

Corso TPALL, 3° anno

C.I. Igiene ambienti di vita e di lavoro

Medicina del lavoro 4 - Sicurezza ambienti di vita e di
lavoro

Principi di Tossicologia occupazionale

2. Il Monitoraggio biologico

Maurizio Manno

Università degli Studi di Napoli Federico II



Società Italiana di Medicina del Lavoro e Igiene Industriale
(S.I.M.L.I.I.)

Programma di formazione per l'accreditamento di eccellenza e
l'aggiornamento in Medicina del Lavoro 2004-06

Linee Guida sul Monitoraggio Biologico

Componenti il Gruppo di Lavoro:

A. Mutti (coordinatore), G. De Palma, P. Manini,
A. Baccarelli, G.B. Bartolucci, P. Carta,
M. Dell'Omo, V. Foà, S. Ghittori,
S. Iavicoli, M. Imbriani, M. Manno, L. Perbellini, E.
Pira, P. Apostoli

International Commission on Occupational Health (ICOH)
Scientific Committee on Occupational Toxicology (SCOT)

Proposal for a Position Paper

on

***Biomonitoring for Occupational Health
& Risk Assessment (BOHRA)***

Compiled by Maurizio Manno and Claude Viau
in collaboration with Larry Lowry, Antonio Mutti, Monica Nordberg,
Claudio Colosio and Sheng Wang

