

L. Di Lorenzo¹, L. Soleo¹, F. Cassano¹, G. Elia², N. Schiavulli¹, M.G. Martino¹, M. Corfiati¹, D. Bulfaro¹, P. Apostoli³

Anemie in lavoratori esposti a piombo: attualità della diagnosi differenziale

¹ Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Pubblica - Sezione di Medicina del Lavoro - Università di Bari

² Fondazione S. Maugeri Pavia - Centro Igiene Ambientale - Università di Bari

³ Dipartimento di Medicina Sperimentale ed Applicata - Sezione di Medicina del Lavoro e Igiene Industriale, Università degli Studi di Brescia

RIASSUNTO. L'esposizione professionale a piombo metallico (Pb) è in grado di determinare anemia per valori di piombemia >50 µg/dl, ormai poco frequenti nei Paesi industrializzati. Soprattutto in zone ad alta endemia per anemie extraprofessionali, quali la β-Talassemia e la anemia sideropenica, è invece discretamente probabile riscontrare in lavoratori esposti al metallo altre forme di anemia. Queste devono essere correttamente inquadrare dal punto di vista etiologico, sia per un adeguato indirizzo terapeutico sia per le evidenti ricadute medico-legali. L'obiettivo di questo studio è stato di verificare se, in lavoratori maschi esposti a piombo, una attenta valutazione dei parametri dell'esame emocromocitometrico e dei comuni indicatori di esposizione e di effetto del Pb sull'eme, possa permettere di discriminare le forme più comuni di anemia riscontrabili nella popolazione in età lavorativa dell'Italia meridionale. Sono stati esaminati 68 lavoratori professionalmente esposti a dosi medio-basse di Pb e, come gruppo di controllo, 59 lavoratori di un'azienda alimentare. Su campioni di sangue venoso prelevati da tali lavoratori è stato eseguito un esame emocromocitometrico completo e la determinazione dei livelli di piombemia e di zinco protoporfirina. Sono risultati portatori di anemia (Hb<13g/dl) sei lavoratori esposti a piombo ed un lavoratore non esposto. La valutazione ragionata dei parametri di laboratorio ha portato ad individuare, tra i lavoratori esposti a Pb, quattro soggetti con elevata probabilità di trait β-talassemico e due lavoratori con anemia saturnina. Sulla base dei dati di letteratura, inoltre, è stato elaborato un algoritmo diagnostico che sembrerebbe capace di discriminare i casi di anemia di origine saturnina da quelli da altra causa nei lavoratori esposti a Pb esaminati in questo studio.

Parole chiave: anemie, anemia saturnina, piombo, diagnosi differenziale.

ABSTRACT. www.gimle.fsm.it

Occupational lead exposure can cause anemia at blood lead levels >50 µg/dl, as high as rarely occurs in industrialized countries nowadays. Whereas other forms of anemia are fairly probable to be found in lead exposed workers, especially in areas highly endemic for extraoccupational anemias, such as beta thalassemia and iron deficiency anemia. The etiology of anemias has to be correctly defined in order to assess suitable therapeutical approaches and medicolegal consequences. The objective of this study is to verify in male lead exposed workers whether an accurate evaluation of hemocromocytometric parameters and of usual biological indices of lead exposure and effect on heme can differentiate the most common forms of anemia in Southern Italy. 68 workers occupationally exposed to low to moderate lead doses were studied and 59 workers of an alimentary plant have been taken as control group. On venous blood samples collected from these workers a complete hemocromocytometric test was performed and blood lead and erythrocytic zincoprotoporphyryn were determined. Anemia (Hb<13g/dl) was detected in six lead exposed workers and in a non-exposed worker. The reasoned evaluation of laboratory parameters led to identify among lead exposed workers four subjects with high probability of beta-thalassemic trait and two with lead poisoning anemia. Moreover a diagnostic algorithm was developed based on literature that seems to be able to discriminate lead poisoning from other causes of anemia in lead exposed workers in this study.

Key words: anemias, lead poisoning anemia, lead, differential diagnosis.

Introduzione

L'intossicazione cronica da piombo metallico può determinare con diversi meccanismi patogenetici una particolare forma di anemia dose dipendente (1, 2). In effetti l'anemia saturnina cronica è un'anemia generalmente ritenuta ipocromica, per la ben nota capacità del metallo di inibire alcuni enzimi necessari per la biosintesi dell'eme (3). In particolare l'inibizione dell'enzima acido delta-aminolevulinico deidratasi è già evidenziabile per valori di piombemia al di sopra di 5 µg/dl, mentre l'inibizione dell'enzima ferrochelatasi, con il conseguente aumento del livello ematico della zinco-protoporfirina (ZPP) oltre i 35 µg/dl, interviene per piombemie superiori a 30 µg/dl (4). Inoltre, il piombo ha effetti anemizanti anche perché determina una riduzione dell'emivita in circolo degli eritrociti (5), sia per un'azione emolitica diretta a livello della membrana eritrocitaria (6, 7), sia mediante l'inibizione dell'attività della pirimidina 5'-nucleotidasi (8, 9), già evidenziabile a livelli di piombemia al di sopra di 10 µg/dl (4). Il piombo sarebbe infine capace di determinare una eritropoiesi inefficace ed una inappropriata produzione di eritropoietina (10).

A fronte della molteplicità dei meccanismi attraverso cui si esplica l'azione tossica del piombo sulla linea cellulare eritroide, le caratteristiche morfofunzionali degli eritrociti, nell'anemia saturnina, non sono univocamente definite. In letteratura infatti, nell'intossicazione cronica da piombo è riportata un'anemia descritta ora come normocitica (1, 11, 12, 13) ora come microcitica, specie in età infantile (14, 15). Anche le più recenti segnalazioni di intossicazioni extraprofessionali in soggetti adulti non chiariscono se l'anemia saturnina si presenta in forma microcitica o normocitica (16, 17, 18).

Una riduzione patologica dei livelli di emoglobina è comunque riportata in lavoratori professionalmente esposti a piombo inorganico per livelli di piombemia superiori a 50 µg/dl. Un valore di piombemia (PbB) >50 µg/dl potrebbe pertanto essere considerato il Lowest Observed Effect Level (LOEL) del metallo, capace di determinare una anemia clinicamente rilevante (19, 20).

Negli ultimi decenni, la progressiva riduzione dell'esposizione professionale a piombo nei Paesi industrializzati, ottenuta con gli adeguati interventi di prevenzione

primaria e secondaria, ha determinato una netta riduzione della frequenza di questa particolare forma di anemia (21). D'altra parte è tuttora possibile il riscontro di casi sporadici di anemia saturnina in lavoratori con particolari situazioni lavorative e, soprattutto, in lavoratori provenienti da Paesi in via di sviluppo, con pregressa e prolungata esposizione al metallo e che hanno una diversa sensibilità nei confronti della sicurezza e dell'igiene del lavoro (22, 23, 24).

