

Monitoraggio di laboratorio dell'esposizione professionale al piombo: utilizzo di indicatori biologici e d'effetto

R. Massacane, G. Nervi, M.L. Goggi, L. Camogliano

Laboratorio Analisi A.S.L. 22 - P.O. Novi Ligure (AL)

Premessa. La tossicità del piombo ed il suo diffuso impiego nell'industria e in svariate attività professionali richiedono il monitoraggio dei lavoratori a rischio, ad oggi regolamentato dal D.Lgs 277/91. In questo studio abbiamo valutato la corrispondenza tra l'esposizione e l'andamento dei diversi indicatori menzionati nel decreto.

Metodi. Abbiamo monitorato in 112 dipendenti di una fonderia (63 fonditori e 49 non fonditori), in due anni successivi (1999, 2000), l'andamento degli indicatori biologici (piombemia e piomburia) e d'effetto (zincoprotoporfirina) in relazione alla mansione svolta. Per la loro determinazione sono stati impiegati uno spettrofotometro ad assorbimento atomico con fornello di grafito ed un ematofluorimetro.

Risultati. Fonditori e non fonditori sono esposti a diverse quantità di metallo. Si è osservata una soddisfacente corrispondenza tra la mansione svolta e gli indicatori biologici che presentano una buona correlazione reciproca.

L'andamento della zincoprotoporfirina appare più complesso e non direttamente correlabile all'esposizione al piombo.

Conclusioni. Sulla base del D.Lgs 277/91 per il monitoraggio e la diagnosi d'intossicazione da Pb si suggerisce la determinazione di un solo indicatore biologico (preferibilmente la piombemia) unitamente ad un indicatore d'effetto. Tra questi ultimi la zincoprotoporfirina appare però influenzata dal turnover del ferro e quindi non è correlabile all'entità dell'esposizione.

Introduzione

La patologia da piombo è conosciuta sin dai tempi antichi, quando Ippocrate (460-355 a.C.) e Paolo di Egina (629-690 a.C.) fornivano accurate descrizioni della sintomatologia della colica saturnina. Oggigiorno l'intossicazione cronica da piombo è di natura prevalentemente professionale (1) e prende il nome di "saturnismo" che si può manifestare come anemia, colica intestinale, ipertensione arteriosa (2), ritardo dei riflessi, danni ai reni (3,4) ed al sistema nervoso e, in casi molto gravi, può causare danni irreversibili al cervello fino a condurre al coma (5-7).

Il piombo ha una diffusione ubiquitaria nell'ambiente: si trova nell'aria per inquinamento ambientale, nell'acqua attraverso penetrazione nelle falde acquifere o per cessione dalle tubature, negli alimenti (vino e latte) ed in fonti alternative (polveri domestiche, di strada o dei rivestimenti).

Generalmente le quantità di Pb assorbite dalle persone non professionalmente esposte sono basse (8,9) mentre esistono numerose occupazioni in cui il rischio d'intossicazione è elevato (10,11). Infatti questo metallo è diffusamente impiegato nell'industria, nelle fonderie, nella fabbricazione di accumulatori, nella lavorazione del peltro, nella preparazione di oggetti in polivinile (come stearato di Pb), ne-

gli smalti per ceramiche e piastrelle e nella produzione di proiettili e munizioni per la caccia. Nelle tipografie e nelle fabbriche di vernici, dove un tempo esisteva un rischio elevato, questo metallo è stato sostituito con l'impiego di materiali meno tossici.

Il Pb può essere presente sia come catione inorganico sia unito ad atomi di carbonio in composti organometallici e in questo secondo caso la sua tossicità aumenta. La tossicità dei composti organometallici è massima quando una valenza del Pb è occupata da un anione e le altre dal carbonio. Se tutte le valenze sono alchilate (piombo tetraetile) la tossicità può essere bassa o nulla, ma aumenta durante il metabolismo dell'organismo che trasforma questi composti in molecole trialchilate estremamente tossiche. (12)

Il piombo può essere introdotto per via inalatoria sotto forma di polveri e fumo, per via orale con l'ingestione di sostanze contaminate, per via cutanea tramite contatto con benzine o solventi contenenti Pb. Nell'assunzione per os circa il 20% del Pb viene assorbito mentre la parte rimanente viene escreta attraverso le feci. Il 90% del metallo, una volta penetrato nei globuli rossi, circola con essi, il restante 10% resta nel plasma legato alle proteine. Il Pb così assorbito si deposita nel fegato, nel rene, nel polmone e nei muscoli, sedi dalle quali può venire eliminato, mentre nel tessuto osseo permane più stabilmente.