To be published by ICOH-SCOT

July 2007

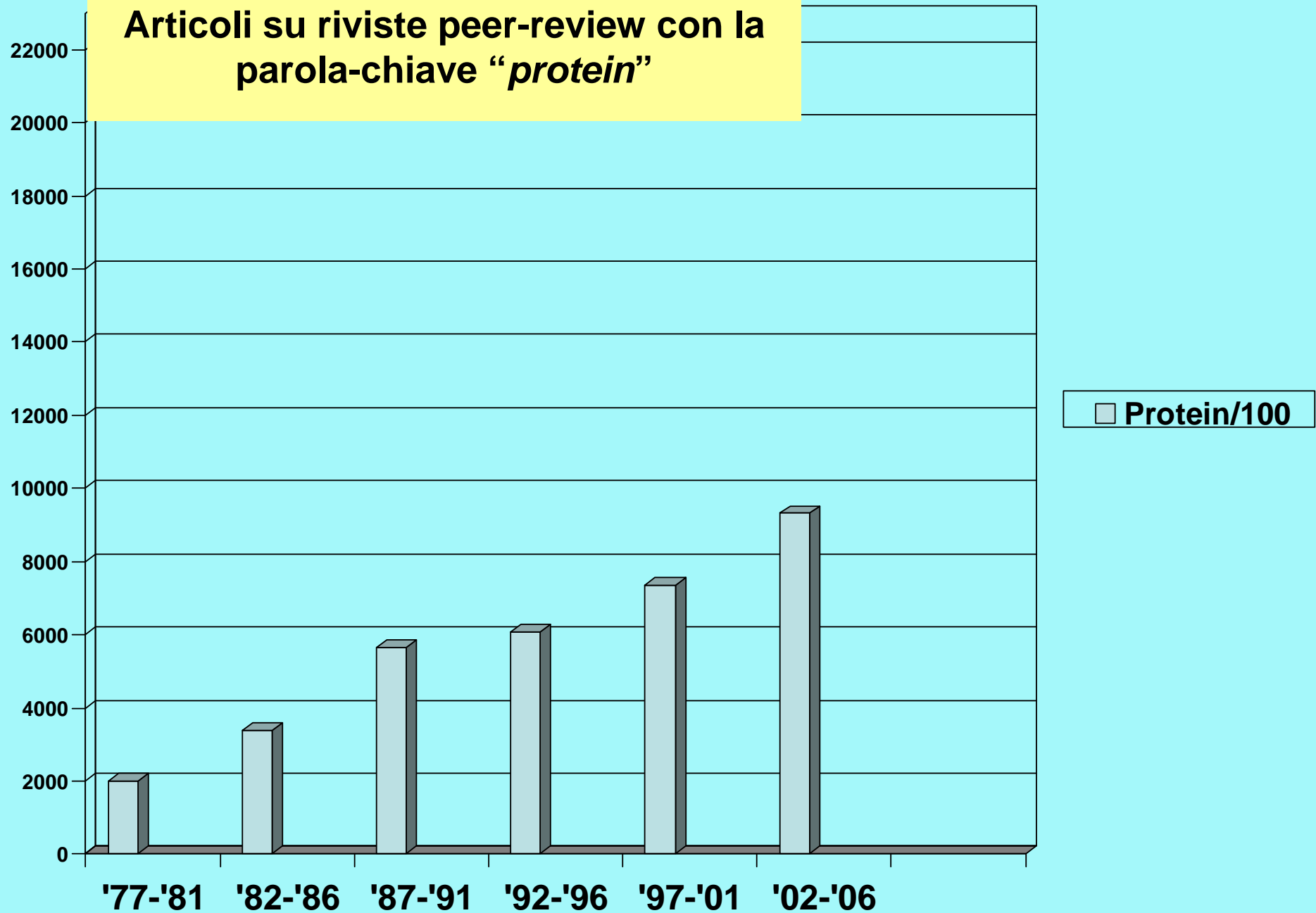
Index

	page N.
Notes on the literature survey	3
Preliminary Synopsis	4
Preface	5
1. INTRODUCTION	6
1.1 Definition and significance of Biological Monitoring (BM)	6
1.2 Role of BM in Occupational Risk Assessment	7
1.2.1 <i>Definition of Occupational Risk Assessment (ORA)</i>	8
1.2.2 <i>Contribution of BM to ORA</i>	9
1.3 Role of BM in Occupational Health	9
1.4 Advantages and limitations of BM	11
1.5 Classification of biomarkers	12
1.5.1 <i>Biomarkers of exposure</i>	13
1.5.2 <i>Biomarkers of effect</i>	15
1.5.3 <i>Biomarkers of susceptibility</i>	16
2. METHODS OF BM	17
2.1 Study design	17
2.2 Collection, processing, and storage of samples	17
2.3 Analytical methods	18
2.4 Specific groups of biomarkers	19
2.4.1 <i>Biomarkers of genotoxicity</i>	19
2.4.2 <i>Biomarkers from “omics” technology</i>	20
2.5 Limitations of BM studies	20
3. INTERPRETATION AND MANAGEMENT OF BM DATA	20
3.1 Variability	21
3.2 Validity and predictive value	21
3.3 Use of BM data	23
3.4 Biomonitoring and Limit Values	24
4. ETHICAL CONSIDERATIONS	25
References	28

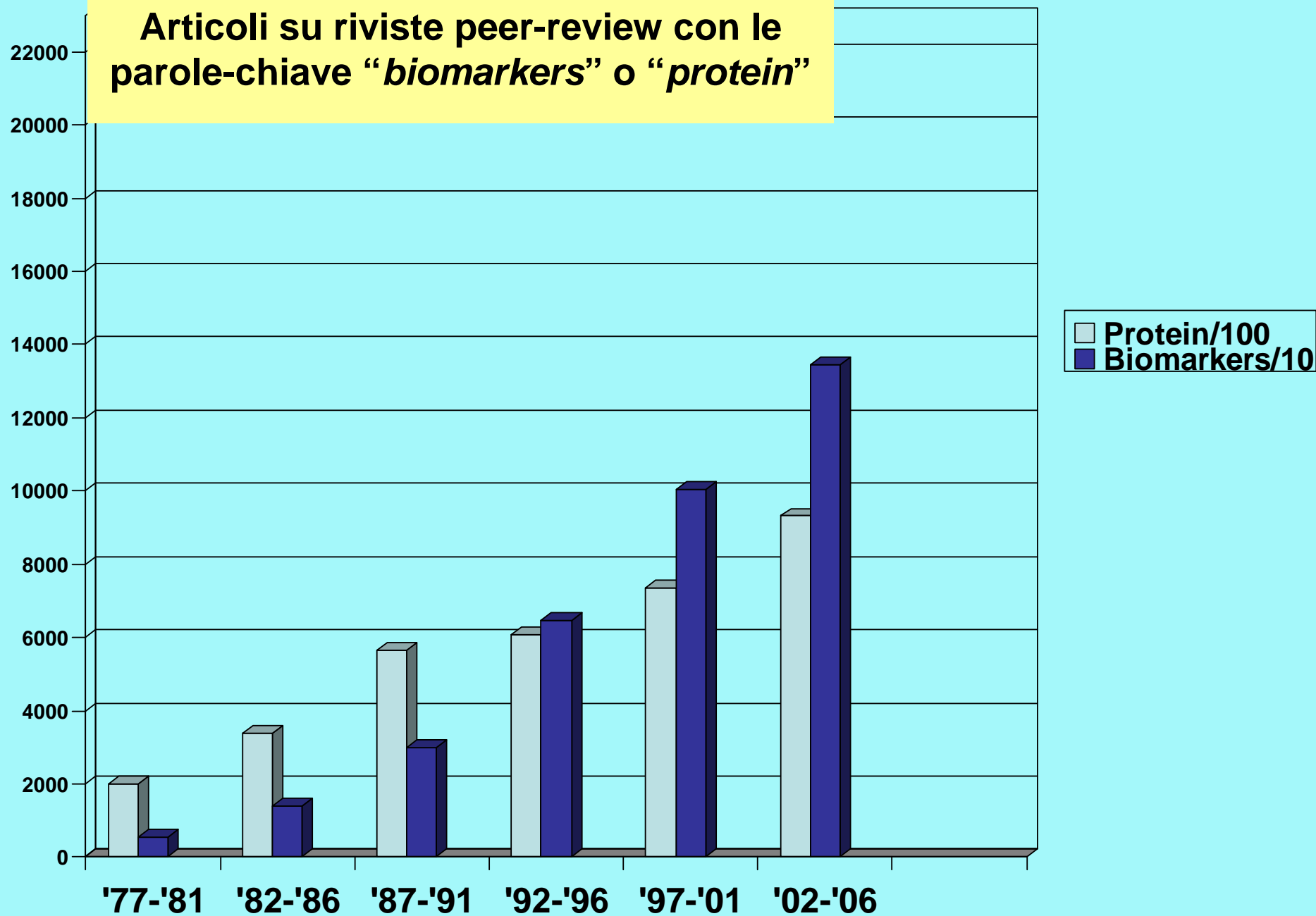
Razionale per la stesura di un Position Paper da parte dell'ICOH