Bisogna poi considerare la probabilità di riscontrare in lavoratori esposti a piombo quadri di anemia, spesso clinicamente silenti e di eziologia misconosciuta. In diversi Paesi, mediterranei e non, sono infatti endemicamente presenti nella popolazione generale in età lavorativa alcune forme di anemia (25). Tra queste le più comuni sono la β -talassemia e l'anemia sideropenica. La β -talassemia, nella sua forma eterozigote, si presenta come un'anemia ipocromica e microcitica (26), caratterizzata da un incremento (>3,6%) di Emoglobina A2, con o senza aumento (>2%) dell'Emoglobina F (27). L'anemia sideropenica è un'anemia ipocromica, caratterizzata, nei maschi, da valori di Emoglobina <13g/dl, di Ferritina serica <16mg/dl e da una saturazione della Transferrina <15% (27). La carenza di ferro sembra aumentare la suscettibilità verso gli effetti adverse del piombo sull'organismo e, in particolare, sul metabolismo dell'eme (28). Le interazioni fra gli effetti dell'iposideremia e gli effetti del piombo nei lavoratori esposti non sono completamente conosciuti. È stato comunque dimostrato che questi due metalli condividono parte dei rispettivi meccanismi patogenetici sulla sintesi dell'emoglobina e sono assorbiti nell'intestino legati allo stesso trasportatore di metalli bivalenti, recentemente identificato (29, 30).

In corso di sorveglianza sanitaria di lavoratori esposti a piombo, queste anemie possono richiedere al medico del lavoro una attenta diagnosi differenziale con l'anemia saturnina, anche in fase preclinica, sia per un adeguato indirizzo terapeutico sia per le evidenti ricadute medico-legali. Discriminare le tre suddette forme di anemia può non essere sempre agevole, se non sono disponibili i risultati delle rispettive analisi di laboratorio specifiche e di secondo livello.

Questo studio ha pertanto l'obiettivo di verificare in lavoratori maschi esposti a piombo metallico se una attenta valutazione dei diversi parametri facilmente ottenibili dall'esame emocromocitometrico e di alcuni indicatori di esposizione e di effetto del piombo sull'eme, comunemente determinati nell'ambito del monitoraggio biologico, possa permettere di discriminare le forme di anemia più comunemente riscontrabili.

Metodi

Lo studio è stato condotto su 68 lavoratori maschi esposti professionalmente a piombo inorganico (E), che operano in un'azienda ceramica (n=14), in una fonderia di rottami di piombo (n=44) e in un'azienda produttrice di pallini da caccia (n=10). Il gruppo di controllo è costituito da 59 lavoratori di un'azienda alimentare (NE). Tutte le

aziende, come pure le aree geografiche di origine dei lavoratori, sono situate nell'Italia meridionale.

I criteri di inclusione nello studio prevedevano l'assenza di patologie anche extraprofessionali in grado di determinare disturbi dell'emopoiesi e, per i lavoratori E, un'anzianità lavorativa di almeno un anno. Tutti i lavoratori hanno fornito il consenso informato a partecipare allo studio. Un unico medico del lavoro ha quindi raccolto, tramite un questionario standardizzato, le informazioni sulle abitudini di vita e le anamnesi familiari, patologiche e lavorative di tutti i lavoratori in studio. Le medie relative al fumo di tabacco e al consumo di alcol sono state calcolate solo sui soggetti *attualmente* fumatori e bevitori rispettivamente. Lo stesso sanitario ha eseguito l'esame obiettivo degli stessi lavoratori.

Constato che tutti i lavoratori selezionati rispondevano ai suddetti criteri, essi sono stati ammessi al prelievo di sangue venoso, eseguito al mattino, a digiuno, prima dell'inizio del turno lavorativo.

Un campione di 2,5 ml di sangue raccolto in EDTA è stato utilizzato per l'esame emocromocitometrico, eseguito mediante un contatore cellulare semiautomatico modello Coulter JT. In particolare il conteggio dei globuli rossi (RBC) è stato effettuato utilizzando il principio impedenziometrico di Coulter sulla base dell'analisi differenziale del Volume e della Conducibilità delle cellule. La misurazione della concentrazione di emoglobina (Hb) è stata condotta mediante metodo colorimetrico con lettura ad una lunghezza d'onda di 525 nm. L'anemia è stata definita per valori di Hb inferiori a 13 g/dl, in base ai criteri dell'Organizzazione Mondiale della Sanità per la popolazione adulta maschile a livello del mare (31).

L'ematocrito (HCT) è stato automaticamente calcolato secondo l'equazione: $RBC (10^6/\mu l) * MCV (fl) / 10$. Il volume corpuscolare medio (MCV) è stato derivato come media dall'istogramma corrispondente alla distribuzione volumetrica dei globuli rossi (somma dei prodotti dei singoli volumi per il numero di cellule corrispondenti per tutto l'ambito di volume selezionato=area sotto la curva/numero totale di cellule contate). Una condizione di microcitosi è stata definita sulla base del riscontro di valori di $MCV < 80 fl$ (32).

Il contenuto corpuscolare medio di emoglobina (MCH) è stato calcolato secondo la formula: $Hb (g/dl) * 10 / RBC (10^6/l)$. Il riscontro di valori di $MCH < 27 pg$ definisce un'anemia come ipocromica (33).

È stato calcolato il rapporto $MCV (fl) / RBC (10^6/\mu l)$ o indice di Mentzer (IM) (34), il cui valore inferiore a 13 è capace di discriminare con buona accuratezza la β -talassemia eterozigote dalle altre forme di anemia microcitica (35, 36).

La lettura al microscopio ottico dello striscio di sangue, eseguito su tutti i campioni di sangue disponibile per evidenziare eventuali alterazioni morfologiche a carico dei globuli rossi e/o degli altri elementi corpuscolari, è stata per tutti negativa.

La sideremia è stata misurata con metodo colorimetrico. La saturazione di transferrina è stata calcolata sulla base della sideremia e della concentrazione serica di transferrina misurata mediante immunodiffusione radiale. La

ferritina è stata determinata mediante test immunoenzimatico con rivelazione in immunofluorescenza (ELFA).

Su 2 ml di sangue anticoagulato con sodio eparina è stata eseguita la determinazione della PbB e della ZPP.

La misurazione dei livelli di PbB è stata effettuata mediante uno spettrofotometro ad assorbimento atomico Perkin Elmer 5100ZL con fornello di grafite. Il campione di sangue eparinizzato è stato diluito con una soluzione allo 0,2% di Triton X-100. Come modificatore di matrice è stato utilizzato nitrato di magnesio. I campioni diluiti (20 µl) sono stati iniettati nel fornello. Le condizioni strumentali di misura sono quelle riportate nel manuale d'uso. L'assorbanza è stata letta a 283,3 nm con correzione del fondo ad effetto Zeeman (37).