Il D.Lgs. 277/91 stabilisce i valori limite a cui possono essere esposti gli addetti agli impianti di produzione nei quali sia utilizzato il metallo. I marcatori d'esposizione indicati nell'art. 15 di detto decreto per il controllo periodico dell'esposizione professionale al piombo sono:

PbB (piombemia) = indicatore biologico della quantità di Pb presente nel sangue.

PbU (piomburia) = indicatore biologico della quantità di Pb presente nelle urine.

ZPP (zincoprotoporfirina) = indicatore di effetto.

ALA-U (acido d-amminolevulinico urinario) = indicatore di effetto.

L'articolo 16 del decreto definisce la periodicità delle visite e gli indicatori da determinare.

Gli indicatori biologici misurano direttamente la presenza del piombo nell'organismo mentre quelli d'effetto rilevano le alterazioni in processi metabolici indotte dal metallo (13).

L'utilità degli indicatori d'effetto deriva dal fatto che il piombo inibisce a diversi livelli il processo di sintesi dell'eme, causando l'accumulo di alcuni composti e la loro eventuale eliminazione urinaria nella intossicazione saturnina. In particolare l'inibizione dell'enzima d-aladeidasi (14) determina una aumentata eliminazione di acido d-amminolevulinico urinario. Inoltre il piombo danneggia l'attività dell'enzima coproporfirinogeno ossidasi e soprattutto inibisce la ferrochelatasi o emesintetasi ostacolando l'introduzione del Fe⁺⁺ nella protoporfirina IX con l'incorporazione di un atomo di Zn e la formazione di zincoprotoporfirina. Nell'intossicazione da piombo si rileva quindi una maggiore produzione di protoporfirina libera eritrocitaria e di ZPP (15,16).

Scopo del lavoro

Lo scopo del lavoro è stato di seguire l'andamento di due indicatori biologici (PbB e PbU) e di un indicatore di effetto (ZPP) in dipendenti di una fonderia nell'arco di due anni e di confrontare i risultati ottenuti con la mansione svolta dai lavoratori a rischio. Inoltre si è valutato, correlando gli indicatori biologici fra loro e con l'indicatore d'effetto, quali tra questi parametri sia più efficace nella diagnostica di laboratorio.

Materiali e Metodi

In un campione di 112 dipendenti di una fonderia [63 fonditori (F) e 49 non fonditori (NF)] sono stati determinati i valori di PbB PbU ZPP in due anni successivi, in soggetti con un'esposizione continuativa al metallo di almeno quattro settimane.

I campioni biologici sono stati raccolti al mattino in pazienti a digiuno mediante prelievo di sangue in provetta da 2,5 mL contenente EDTA e di urine in provetta da 10 mL.

La determinazione della piombemia si esegue utilizzando uno spettrofotometro ad assorbimento atomico (Perkin Elmer AAnalyst 100) con fornello di graffite immerso in atmosfera inerte di argon. Il campionamento è automatico utilizzando 20 mL di campione diluito.

La determinazione della PbB si esegue utilizzando come standard una soluzione alla concentrazione di 80 mg/dl di Pb in sangue bovino, come bianco una soluzione di tensioattivo (Triton allo 0.05%) e diluendo 1:10 il campione ematico con la stessa soluzione. I valori di piombemia sono espressi come concentrazione ematica di Pb in mg/dL.

Per la ZPP viene valutato il rapporto tra la concentrazione della zincoprotoporfirina e della emoglobina nel sangue. Questo valore viene misurato da un fluorimetro (Protofluor-Z Helena Laboratories), che valuta il rapporto tra l'intensità della radiazione emessa per fluorescenza dalla zincoprotoporfirina a 595 nm e l'intensità luminosa assorbita dall'emoglobina a 415 nm (17). I valori relativi alla ZPP sono espressi come rapporto mmol (ZPP) / mol (EME).