1. Interpretazione ed uso dei dati di MB
2. Mancanza di un documento dell'ICOH
3. Estesa e crescente letteratura sul MB

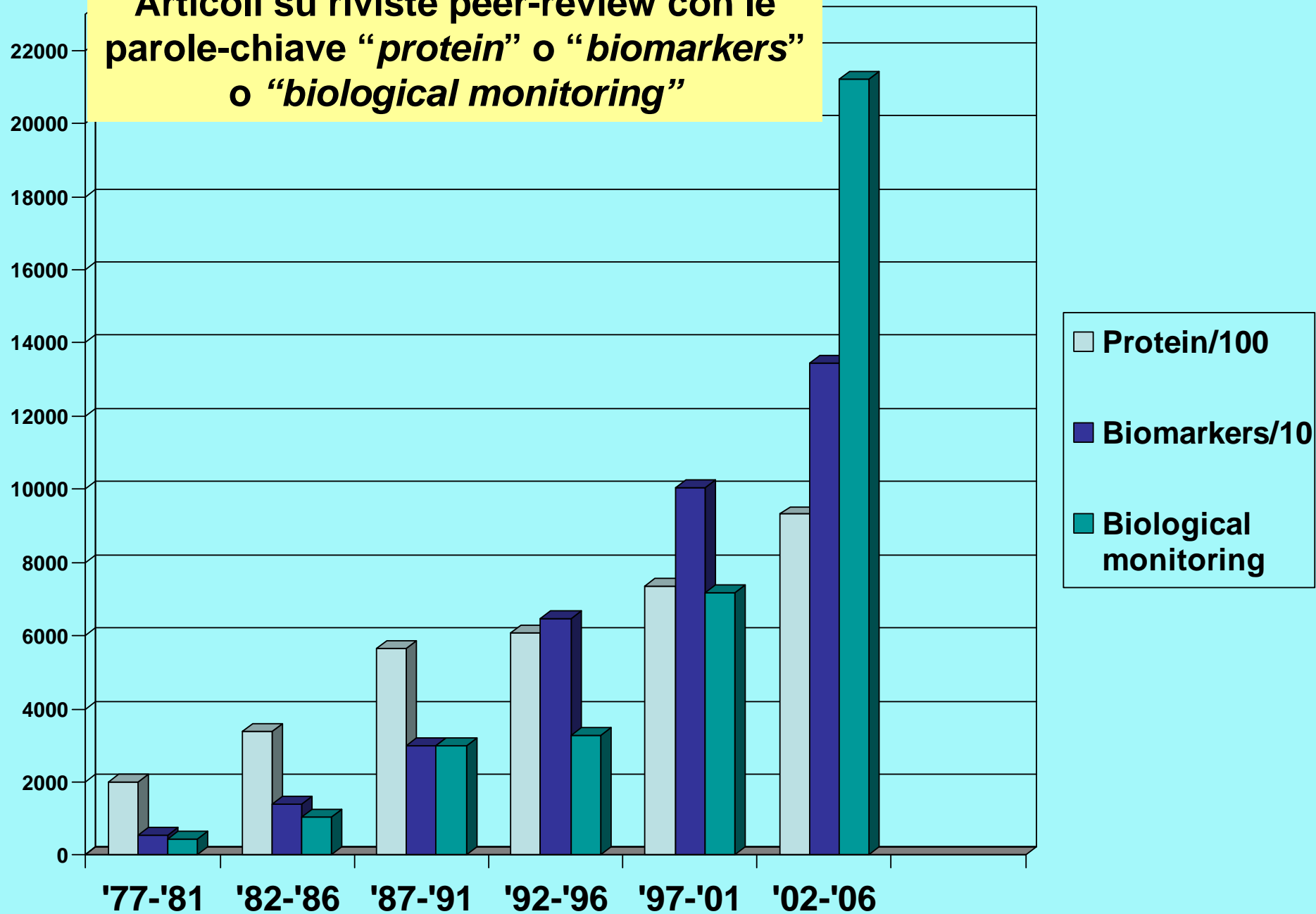
**Articoli su riviste peer-review con la
parola-chiave "*protein*"**