La ZPP è stata determinata mediante ematofluorimetro (Hemafluor ZP, Buchler).

Analisi statistica

Le variabili che hanno presentato un rapporto tra l'asimmetria ed il suo errore standard superiore o uguale a 2 sono state considerate distribuite non normalmente e quindi trasformate in logaritmo in base 10, prima di essere analizzate. La media geometrica è stata impiegata per presentare le variabili che si distribuiscono in maniera non normale. I confronti fra le medie delle variabili continue sono stati effettuati con l'analisi della varianza (ANOVA) a una via. L'associazione fra variabili categoriche è stata valutata mediante il test del chi-quadrato e mediante il calcolo dell'eventuale Odds Ratio (OR) con il relativo intervallo di confidenza al 95% (IC 95%).

Il livello di significatività statistica accettato è stato del 5%. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (38).

Risultati

In tabella I sono presentate le caratteristiche anagrafiche, antropometriche e relative alle principali abitudini di vita dei lavoratori E e NE. I soggetti attualmente fumatori sono risultati più frequenti tra gli E (41/68; 60%) che tra i NE (19/59; 32%) (chi-quadro=17,8; p<0,001). I soggetti attualmente bevitori sono risultati solo leggermente più frequenti tra i NE (54/59; 91,5%) che tra gli E (51/68; 75%) (chi-quadro= 6,02; p<0,05). Tra i 68 lavoratori E 35 (51,5%) sono risultati in sovrappeso (BMI 25-29,9 kg/m²) e 15 (22%) obesi (BMI ≥30 kg/m²), tra i 59 lavoratori NE 32 (54%) sono risultati in sovrappeso e 12 (20%) obesi (chi-quadro= 0,10; n.s.).

La media geometrica (deviazione standard geometrica; minimo - massimo) di PbB è risultata nei 68 lavoratori E di 20,2 (3,4; 3,2-120,0) µg/dl, nei 59 lavoratori NE di 3,5 (1,8; 1,0-11,0) µg/dl, (F=237,8; p<0,001); quella di ZPP è risultata negli E di 18,2 (2,1; 2,0-

Tabella I. Confronto fra le medie delle caratteristiche anagrafiche, antropometriche e relative alle principali abitudini di vita dei lavoratori non esposti (NE) ed esposti (E)

	NON ESPOSTI n. 59	ESPOSTI n. 68	AN.O.VA
Età (anni)			
media	46,8	44,0	F=4,5
d.s.	7,0	7,8	P<0,05
min-max	25-61	30-62	
Anzianità lavorativa (anni)			
media	20,9	16,2	F=13,5
d.s.	5,8	8,1	p=0,0001
min-max	2-31	1-31	
B.M.I. (kg/m ²)			
media	27,4	27,3	F=0,04
d.s.	3,7	3,6	n.s.
min-max	20,8-42,4	20,4-37,8	
Fumo (pack-years)			
media geometrica	n. 19 13,5	n. 41 10,5	F=0,85
d.s. geometrica	2,8	2,7	n.s.
min-max	1,4 - 56,5	0,5 - 46	
Alcol (g/die)			
media geometrica	n. 54 12,2	n. 51 22,1	F=8,1
d.s. geometrica	3,9	1,9	p=0,005
min-max	0,7-67,5	2,0-92,9	

630,0) µg/dl, nei NE di 5,0 (1,6; 2,0-29,0) µg/dl, (F=54,4; p<0,001).

Sono risultati portatori di Hb<13g/dl, ovvero di anemia (27), 1/59 (1,7%) NE e 6/68 E (8,8%) (chi quadrato=3,1; n.s.; O.R.=5,61; 95% I.C.=0,66-48,04). Il lavoratore NE con anemia ha un'età superiore a 40 anni, è normopeso, fumatore e bevitore. Dei 6 lavoratori E portatori di anemia tutti presentano un'età superiore a 40 anni e sono bevitori, 4 sono sovrappeso, 3 sono fumatori e 3 ex fumatori. In tabella II sono presentati i valori dell'emocromo, l'IM, i livelli di PbB e di ZPP di questi 7 lavoratori portatori di anemia.

Le medie di RBC, Hb, Hct, MCV e MCH non sono risultate significativamente diverse fra i restanti 62 E e 58 NE esenti da anemia (dati non presentati).

Tabella II. Caratteristiche dei sei lavoratori esposti (E 1-6) e del lavoratore non esposto (NE), portatori di anemia

	RBC (x10 ⁶ /µl)	Hb (g/dl)	HCT (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	IM	PbB (µg/dl)	ZPP (µg/dl)
E 1	4,430	12,8	36,8	>80	>27,0	>13,0	11,6	4
E 2	5,700	10,9	35,4	62	19,1	10,9	38,4	67
E 3	5,670	12,4	39,5	68	21,9	12,0	46,0	12
E 4	6,090	12,6	39,8	65	20,0	10,7	24,9	24
E 5	5,960	12,2	38,0	64	20,5	10,7	66,0	108
E 6	4,200	12,5	37,4	>80	>27,0	>13,0	120,0	630
NE	4,400	12,8	37,4	>80	>27,0	>13,0	1,7	29

Discussione

Tra i lavoratori E la frequenza di soggetti portatori di anemia è superiore a quella dei NE, ma non in misura statisticamente significativa. La mancata associazione fra anemia ed esposizione al metallo, in questo studio, sembra dipendere non solo dalla relativamente bassa numerosità del campione esaminato, ma anche dall'esiguo numero di lavoratori esposti con $PbB > 50 \mu\text{g/dl}$ (otto soggetti). Sono stati comunque individuati sei lavoratori esposti portatori di anemia.

Molte forme di anemia, e in particolare la β -Talassemia minor, le anemie sideropeniche e la stessa anemia saturnina presentano caratteristiche in parte sovrapponibili fra di loro e non sono discriminabili da un solo parametro emocromocitometrico. È inoltre possibile, anche se relativamente raro, che in uno stesso soggetto, magari esposto a Pb, si realizzino più condizioni di anemia, soprattutto in Paesi ad elevata endemia per anemia sideropenica e per β -Talassemia minor, come l'Italia (39). Durante l'esecuzione della sorveglianza sanitaria e del monitoraggio biologico di lavoratori esposti a piombo, al fine di poter formulare una prima ipotesi sull'etiologia dell'anemia eventualmente riscontrata, è pertanto opportuno considerare la combinazione di più valori dell'esame emocromocitometrico e dei più consolidati indicatori di dose interna e di effetto del metallo sul metabolismo dell'eme, cioè della PbB e della ZPP rispettivamente. A tal proposito, appare pertanto utile seguire dei percorsi diagnostici di primo livello, al fine di arrivare a una prima definizione etiologica delle forme di anemia riscontrabili in corso di sorveglianza sanitaria periodica di lavoratori esposti a piombo.