La valutazione della piomburia si esegue con la stessa strumentazione impiegata per la piombemia, utilizzando come standard una soluzione di Pb alla concentrazione di 30 mg/L, diluendo 1:10 i campioni di urine con acqua bidistillata, utilizzata anche come bianco. Le concentrazioni della piomburia sono espresse come mg/g di creatinina.

I risultati delle due categorie di lavoratori sono stati rappresentati statisticamente mediante istogrammi di frequenza. I valori di PbB sono stati espressi, calcolando l'intervallo di confidenza al 95%, come media \pm 1.96 errore standard ($M \pm 1.96 ES$). Le medie delle due categorie sono state confrontate con il test t di Student per campioni indipendenti. I valori di PbB e PbU sono stati correlati mediante interpolazione lineare con il sistema dei minimi quadrati calcolando il coefficiente r di Pearson, analogamente sono stati elaborati i dati relativi a PbB e ZPP.

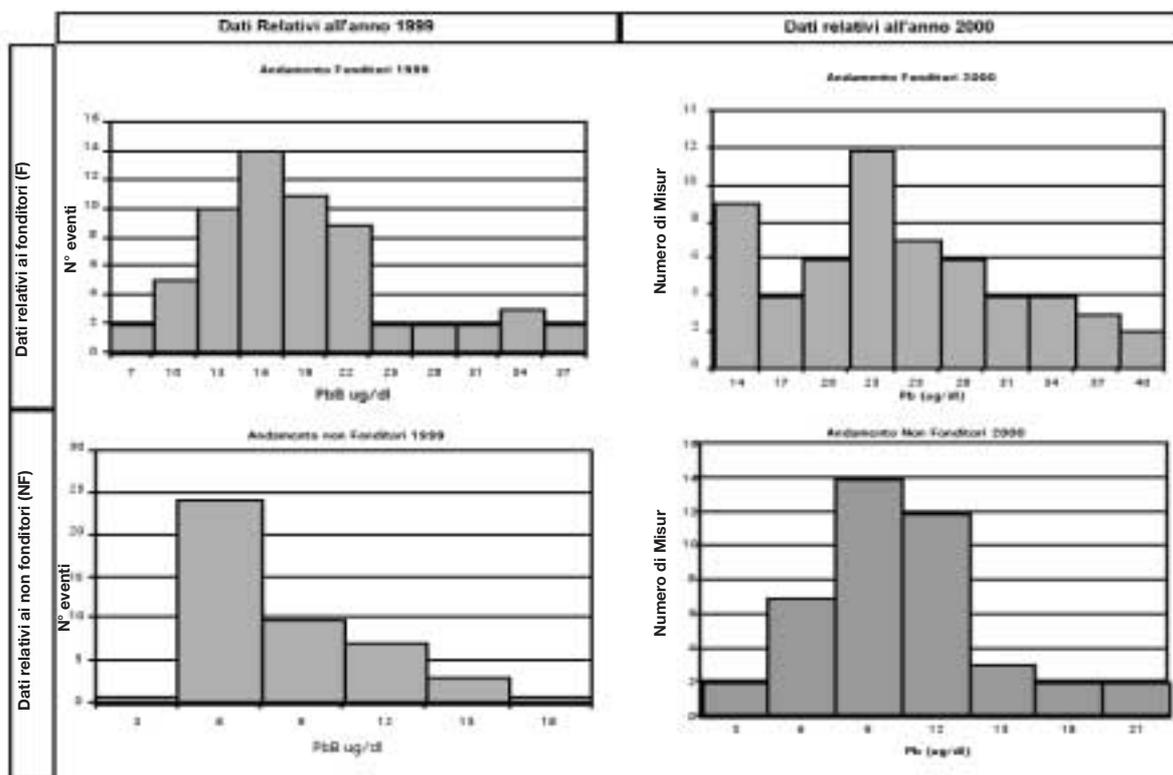
Risultati

I risultati sono stati divisi in due categorie a seconda della mansione svolta dal lavoratore, la prima comprendente non fonditori (NF), come manutentori ed elettricisti, presumibilmente esposti ad una moderata quantità di Pb, la seconda rappresentata dai fonditori (F) esposti a maggiori concentrazioni ambientali del metallo.

