass Spectrom 2002; 16: 2239-2248.
- 24) De Palma G, Manini P, Mozzoni P, Andreoli R, Bergamaschi E, Cavazzini S, Franchini I, Mutti A. Polymorphism of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes and Excretion of Styrene-Specific Mercapturic Acids. Chem Res Toxicol 2001; 14: 1393-1400.
- 25) Manini P, De Palma G, Mozzoni P, Andreoli R, Poli D, Bergamaschi E, Franchini I, Mutti A. GSTM1 polymorphism and styrene metabolism: insights from an acute accidental exposure. Toxicol Lett. 2002; 134: 201-208.
- 26) Haufroid V, Buchet J-P, Gardinal S, Ghittori S, Imbriani M, Hirvonen A, Lison D. Importance of genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes for the interpretation of biomarkers of exposure to styrene. Biomarkers 2001; 6: 236-249.
- 27) Haufroid V, Jakubowski M, Janasik B, Ligočka D, Buchet J-P, Bergamaschi E, Manini P, Mutti A, Ghittori S, Arand M, Hangen N, Oesch F, Hirvonen A, Lison D. Interest of genotyping and phenotyping of drug-metabolizing enzymes for the interpretation of biological monitoring of exposure to styrene. Pharmacogenetics 2002; 12: 691-702.
- 28) Manini P, Buzio L, Andreoli R, Goldoni M, Bergamaschi E, Jakubowski M, Vodicka P, Hirvonen A, Mutti A. Assessment of the biotransformation of the arene moiety of styrene in volunteers and occupationally exposed workers. Toxicol Appl Pharmacol 2003; 189: 160-169.
- 29) De Palma G, Mozzoni P, Scotti E, Manini P, Andreoli R, Naccarati A, Mercati F, Migliore L, Mutti A. Polimorfismi genetici degli enzimi della biotrasformazione ed effetti genotossici dello stirene. G Ital Med Lav Ergon 2003; 25 (3 Suppl): 63-64.
- 30) Manini P, De Palma G, Andreoli R, Goldoni M, Mutti A. Determination of urinary styrene metabolites in the general Italian population by liquid chromatography *tandem* mass spectrometry. Int Arch Occup Environ Health 2004; 77: 433-436.
- 31) Fustinoni S, Soleo L, Warholm M, Begemann P, Rannug A, Neumann H-G, 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.
- 32) Fustinoni S, Perbellini L, Soleo L, Manno M, Foà V. Biological monitoring in occupational exposure to low level of 1,3-butadiene. Toxicol Lett 2004; 149: 353-360.
- 33) Begemann P, Upton PB, Ranasinghe A, Swenberg JA, Soleo L, Vimercati L, Gelormini A, Fustinoni S, Zwirner-Baier I, Neumann H-G. Hemoglobin adducts as biomarkers of 1,3-butadiene in occupationally low exposed Italian workers and few diesel-exposed miners. Chem Bio Interact 2001; 135-136: 675-678.
- 34) Fustinoni S, Buratti M, Giampiccolo R, Brambilla G, Foà V, Colombi A. Comparison between blood and urinary toluene as biomarkers of the exposure to toluene. Int Arch Occup Environ Health 2000; 73: 389-396.
- 35) Fustinoni S, Mercadante R, Campo L, Scibetta L, Valla C, Foà V. Confronto tra *orto*-cresolo e toluene urinari come indicatori biologici di esposizione a toluene aerodisperso. 67° Congresso SIMLII, Sorrento 2004.
- 36) Ghittori S, Alessio A, Negri S, Maestri L, Zadra P, Imbriani M. A field method for sampling toluene in end-exhaled air, as a biomarker of occupational exposure: correlation with other exposure indices. Ind Health 2004 Apr; 42: 226-234.
- 37) Pieri M, Miraglia N, Acampora A, Soleo L, Sannolo N. Determinazione di Benzene e Acido S-fenil mercapturico urinari nella valutazione dell'esposizione professionale a Benzene. G Ital Med Lav Erg 2003; 25 3 Suppl.: 348.
- 38) Fustinoni S, Campo L, Buratti M, Consonni D, Pesatori A, Bertazzi PA, Foà V, Merlo F. Confronto tra acido *t,t*-muconico, acido S-fenilmercapturico e benzene urinari come indicatori biologici di esposizione a basse concentrazioni di benzene aerodisperso. G Ital Med Lav Erg 2003; 25: 4.

- 39) Fustinoni S, Giampiccolo R, Pulvirenti S, Buratti M, Colombi A. Headspace solid-phase microextraction for the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in urine. *J Chromatogr B* 1999; 723: 105-115.
- 40) Andreoli R, Manini P, Bergamaschi E, Brustolin A, Mutti A. Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for determination of monoaromatic hydrocarbons in blood and urine: application to people exposed to air pollutants. *Chromatographia* 1999; 50: 167-172.