Dei sei lavoratori esposti da noi riconosciuti portatori di anemia, quattro presentano una forma microcitica ($MCV < 80$ fl) e due una forma normocitica ($80 \leq MCV < 100$ fl).

Su questi sei soggetti sono stati determinati la saturazione di transferrina e i livelli sierici di sideremia e ferritina, che sono risultati tutti nella norma (dati non presentati).

Le quattro anemie microcittiche sono tutte caratterizzate da un MCV addirittura inferiore a $72,0$ fl, da un $IM < 13$ e da un $MCH < 27$ pg. Il riscontro di un $MCV \leq 72$ fl permette di riconoscere il trait β -talassemico, con una sensibilità dell'88% e una specificità dell'84% (36). Valori di $IM < 13$ e di $MCV \leq 72$ fl sono risultati capaci di discriminare tra i casi di anemia microcitica, con un'accuratezza rispettivamente del 91,6% e del 82,4%, quelli con e senza trait β -talassemico, in un gruppo di giovani mediterranei sani di età compresa fra i 16 e i 18 anni (35). Lo stesso $IM < 13$ ha presentato un valore predittivo positivo del 91% nel discriminare, tra le anemie microcittiche, il trait β -talassemico dalle forme sideropeniche in un gruppo di studenti asiatici apparentemente sani (40). Inoltre, in soggetti anemici, valori di $MCH < 27$ pg sono fortemente associati alla presenza di trait β -talassemico, tanto da giustificare pienamente l'esecuzione di ulteriori livelli diagnostici (33). Un $MCH < 27$ pg sarebbe un indicatore sensibile nell'identificazione di trait β -talassemico anche in presenza di deficit marziale (41).

Pertanto il contemporaneo riscontro nei quattro lavoratori E con anemia microcitica di queste tre caratteristiche ($MCV < 72,0$ fl, $IM < 13$, $MCH < 27$ pg), ottenibili dall'esame emocromocitometrico di routine, possono orientare verso un primo fondato sospetto diagnostico di trait β -talassemico.

Inoltre, gli stessi quattro E presentano valori di ZPP pari a 12, 24, 67, $108 \mu\text{g/dl}$ e valori di PbB pari a 46,0, 24,9, 38,4, $66,0 \mu\text{g/dl}$ rispettivamente. Il livello ematico di ZPP , oltre che per effetto della contaminazione da piombo, può aumentare in varie condizioni patologiche, alcune anche di frequente riscontro, quali le anemie da carenza di ferro (42), le anemie emolitiche (42, 43), le anemie sideroblastiche (44), la protoporfia eritropoietica (45), le flogosi croniche (46, 47). La ZPP risulta invece pressoché normale o solo lievemente aumentata nelle forme di β -Talassemia minor (39, 48, 49). Dal momento che la ZPP può aumentare anche in tutte queste condizioni patologiche (47) essa mantiene la sua validità come indicatore di effetto precoce del piombo sul metabolismo dell'eme dei lavoratori esposti, ma non può essere utilizzata per la valutazione periodica della dose interna di Pb, che tuttora trova nella PbB il suo indicatore più specifico (50, 51).

Pertanto, in soggetti con livelli di $PbB < 50 \mu\text{g/dl}$ e in presenza di $IM < 13$, valori di ZPP normali o solo lievemente aumentati ($< 50 \mu\text{g/dl}$) rafforzano il sospetto diagnostico di trait β -talassemico isolato. Sempre in presenza di livelli di $PbB < 50 \mu\text{g/dl}$ e di $IM < 13$, valori di ZPP elevati ($> 50 \mu\text{g/dl}$) sembrano indicare la forte probabilità della coesistenza di un trait β -talassemico e di una carenza di ferro (39, 52).

Tre di questi lavoratori E con anemia microcitica presentano bassi valori di PbB e di ZPP e pertanto è verosimile che essi siano effettivamente portatori di β -Talassemia minor. Il quarto lavoratore oltre alla microcitemia, di tipo probabilmente β -talassemico, presenta $PbB = 66 \mu\text{g/dl}$ e $ZPP = 108 \mu\text{g/dl}$, valori che indicano il fondato sospetto di una concausa saturnina nel determinismo dell'anemia. La anemia microcitica riscontrata in questo soggetto è infatti difficilmente attribuibile esclusivamente alla contaminazione professionale da piombo, pur in presenza di una PbB decisamente superiore a $50 \mu\text{g/dl}$ ($66 \mu\text{g/dl}$), in quanto il relativo valore di ZPP ($108 \mu\text{g/dl}$) è sì alterato, ma comunque è nettamente inferiore a $150 \mu\text{g/dl}$. Infatti, in presenza di microcitemia, solo valori di $ZPP > 150 \mu\text{g/dl}$ sono risultati capaci di individuare anemia saturnina (sensibilità=97%, specificità=94%) (27). A conferma di questo ragionamento, sul sangue di questi quattro lavoratori è stata determinata l'Emoglobina A2, risultata in tutti elevata ($> 3,6\%$), e l'Emoglobina F, risultata aumentata ($> 2\%$) in tre di essi. Questi ultimi risultati hanno permesso di confermare la presenza di β -Talassemia minor, che è pura in tre dei quattro lavoratori portatori di anemia microcitica e coesiste con una anemia saturnina in uno di essi.