I valori delle due categorie sono stati rappresentati graficamente mediante istogrammi di frequenza (Figura 1) che riportano i valori centrali di ogni classe e le relative frequenze.

Confrontando gli istogrammi delle due annate successive si nota che il valore di PbB nella categoria (F), avente la massima frequenza, risulta maggiore rispetto a quella dei (NF), in concordanza con le

Figura 1. Istogrammi di Frequenza Relativi alla Piombemia nei Fonditori (F) e non Fonditori (NF) nelle due annate.



aspettative di rischio collegate alla mansione. Sono quindi stati calcolati gli intervalli di confidenza per le due categorie nelle annate successive.

Tabella I. Intervalli di confidenza ($M \pm 1.96 ES$) del PbB per le categorie (F) e (NF) ed i valori osservati (V.O) più frequenti (n) nelle due annate.

	Dati Relativi all'anno 1999		Dati relativi all'anno 2000	
	M \pm 1.96 ES	V.O / n	M \pm 1.96 ES	V.O / n
F	18.66 \pm 1.42	16 / 23 %	24.21 \pm 1.39	21 / 23%
NF	8.72 \pm 1.23	6 / 54%	10.58 \pm 1.23	9 / 33%

Successivamente per stabilire se esiste un equilibrio tra piombo assorbito ed eliminato abbiamo determinato la correlazione per l'anno 2000 tra piombemia e piomburia in soggetti esposti al metallo in maniera continuativa per almeno quattro settimane.

L'andamento della PbU in funzione della PbB ha una buona linearità, con coefficiente di correlazione r di Pearson = 0.94 (Figura 2).

Ci siamo quindi proposti di mettere in relazione un indicatore biologico con un indicatore di effetto, correlando la ZPP con la PbB.

La correlazione è stata studiata per entrambe le annate prese in considerazione ottenendo risultati analoghi tra le due.

I due grafici successivi (Figure 3 e 4) rivelano che per valori di PbB minori o eguali a 15 mg/dL i valori

Figura 2. Correlazione PbU/PbB per l'anno 2000

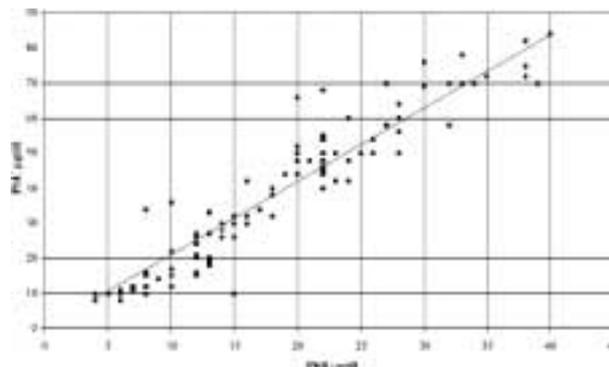


Figura 3. Correlazione ZPP/PbB per l'anno 1999.

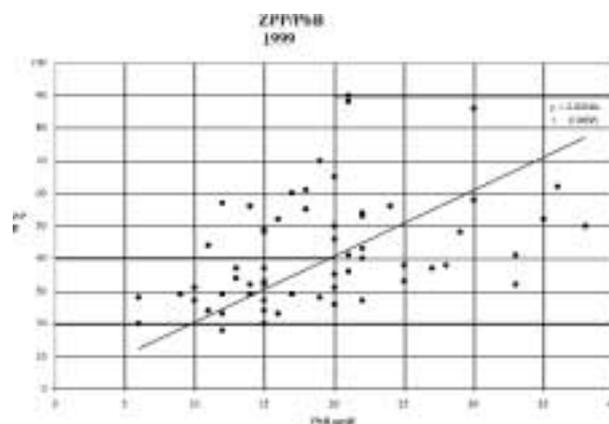
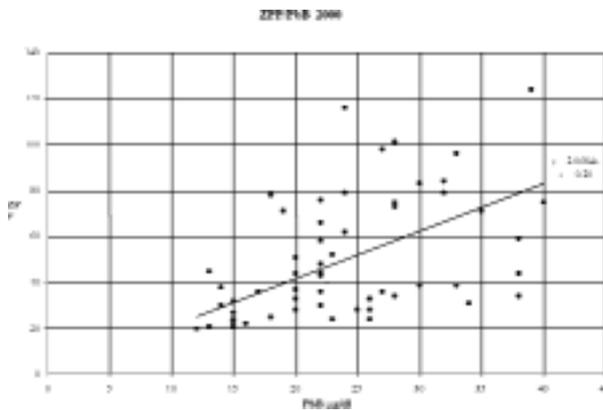