- 41) Perbellini L, Pasini F, Romani S, Princivale A, Brugnone F. Analysis of benzene, toluene, ethylbenzene and m-xylene in biological samples from the general population. *J Chromatogr B* 2002; 778: 199-210.
- 42) Perbellini L, Buratti M, Fiorentino ML, Fustinoni S, Pasini F, Magnaghi S. Matrix interferences in the analysis of benzene in urine. *J Chromatogr B* 1999; 724: 257-264.
- 43) Buratti M, Brambilla G, Fustinoni S, Pellegrino O, Pulvirenti S, Colombi A. Determination of monofluorobimane derivatives of phenylmercapturic and benzylmercapturic acids in urine by high-performance liquid chromatography and fluorimetry. *J Chromatogr B* 2001; 751: 305-313.
- 44) Andreoli R, Manini P, Bergamaschi E, Mutti A. Determinazione dell'acido S-fenilmercapturico mediante cromatografia liquidaspettrometria di massa tandem con ionizzazione electrospray. XX Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana, Rimini, 4-9 giugno 2000.
- 45) Pieri M, Miraglia N, Acampora A, Genovese G, Soleo L, Sannolo N. Determination of urinary S-phenylmercapturic acid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr. B* 2003; 795: 347-354.
- 46) Giarin E, Gori G, Perico A, Bavazzano P, Pasin P, Bartolucci GB. Metodo per la determinazione di basse concentrazioni dell'acido trans,trans-muconico urinario. Atti del 16° Congresso Nazionale della Associazione Italiana degli Igienisti Industriali, Faenza, 19-21 giugno 1997. Le Collane della Fondazione Salvatore Maugeri, I documenti, 14, pp. 206-208.
- 47) Bartolucci GB, Giarin E, Carrieri M, Guarnieri G, Maccà I, Volpin A. Esposizione a benzene di conducenti di autobus urbani. *Lavoro e Medicina* 1999; 2: 65-68.
- 48) Bartolucci GB, Giarin E, Carrieri M, Scapellato ML, Marcuzzo G, Gori G, Chatzis C, Cocheo V, Saia B. Exposure to benzene and urinary excretion of *trans,trans*-muconic acid in general population of Padua and Athens. Proceedings of International Conference Air Quality in Europe Challenges for the 2000s. Venice, 19-21 May 1999.
- 49) Negri S, Maestri L, Alessio A, Ghittori S, Imbriani M. Determinazione dell'acido sorbico urinario mediante LC-MS. *G Ital Med Lav Erg* 2003; 25 (3 Suppl): 387-388.
- 50) Fustinoni S, Campo L, Colosio C, Birindelli S, Foà V. A gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of urinary ethylenthiourea in humans. *J Chromatogr B* (accettato).
- 51) Colosio C, Fustinoni S, Birindelli S, Bonomi I, De Paschale G, Mammone T, Tiramani M, Vercelli F, Visentin S, Maroni M. Ethylenethiourea in urine as an indicator of exposure to mancozeb in vineyard workers. *Toxicol Lett* 2002; 134: 133-140.
- 52) Lichtenstein N, Pfaumbaum W, Quellmalz K, Bernards M, Henning M. Qualitative analysis of carcinogenic aromatic amines from azo dyes after azo cleavage. *Reinhaltung der Luft* 1997; 57: 139-145.
- 53) Pavan I, Buglione E, Passini V, Botta GC, Cugliari G, Merlo E, Pira E, Graziano M. L'utilizzo del monitoraggio biologico in addetti alla preparazione di vernici in polvere come strumento per l'identificazione del rischio da ammine aromatiche (3,3'-diclorobenzidina). Atti XVIII Congresso Nazionale AIDII, 2000, 87-93.
- 54) Pavan I, Baroffio C, Buglione E, Passini V, Pira E. Ammine aromatiche ad azione cancerogena certa, probabile o possibile: valori di riferimento. *G Ital Med Lav Erg* 2003; 25: 68-73.
- 55) Schramel P, Wendler I, Angerer J. The determination of metals (antimony, bismuth, lead, cadmium, mercury, palladium, platinum, tellurium, tin and tungsten) in urine samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Int Arch Occup Environ Health* 1997; 69: 219-223.
- 56) Apostoli P. Rischii correlati all'esposizione lavorativa a metalli. Linee Guida SIMLII per i medici del lavoro", Pavia 19-20 maggio 2003.
- 57) Apostoli P, Cortesi I. Quadro sulle criticità ambientali delle acciaierie elettriche. Atti del Convegno Nazionale su "Quadro di riferimento sull'impatto ambientale dell'industria metallurgica", Brescia, 12 giugno 2003.
- 58) Apostoli P, Giusti S, Bartoli D, Perico A, Bavazzano P, Alessio L. Multiple exposure to arsenic, antimony and other elements in art glass manufacturing *Am J Ind Med* 1998; 34: 65-72.