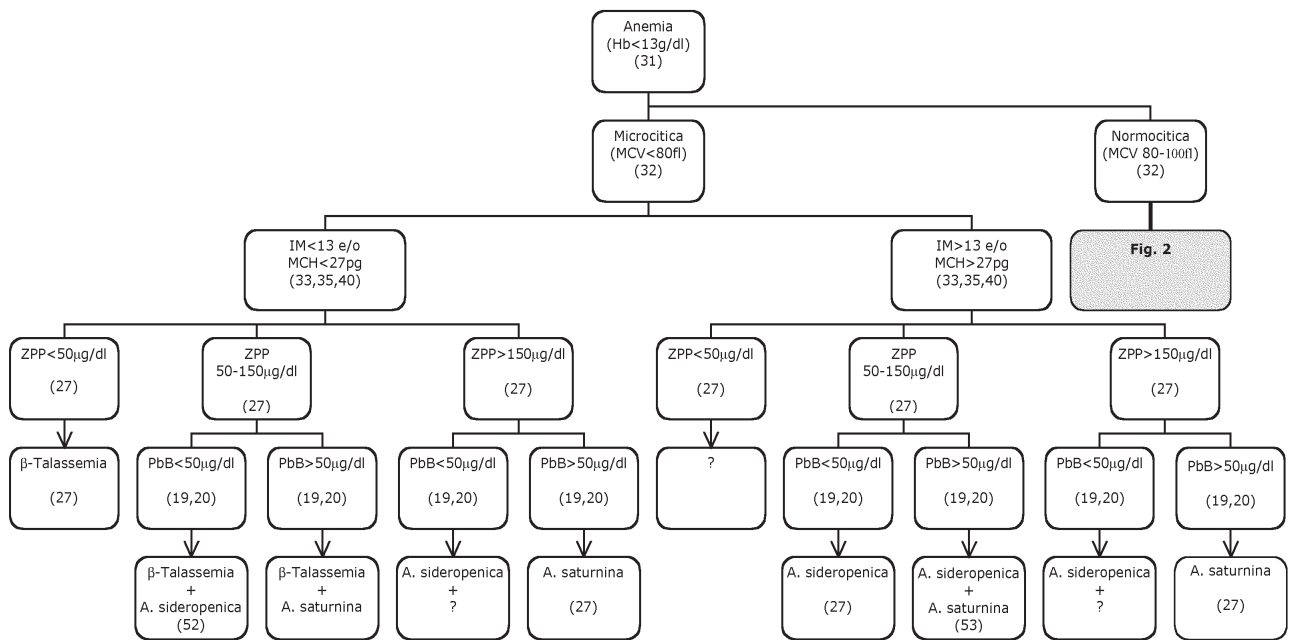
Due lavoratori esposti sono risultati portatori di anemia normocitica ($80 < MCV < 100$ fl) e normocromica ($MCH > 27,0$ pg). È stato proposto che, in caso anemia normocitica, una forma saturnina può essere sospettata in presenza di $ZPP > 50 \mu\text{g/dl}$ (27). I due lavoratori sopraindicati hanno presentato valori estremamente differenti sia di ZPP

(630 µg/dl e 4 µg/dl rispettivamente) che di PbB (120 µg/dl e 11,8 µg/dl rispettivamente). Il lavoratore con livelli molto elevati sia di PbB che di ZPP è certamente portatore di una anemia saturnina che, in questo caso, si presenta in forma normocitica e normocromica. L'altro soggetto che presenta bassi valori sia di PbB che di ZPP è invece portatore di un'anemia certamente non saturnina e, ovviamente, non talassemica, la cui etiologia dovrà essere definita in un servizio di Ematologia.

In considerazione dei dati di Letteratura disponibili e da noi impiegati in questo studio, nel tentativo di un primo inquadramento etiologico dei casi di anemia riscontrati sui lavoratori esposti a piombo esaminati, abbiamo elaborato un algoritmo, che esponiamo nelle figure 1 e 2. L'algorit-

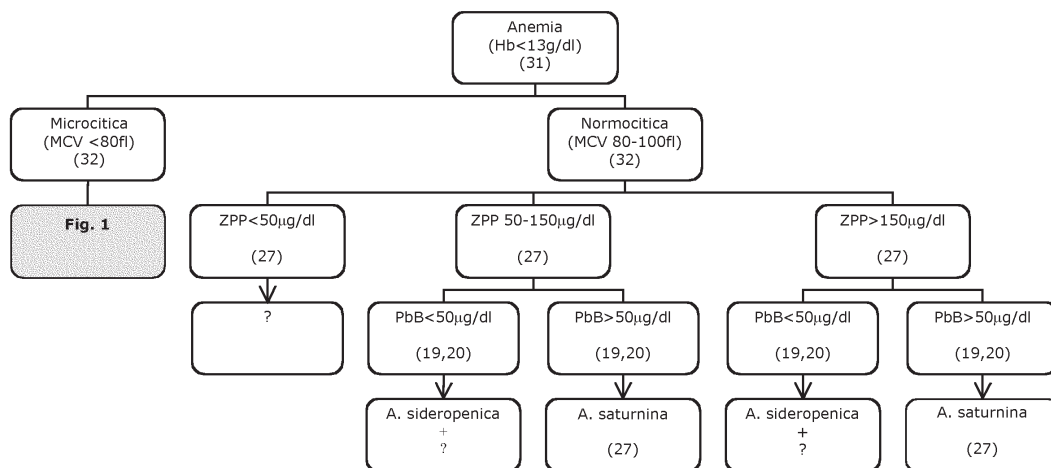
mo, utilizzando pochi parametri dell'esame emocromocitometrico e del monitoraggio biologico del piombo, si propone di indicare le principali possibili diagnosi differenziali di primo livello fra anemia saturnina, trait β-talassemico, anemia sideropenica e altre forme di anemia microcitiche e normocitiche, queste ultime non meglio definibili per mancanza di elementi diagnostici. L'algoritmo è stato concepito solo per le forme di anemie microcitiche e normocitiche, individuate in questo studio. In base al valore del MCV sono state differenziate le anemie microcitiche da quelle normocitiche (32).

Le forme microcitiche sono state ulteriormente suddivise in forme con IM<13 e/o MCH <27 pg e in forme con IM≥13 e/o MCH≥27 pg (33, 35, 40). Le prime sono con



Hb = emoglobina; MCV = volume corpuscolare medio; IM = indice di Mentzer; MCH = emoglobina corpuscolare media; ZPP = zinco protoporfirina; PbB = piombemia.

Figura 1. Algoritmo per una prima valutazione etiologica delle anemie microcitiche in lavoratori esposti a piombo (in parentesi sono riportati i riferimenti bibliografici)



Hb = emoglobina; MCV = volume corpuscolare medio; ZPP = zinco protoporfirina; PbB = piombemia.

Figura 2. Algoritmo per per una prima valutazione etiologica delle anemie normocitiche in lavoratori esposti a piombo (in parentesi sono riportati i riferimenti bibliografici)