Figura 4. Correlazione ZPP/PbB per l'anno 2000.

della ZPP rimangono pressoché costanti, mentre per valori superiori la ZPP aumenta in modo casuale, senza che sia possibile determinare una ben precisa correlazione tra i due parametri, come è evidenziabile dai valori di $r < 0.20$.

Discussione

L'elevata significatività ($p < 0.001$) risultante dal confronto tra le medie delle due categorie (F e NF), in entrambe le annate, rileva come la PbB sia influenzata dall'esposizione al metallo.

I dati ottenuti hanno evidenziato una buona corrispondenza tra PbB e PbU ($r = 0.94$). L'elevato costo delle analisi eseguite mediante assorbimento atomico con fornetto di graffite e l'ottima corrispondenza fra i due parametri suggeriscono di eseguire una sola delle due indagini. Riteniamo che tra i due indicatori biologici la PbB sia più facilmente utilizzabile rispetto alla PbU che viceversa necessita o della raccolta delle urine delle 24 ore o di essere rapportata alla creatinuria.

D'altro canto non si osserva una buona correlazione tra PbB e ZPP ($r < 0.20$) soprattutto per concentrazioni di Pb ematico superiori a 15 mg/dL. Probabilmente ciò è attribuibile alla presenza di un meccanismo complesso che regola la quantità di ZPP e che coinvolge anche il metabolismo del ferro (18,20). Oltre alla riduzione dell'attività della ferrochelatasi o emesintetasi per inibizione da Pb, ci sono altre due situazioni che possono aumentare la concentrazione di ZPP, vale a dire una carenza di ferro nell'organismo (sideropenia) oppure un aumento dell'attività eritropoietica con l'instaurarsi di una carenza relativa del metallo. Quest'ultima condizione, quando decorre con ferritina e sideremia normali, può essere diagnosticata solo da un aumento della ZPP e dalla diminuzione del conteggio dei sideroblasti nel midollo (21). L'insufficiente disponibilità di ferro, in tutti questi casi, causa la sua sostituzione con un atomo di zinco che, nell'eritrocita in via di maturazione, viene incorporato nella protoporfirina IX con la sintesi di ZPP anziché dell'eme. La ZPP

costituisce quindi un indicatore funzionale molto precoce della disponibilità di ferro nella sintesi emoglobinica e il suo aumento può verificarsi anche in stati carenziali di lieve entità. Dal momento che il metabolismo del ferro è individuale, dipendendo in modo rilevante dalla costituzione, da diverse condizioni patologiche, dall'alimentazione e dalle abitudini di vita (fumo, consumo di bevande alcoliche etc.), non esiste una relazione univoca tra PbB e ZPP. L'influenza del metabolismo del ferro, di secondaria importanza nel caso di indagini per intossicazioni da Pb, rende la ZPP un indicatore d'effetto non soddisfacente per lo scopo perseguito.

Anche la determinazione dell'acido d-amminolevulinico nelle urine costituisce un indice d'effetto molto sensibile e, dopo le pubblicazioni di Haeger e Aronsen (1957-1960), è stata largamente adottata per il riconoscimento di un eccessivo accumulo di piombo nell'organismo. Secondo alcune statistiche questo metabolita aumenta molto precocemente, rimanendo elevato per più di un anno dopo che è cessata l'esposizione al metallo e risultando significativamente alterato nel 90% dei soggetti intossicati. Una futura proposta di lavoro potrebbe essere quindi, alla luce dei risultati ottenuti, quella di eseguire il monitoraggio dei lavoratori esposti a Pb determinando le concentrazioni di un indicatore biologico (PbB) insieme ad un indicatore d'effetto (come l'acido d-amminolevulinico urinario) che non subisca le interferenze descritte per la zincoprotoporfirina.