- 59) Scibetta L, Campo L, Mercadante R, Buratti M, Rubino FM, Colombi A, Foà V, Fustinoni S. Valutazione di MtBe urinario indicatore biologico di esposizione a vapori di benzina e traffico autoveicolare. 67° Congresso SIMLII, Sorrento 2004 (Sottoposto).
- 60) Saarinen L, Hakkola M, Pekari K, Lappalainen K, Aitio A. Exposure of gasoline road-tanker drivers to methyl tert-butyl ether and methyl tert-amyl ether. *Int Arch Occup Environ Health* 1998; 71: 143-147.
- 61) Perbellini L, Pasini F, Prigioni P, Rosina A. Esposizione professionale a metil tert-butiletere (MTBE) in una raffineria di petrolio. *G Ital Med Lav Ergon* 2003; 25 (3 Suppl): 39-40.
- 62) Buratti M, Pellegrino O, Brambilla G, Colombi A. Urinary excretion of 1-hydroxypyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from different sources. *Biomarkers* 2000; 5: 368-381.
- 63) Waidyanatha S, Zheng Y, Rappaport SM. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine of coke oven workers by headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Chem Bio Interact* 2003; 145: 165-174.
- 64) Campo L, Addario L, Scibetta L, Buratti M, Foà V, Longhi O, Cirila P, Martinetti I, Fustinoni S. Nuovi indicatori per il monitoraggio biologico dell'esposizione a idrocarburi policiclici aromatici: gli IPA urinari. 67° Congresso SIMLII, Sorrento 2004 (Sottoposto).
- 65) Apostoli P, Brugnone F, Perbellini L, Fraccaroli V, Cocheo V. Esposizione professionale a policlorobifenili: identificazione e dosaggio dei singoli composti nell'aria ambientale e nel sangue. *Ann Ist Sup Sanità* 1982; 18: 1065-1068.
- 66) Gladen BC, Doucet J, Hansen LG. Assessing human polychlorinated biphenyl contamination for epidemiologic studies: lessons from patterns of congener concentration in Canadians in 1992. *Environ Health Perspect* 2003, 111: 437-443.
- 67) Apostoli P. Elements in environmental and occupational medicine. *J Chromatogr B* 2002; 778: 63-97.
- 68) Apostoli P, Bartoli D, Alessio L, Buchet J-P. Biological monitoring of occupational exposure to inorganic arsenic. *Occup Environ Med* 1998; 12: 825-832.
- 69) Apostoli P, Fenga C, Sarnico M, Germanò D. Cute, suoi annessi e secreti come matrici per il monitoraggio biologico di elementi tossici. *G Ital Med Lav Erg* 2002; 24: 188-191.
- 70) Bergdahl IA, Schutz A, Gerhardsson L, Jensen A, Skefering S. Lead concentration in human plasma, urine, and whole blood. *Scand J Work Environ Health* 1997; 23: 289-293.
- 71) Smith D, Hernandez-Avila M, Tellez-Rojo MM, Mercado A, Hu H. The relationship between lead in plasma and whole blood in women. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 263-265.
- 72) Hirata M, Yoshida T, Miyajima K, Kosoka H, Tabuchi T. Correlation between lead in plasma and other of lead exposure lead-exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health*, 1995; 68: 58-63.
- 73) Neri G, Apostoli P. "Risultati della ricerca cofinanziata MIUR - Esposizione ambientale ed occupazionale a piombo inorganico: studio degli effetti tossici conseguenti alle dosi correnti e delle relative misure preventive. Indicatori di effetto sull'eme" Atti del congresso nazionale, pp. 6-7, Brescia, 2004.
- 74) Mutti M, Corradi M, Apostoli P, Andreoli R, Goldoni M, Manini P, Vettori MV, Rubinstein I. Exhaled breath condensate as a tool to assess target tissue dose and effects of pneumotoxic metals. American Thoracic Society (ATS) 99<sup>th</sup> International Conference, Seattle May 2003.
- 75) Goldoni M, Catalani S, De Palma G, Manini P, Acampa O, Corradi M, Bergonzi R, Apostoli P, Mutti A. Exhaled breath condensate as a suitable matrix to assess lung dose and effects in workers exposed to cobalt and tungsten. *Environ Health Perspect*, 2004; 112: 1293-1298 [Epub ahead of print Jun 10, 2004].
- 76) Gil F, Pla A. Biomarkers as biological indicators of xenobiotics exposure. *J Appl Toxicol* 2001; 21: 245-255.
- 77) Silbergeld EK, Davis DL. Role of biomarkers in identifying and understanding environmentally induced disease. *Clin Chem* 1994; 40: 1363-1367.
- 78) Aitio A. Biomarkers and their use in occupational medicine. *Scand J Work Environ Health* 1999; 25: 521-528.
- 79) ACGIH. Threshold Limits Values and Biological exposure Indices, 2003, Cincinnati OH USA.
- 80) DFG List of MAK and BAT values, 2003, Wiley VCH GmbH & KgaA, Weinheim D.