elevata probabilità dei trait β -talassemici, puri o, come vedremo, coesistenti con altre cause di anemia (33, 35, 40, 41). Lo studio della letteratura sopracitata, ha permesso di individuare tre intervalli di concentrazioni ematiche di ZPP in $\mu\text{g}/\text{dl}$ (<50 , $50-150$, >150 rispettivamente) (27) e due intervalli di concentrazioni ematiche di PbB in $\mu\text{g}/\text{dl}$ (<50 , ≥ 50 rispettivamente) (19,20), indicative di differenti possibilità diagnostiche. Sempre in riferimento a forme di anemia microcitica con $\text{IM}<13$ e/o $\text{MCH}<27\text{pg}$, il riscontro di livelli ematici di ZPP <50 $\mu\text{g}/\text{dl}$ indica una forte probabilità di trait β -talassemico e fa escludere tutte le forme di anemia che prevedono l'inibizione dell'enzima ferrochelatasi e il conseguente aumento delle ZPP (in particolare anemie saturnine e sideropeniche) (47). Non appare rilevante considerare i livelli di PbB dal momento che, per concentrazioni ematiche di ZPP <50 $\mu\text{g}/\text{dl}$, si può ragionevolmente escludere una impregnazione saturnina, anche in lavoratori esposti. Nelle anemie microcitiche con $\text{IM}<13$ e/o $\text{MCH}<27$ pg e livelli di ZPP tra 50 e 150 $\mu\text{g}/\text{dl}$ è invece necessario considerare le PbB rispettivamente <50 $\mu\text{g}/\text{dl}$ e ≥ 50 $\mu\text{g}/\text{dl}$. Infatti se PbB <50 $\mu\text{g}/\text{dl}$, l'aumento relativamente contenuto della ZPP è verosimilmente dovuto alla presenza di un deficit marziale, che coesiste con la β -talassemia minor (52). Se PbB ≥ 50 $\mu\text{g}/\text{dl}$, proposto LOEL del piombo verso l'anemia (19, 20), è ragionevole dedurre, oltre a un trait β -talassemico, la compresenza di anemia saturnina. Il riscontro di livelli ematici di ZPP ≥ 150 $\mu\text{g}/\text{dl}$, in presenza di PbB <50 $\mu\text{g}/\text{dl}$, indica un'elevata probabilità di un deficit marziale, o di altre sopraccitate condizioni patologiche capaci di determinare l'aumento della ZPP stessa (47), eventualmente in coesistenza con una β -talassemia minor. In caso di ZPP ≥ 150 $\mu\text{g}/\text{dl}$ con PbB ≥ 50 $\mu\text{g}/\text{dl}$ la diagnosi di anemia saturnina, eventualmente associata a un trait β -talassemico, è praticamente certa.

Nelle anemie microcitiche che presentano $\text{IM}\geq 13$ e/o $\text{MCH}\geq 27$ pg si può escludere con elevata probabilità la presenza di trait β -talassemici. I casi in cui si rilevano livelli ematici di ZPP <50 $\mu\text{g}/\text{dl}$ non sono riconducibili, per le ragioni sopraindicate, a un effetto del piombo sul metabolismo dell'eme e pertanto i soggetti devono essere inviati presso un centro di Ematologia per gli ulteriori accertamenti diagnostici. Se invece si riscontrano livelli ematici di ZPP compresi fra 50 e 150 $\mu\text{g}/\text{dl}$, una PbB <50 $\mu\text{g}/\text{dl}$ indica la forte probabilità di un'anemia sideropenica (27), mentre una PbB >50 $\mu\text{g}/\text{dl}$ è fortemente suggestiva per un'anemia saturnina, eventualmente associata a una carenza marziale (53). Infine, nel caso si evidenzi una ZPP >150 $\mu\text{g}/\text{dl}$, una PbB <50 $\mu\text{g}/\text{dl}$ può orientare verso una anemia da carenza di ferro, eventualmente in coesistenza con altre situazioni patologiche, che andranno comunque valutate in un servizio di Ematologia. Sempre in presenza di una ZPP >150 $\mu\text{g}/\text{dl}$, una PbB >50 $\mu\text{g}/\text{dl}$ è fortemente suggestiva per un'anemia saturnina, associata o meno a una carenza di ferro.

Le forme di anemia normocitica che presentano una ZPP <50 $\mu\text{g}/\text{dl}$ non sono di origine saturnina e non possono evidentemente essere ricondotte a forme di β -Talassemia minor o di anemia sideropenica. Pertanto esse dovranno essere ulteriormente studiate in un centro ematologico.

Le anemia normocitiche con livelli di ZPP compresi tra 50 e 150 $\mu\text{g}/\text{dl}$ e che presentano PbB <50 $\mu\text{g}/\text{dl}$ possono riconoscere un'origine ferrocarenziale e/o altre cause che andranno indagate in un servizio di ematologia, invece quelle che presentano PbB >50 $\mu\text{g}/\text{dl}$ sono verosimilmente di origine saturnina. I casi che presentano livelli ematici di ZPP >150 $\mu\text{g}/\text{dl}$ con PbB <50 $\mu\text{g}/\text{dl}$ sono di probabile origine sideropenica e/o di altra origine e dovranno essere studiate in ambiente ematologico. Infine le forme di anemia normocitica che presentano ZPP >150 $\mu\text{g}/\text{dl}$ e PbB >50 $\mu\text{g}/\text{dl}$ sono verosimilmente dovute a impregnazione da piombo (27).

In conclusione, sui lavoratori esposti a concentrazioni medio-basse di piombo, esaminati in questo studio, sono stati riscontrati sei casi di anemia. Dall'esame dei normali parametri ematochimici disponibili di routine (esame emocromocitometrico, livelli ematici di PbB e di ZPP, secondariamente integrati dallo studio dello stato marziale), si possono definire due casi di anemia saturnina. Uno di questi è un'anemia francamente saturnina, normocromica e normocitica, l'altra è un'anemia di origine verosimilmente mista, in cui coesistono le caratteristiche del trait β -talassemico e dell'anemia da piombo. Per questi due lavoratori il medico del lavoro competente deve espletare gli adempimenti previsti dalla Legge per le malattie professionali e deve esprimere un giudizio di non idoneità temporanea di almeno sei mesi alla mansione specifica che comporta l'esposizione al piombo. Durante i sei mesi di allontanamento dal rischio piombo i lavoratori saranno affidati a specialisti in Medicina del Lavoro e in Ematologia, che dovranno valutare l'opportunità di una terapia chelante, da praticare eventualmente in ambiente ospedaliero. Tale trattamento appare particolarmente indicato nel caso del lavoratore portatore di PbB=120 $\mu\text{g}/\text{dl}$ e ZPP=630 $\mu\text{g}/\text{dl}$. Inoltre il medico del lavoro competente deve informare degli elevati valori di piombemia riscontrati sia i lavoratori direttamente interessati che il datore di lavoro. Di conseguenza, quest'ultimo dovrà eseguire un'accurata valutazione delle concentrazioni ambientali del piombo metallico nelle diverse aree del ciclo tecnologico, al fine di identificare i punti in cui si verifica la maggior dispersione ambientale del metallo (54). Questo permetterà di realizzare degli interventi mirati di prevenzione primaria sugli impianti produttivi, di sviluppare più accurate procedure per la manipolazione e il trattamento di materie prime, prodotti intermedi e finiti contenenti piombo e per la pulizia dello stabilimento, nonché di migliorare l'organizzazione del lavoro. È opportuno che tutti questi interventi siano poi seguiti da una nuova indagine ambientale, che verifichi oggettivamente se essi sono stati realmente efficaci nel determinare la riduzione della concentrazione ambientale del metallo.