Bibliografia

1. Apostoli P. Evoluzione dell'esposizione a piombo negli ambienti di lavoro e vita. *Annali ISSN* 1998; 34: 121-9.
2. Mazzoleni A. Studio della frequenza dell'ipertensione tra i saturnini con coliche pregresse. *Med. Lav.* 1954; 45:482-6.
3. Baruffi A. Funzione glomerulare renale e indicatori biologici per il piombo in operai trafiletti con pregresso assorbimento del tossico. *Med. Lav.* 1987; 78:117-22.
4. Verschoor M.A. Lead exposure and renal function of worker. *Acta Pharmacol Toxicol* 1986; 59(Suppl 7): 80-5.
5. Apostoli P. Aggiornamenti in tema di tossicologia del piombo. *Annali ISSN* 1998; 34:5-15.
6. Borella P, Sturlani N, Rovesti S. et al, Valutazione del rischio di danno neuropsicologico per esposizione al piombo nell'infanzia. *Annali ISSN* 1998; 34: 97-104.
7. Nevin R. How lead exposure relates to temporal changes in IQ, violent crime, and unwed pregnancy. *Environ Res* 2000; 283 (23):3057-8.
8. Menditto A, Chiodo F, Patriarca M. et al. Esposizione al piombo: valutazione del rischio per la popolazione generale italiana negli anni '90. *Annali ISSN* 1998; 34:27-39.
9. Dal Zotto R, Discalzi G, Scansetti G, Il Problema dell'esposizione al piombo in Piemonte: dal posto di lavoro all'ambiente di vita. *Annali ISSN* 1998; 34:41-9.

10. Li Donni V, Bavazzano P, Brettoni M. et al. Venti anni di sorveglianza biologica (1976-1995) dell'esposizione professionale a piombo in alcune province toscane. *Annali* ISSN 1998; 34: 131-6.
11. Catenacci G, Tringoli S, Minoia C. et al, Rivalutazione del rischio espositivo da piombo in esattori di pedaggi autostradali. *Quad. Med. Lav* 1995; 66-9.
12. Vigliani E C, Bonsignore A D. *Medicina del Lavoro* ECIG 1993:148-50.
13. Sakai T. Biomarkers of lead exposure. *Ind Health* 2000; 38:127-42.
14. Bonsignore D, Calisano P, Cartasegna C. Sul meccanismo dell'inibizione da piombo dell'ala-didratasi eritrocitaria. *Med Lavoro* 1965; 56:199.
15. Lamola A A, Yamane T. Zinc protoporphyrin in the eryth of patients with lead intoxication and iron deficiency. 1974; 186:936-8.
16. Grandjean P, Lintrup J. Erythrocyte Zn protoporphyrin as an indicator of lead exposure. *Scand Jclin Lab Invest* 1978; 38:669-75.
17. Rettmer R L, Labbe R F. Zinc Protoporphirin/Heme ratio: evaluation of the Protofluor TM System. Poster for the Joint Meeting of American Association for Clinical Chemistry and Canadian Society of Clinical Chemistry. July 1986; Chicago, Illinois.
18. Labbé R L, Finch C A, Smith J N et al. Erythrocyte protoporphyrin / heme ratio in the assessment of iron status. *Clin Chem* 1979; 25:87-92.
19. Schiffman R B, Rivers S L, Finley P R et al. RBC Zinc protoporphyrin to screen blood donors for iron deficiency anemia. *Jama* 1982; 248:2012-5.
20. Kaul B. Lead exposure and iron deficiency among Jammu and New Delhi children. *Indian J Pediatr* 1999; 66:27-35.
21. Hastka J, Laserre J J, Schwartzbeck A, Hehlmann R. Central role of Zinc protoporphyrin in staging iron deficiency. *Clin Chem* 1994; 40:768-63.