La valutazione ragionata, basata su dati di letteratura, dei risultati disponibili di routine ha permesso di ipotizzare, con elevata probabilità, che gli altri quattro lavoratori siano portatori di forme di anemia non saturnina: tre di essi sono verosimilmente portatori di trait β -Talassemico e vanno indirizzati in un centro specialistico per gli ulteriori approfondimenti diagnostici. Il quarto lavoratore anemico è portatore di una forma normocromica e normocitica e va

anch'esso avviato presso un centro ematologico per una diagnosi etiologica.

L'attuale riscontro di due casi di anemia saturnina in un paese come l'Italia ribadisce la necessità di continuare a insistere sulla prevenzione primaria e sul monitoraggio ambientale delle aziende che utilizzano il piombo. È inoltre confermata la necessità di proseguire il monitoraggio biologico e la sorveglianza sanitaria anche degli effetti del metallo sul metabolismo dell'eme dei lavoratori esposti, perché esiste ancora la reale probabilità di trovare cluster di soggetti esposti a dosi di piombo tali da determinare quadri di anemia franca. Tutti i lavoratori esposti al metallo, in particolare quelli portatori di anemia di qualunque origine, devono essere adeguatamente informati, da parte del medico del lavoro competente, sugli effetti del piombo sul metabolismo dell'eme (ovvero sull'eritropoiesi) e sull'importanza di rispettare le misure di igiene e di sicurezza sul lavoro e di utilizzare correttamente i dispositivi di protezione individuale.

Infine l'algoritmo proposto e derivato dai dati di letteratura è sembrato capace di discriminare con sufficiente evidenza i casi di anemia di origine saturnina da quelli da altra causa, riscontrati sui lavoratori esaminati in questo studio. Data la possibile rilevanza di questo algoritmo nella pratica della sorveglianza sanitaria e del monitoraggio biologico dei lavoratori esposti a piombo, si ritiene opportuno testarlo ulteriormente su casistiche più numerose.

Bibliografia

- 1) Cullen MR, Robins JM, Eskenazi B. Adult inorganic lead intoxication: a presentation of 31 new cases and a review of the recent advance in the literature. *Medicine (Baltimore)* 1983; 62: 221-24.
- 2) Levin SM, Goldberg M. Clinical evaluation and management of lead-exposed construction workers. *Am J Ind Med* 2000; 37: 23-43
- 3) Goldberg, A. Lead poisoning and haem biosynthesis. *Br J Haematol* 1972; 23: 521-52.
- 4) Sakai T. Biomarkers of lead exposure. *Ind Health* 2000 Apr; 38(2): 127-42.
- 5) Terayama K. Effects of lead on electrophoretic mobility, membrane sialic acid, deformability and survival of rat erythrocytes. *Ind Health* 1993, 31: 113-126.
- 6) Sugawara E, Nakamura K, Miyake T, Fukumura A, Seki Y. Lipid peroxidation and concentration of glutathione in erythrocytes from workers exposed to lead. *Br J Ind Med* 1991 Apr; 48(4): 239-42.
- 7) Hasan J, Vinko V, Henberg S. Deficient red cell membrane Na⁺/K⁺ ATPase in lead poisoning. *Arch Environ Health* 1976, 14: 313-324.
- 8) Paglia DE, Valentine WN, Dahlgren JG. Effects of low-level lead exposure on pyrimidine 5'-nucleotidase and other erythrocyte enzymes. Possible role of pyrimidine 5'-nucleotidase in the pathogenesis of lead-induced anemia. *J Clin Invest.* 1975 Nov; 56(5): 1164-9.
- 9) Kim Y, Lee H, Lee CR, Park DU, Yang JS, Park IJ, Lee KY, Lee M, Kim TK, Sohn NS, Cho YS, Lee N, Chung HK. Evaluation of lead exposure in workers at secondary lead smelters in South Korea: with focus on activity of erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase (P5N). *Sci Total Environ.* 2002 Mar 8; 286(1-3): 181-9.
- 10) Osterode W, Barnas U, Geissler K. Dose dependent reduction of erythroid progenitor cells and inappropriate erythropoietin response in exposure to lead: new aspects of anaemia induced by lead. *Occup Environ Med.* 1999 Feb; 56(2): 106-9.
- 11) Waldron HA. The anaemia of lead poisoning: a review. *Br J Ind Med.* 1966 Apr; 23(2): 83-100.
- 12) Bashir R, Khan DA, Saleem M, Zaman KU, Malik IA. Blood lead levels and anemia in lead exposed workers. *J Pak Med Assoc.* 1995 Mar; 45(3): 64-6.
- 13) Popp W, Werfel U, Peters T, Kramer R, Bruch J. [Occupational lead poisoning due to deficient protective measures at the work place] *Dtsch Med Wochenschr.* 2001 Oct 26; 126(43): 1201-4.
- 14) Cohen GJ, Ahrens WE. Chronic lead poisoning: a review of seven years' experience at the Children's Hospital, District of Columbia. *J Pediatr.* 1959 Mar; 54(3): 271-84.
- 15) Bhamhani K, Aronow R. Lead poisoning and thalassemia trait or iron deficiency. The value of the red blood cell distribution width. *Am J Dis Child.* 1990 Nov; 144(11): 1231-3.
- 16) Dunbabin DW, Tallis GA, Popplewell PY, Lee RA. Lead poisoning from Indian herbal medicine (Ayurveda) *Med J Aust.* 1992 Dec 7-21; 157(11-12): 835-6.
- 17) Auyeung TW, Chang KK, To CH, Mak A, Szeto ML. Three patients with lead poisoning following use of a Chinese herbal pill. *Hong Kong Med J.* 2002 Feb; 8(1): 60-2.
- 18) Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Lead poisoning associated with ayurvedic medications-five states, 2000-2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2004 Jul 9; 53(26): 582-4.
- 19) Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1999. Toxicological profile for lead. Atlanta: US Department of Health and Human Services.
- 20) EPA. 1986a. Air quality criteria for lead. Research Triangle Park, NC: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office. EPA 600/8-83-028F.
- 21) Apostoli P. [Trends in lead exposure in the work place and the environment]. *Ann Ist Super Sanita.* 1998; 34(1): 121-9.
- 22) Tandon SK, Chatterjee M, Bhargava A, Shukla V, Bihari V. Lead poisoning in Indian silver refiners. *Sci Total Environ.* 2001 Dec 17; 281(1-3): 177-82.
- 23) Suwansakri J, Teerasart N, Wiwanitkit V, Chaipayet T. High blood lead level among garage workers in Bangkok, public concern is necessary. *Biometals.* 2002 Dec; 15(4): 367-70.
- 24) Ankrah NA, Kamiya Y, Appiah-Oppong R, Akyeampon YA, Addae MM. Lead levels and related biochemical findings occurring in Ghanaian subjects occupationally exposed to lead. *East Afr Med J.* 1996 Jun; 73(6): 375-9.
- 25) Angastiniotis M, Modell B. Global epidemiology of hemoglobin disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1998 Jun 30; 850: 251-69.
- 26) Olivieri NF. The beta-thalassemias. *N Engl J Med.* 1999 Jul 8; 341(2): 99-109.
- 27) Hershko C, Konijn AM, Link G, Moreb J, Grauer F, Weissenberg E. Combined use of zinc protoporphyrin (ZPP), mean corpuscular volume and haemoglobin measurement for classifying microcytic RBC disorders in children and young adults. *Clin Lab Haematol.* 1985; 7(3): 259-69.
- 28) Kwong WT, Friello P, Semba RD. Interactions between iron deficiency and lead poisoning: epidemiology and pathogenesis. *Sci Total Environ.* 2004 Sep 1; 330(1-3): 21-37.
- 29) Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* 1997 Jul 31; 388(6641): 482-8.
- 30) Bannon DI, Abounader R, Lees PS, Bressler JP. Effect of DMT1 knockdown on iron, cadmium, and lead uptake in Caco-2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003 Jan; 284(1): C44-50.
- 31) World Health Organization. Nutritional anemias: report of a WHO scientific group. Technical Report Series no. 405, Geneva: World Health Organization, 1968.
- 32) Tefferi A. Anemia in adults: a contemporary approach to diagnosis. *Mayo Clin Proc.* 2003 Oct; 78(10): 1274-80.
- 33) British Committee for Standards in Haematology (BCSH). Guideline. The laboratory diagnosis of haemoglobinopathies. *Br J Haematol* 1998; 101: 783-792
- 34) Mentzer WC Jr. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait. *Lancet.* 1973 Apr 21; 1(7808): 882.
- 35) Sirdah M, Bilot YY, el Jabour S, Najjar K. Screening secondary school students in the Gaza strip for beta-thalassaemia trait. *Clin Lab Haematol.* 1998 Oct; 20(5): 279-83.
- 36) Lafferty JD, Crowther MA, Ali MA, Levine M. The evaluation of various mathematical RBC indices and their efficacy in discriminating between thalassaemic and non-thalassaemic microcytosis. *Am J Clin Pathol.* 1996 Aug; 106(2): 201-5.

- 37) Apostoli P, Baj A, Bavazzano P, Ganzi A, Neri G, Ronchi A, Soleo L, Di Lorenzo L, Spinelli P, Valente T, Minoia C. Blood lead reference values: the results of an Italian polycentric study. *Sci Total Environ.* 2002 Mar 15; 287(1-2): 1-11.
- 38) Nie N.H. et al. (1981) Statistical package for the social sciences (SPSS). 2nd edn. New York, Mc Graw-Hill.
- 39) Harthoorn-Lasthuizen EJ, Lindemans J, Langenhuijsen MM. Combined use of erythrocyte zinc protoporphyrin and mean corpuscular volume in differentiation of thalassemia from iron deficiency anemia. *Eur J Haematol.* 1998 Apr; 60(4): 245-51.
- 40) Afroz M, Shamsi TS, Syed S. Predictive value of MCV/RBC count ratio to discriminate between iron deficiency anaemia and beta thalassaemia trait. *J Pak Med Assoc.* 1998 Jan; 48(1): 18-9.
- 41) Madan N, Sikka M, Sharma S, Rusia U, Kela K. Red cell indices and discriminant functions in the detection of beta-thalassaemia trait in a population with high prevalence of iron deficiency anaemia. *Indian J Pathol Microbiol.* 1999 Jan; 42(1): 55-61.
- 42) Langer EE, Haining RG, Labbe RF, Jacobs P, Crosby EF, Finch CA: Erythrocyte protoporphyrin. *Blood* 1972; 40: 112.
- 43) Anderson KE, Sassa S, Peterson CM, Kappas A. Increased erythrocyte uroporphyrinogen-I-synthetase, delta-aminolevulinic acid dehydratase and protoporphyrin in hemolytic anemias. *Am J Med.* 1977 Sep; 63(3): 359-64.
- 44) Bottomley SS. Porphyrin and iron metabolism in sideroblastic anemia. *Semin Hematol.* 1977 Apr; 14(2): 169-85.
- 45) van Steveninck J, Dubbelman TM, de Goeij AF, Went LN. Binding of Protoporphyrin to hemoglobin in red blood cells of patients with erythropoietic protoporphyria. *Hemoglobin.* 1977; 1(7): 679-90.
- 46) Krammer A, Cartwright GE, Wintrobe MM. The anemia of infection. XIX. Studies on free erythrocyte coproporphyrin and protoporphyrin. *Blood.* 1954 Feb; 9(2): 183-8.
- 47) Hastka J, Lasserre JJ, Schwarzbeck A, Strauch M, Hehlmann R. Zinc protoporphyrin in anemia of chronic disorders. *Blood.* 1993 Mar 1; 81(5): 1200-4.
- 48) Tillyer ML, Tillyer CR. Zinc protoporphyrin assays in patients with alpha and beta thalassaemia trait. *J Clin Pathol.* 1994 Mar; 47(3): 205-8.
- 49) Graham EA, Felgenhauer J, Detter JC, Labbe RF. Elevated zinc protoporphyrin associated with thalassemia trait and hemoglobin E. *J Pediatr.* 1996 Jul; 129(1): 105-10.
- 50) Apostoli P, Maranelli G. The erythrocyte zinc protoporphyrin test in the biological monitoring of working populations exposed to metallic lead. *Med Lav.* 1986 Sep-Oct; 77(5): 529-37.
- 51) Froom P, Kristal-Boneh E, Benbassat J, Ashkanazi R, Ribak J. Predictive value of determinations of zinc protoporphyrin for increased blood lead concentrations. *Clin Chem.* 1998 Jun; 44(6 Pt 1): 1283-8
- 52) Harthoorn-Lasthuizen EJ, Lindemans J, Langenhuijsen MM. Influence of iron deficiency anaemia on haemoglobin A2 levels: possible consequences for beta-thalassaemia screening. *Scand J Clin Lab Invest.* 1999 Feb; 59(1): 65-70.
- 53) Ahn H-C, Hwang K-Y, Kim Y-B, Lee G-S, Lee S-S, Ahn K-D, Lee B-K. Different effects of serum iron status on the relationship between blood lead and zinc protoporphyrin in lead workers in Korea. *J Occup Health* 1999; 41: 166-171.
- 54) D.Lgs. 2 febbraio 2002 n. 25. G.U. del 8 marzo 2002, n. 57, S.O. n. 40/L, art. 72-decies.

Richiesta estratti: *Luigi Di Lorenzo - Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Pubblica - Sezione di Medicina del Lavoro - Università di Bari - Policlinico - 70124 Bari, Italy - e-mail: l.dilorenzo@medlav.uniba.it*