Articoli su riviste peer-review con le parole-chiave "*biomarkers*" o "*protein*"



Articoli su riviste peer-review con le parole-chiave “protein” o “biomarkers” o “biological monitoring”





Contenuti

- Il monitoraggio biologico (MB)
 - Biomarcatori di esposizione, effetto, suscettibilità)
- Aspetti etici del MB
- Conclusioni

Definizione di MB

- Misura periodica di un indicatore biologico da confrontare con appropriati valori limite o di riferimento.
 - Valori di riferimento: valori di campioni ottenuti da una popolazione di riferimento selezionata con criteri predefiniti ed elaborati statisticamente.
 - Valori limite: livelli ambientali o biologici di una sostanza che non devono essere superati al fine di evitare effetti sulla salute nella quasi totalità dei soggetti/lavoratori esposti.



Obiettivi del monitoraggio biologico

Integrare e personalizzare l'informazione fornita dal *monitoraggio ambientale*, per migliorare la protezione dei lavoratori e prevenire l'insorgenza di *effetti sulla salute*. Esso costituisce oggi pratica routinaria e inderogabile della medicina e dell'igiene occupazionali.



Vantaggi del MB sul MA

Informazioni aggiuntive fornite dal MB:

- Dose interna (assorbita, al bersaglio, efficace, ecc.)
- Variabilità intra- e inter-individuale
- Esposizione cutanea e/o per ingestione
- Esposizione pregressa
- Effetti biologici
- Suscettibilità individuale
- Efficacia dei mezzi di protezione



Biomarcatore

Alterazione precoce di componenti cellulari o biochimiche, o di processi, strutture o funzioni, che sia dimostrabile e misurabile in un sistema o campione biologico o in un organismo, in seguito all'esposizione ad un fattore di rischio.

Vi sono tre tipi principali di biomarcatori: di *esposizione*, di *suscettibilità* e di *effetto*.

(National Academy of Sciences, US)



Criteri di classificazione degli indicatori biologici (biomarcatori o *biomarkers*)

In base a:

- a) matrice biologica in cui vengono testati (*urine, sangue, tessuti, aria espirata, ecc.*)
- b) organo o tessuto in cui hanno origine o che li ha prodotti (renali, epatici, del Sistema Nervoso, ecc.)
- c) caratteristiche chimico-fisiche (volatili, idro/lipo-solubili, ecc.)
- d) significato tossicologico e al valore predittivo che viene loro attribuito rispetto al fattore di rischio di cui sono indicatori.



Sequenza di eventi dall'*esposizione* alla *patologia* e relativi indicatori biologici

Evento rilevante	Indicatore biologico di...
1. Assorbimento (<i>via inalatoria, digestiva, cutanea, parenterale, ecc.</i>)	<ul style="list-style-type: none">• esposizione (IBE)<ul style="list-style-type: none">- corrente (IBEC),- recente (IBER)- pregressa (IBEP)
2. Distribuzione/accumulo (<i>ossa, SNC, ecc.</i>)	<ul style="list-style-type: none">• accumulo (IBA)
3. Escrezione (<i>urinaria, epatica, resp.</i>)	<ul style="list-style-type: none">• esposizione (IBE) o dose interna (IDI)
4. Legame con bersaglio critico o non-critico (<i>DNA, Hb, enzimi, ecc.</i>)	<ul style="list-style-type: none">• dose biologicamente efficace (IDBE) o dose al bersaglio (IDB)
5. Alterazioni biochimiche, funzionali o strutturali precoci	<ul style="list-style-type: none">• risposta/effetto (IBR)<ul style="list-style-type: none">• deterministico (<i>d'organo/sistemico</i>)• stocastico (<i>tumore, immunoall., ecc.</i>)
6. Suscettibilità genetica o acquisita	<ul style="list-style-type: none">• suscettibilità (IBS)
7. Lesione iniziale d'organo o sistema	<ul style="list-style-type: none">• precoce di malattia (IPM)



1. Indicatore biologico di esposizione (IBE) o di dose interna

Sostanze esogene (*xenobiotici*), loro metaboliti o prodotti dell'interazione tra le sostanze o loro metaboliti reattivi (elettrofili o radicalici) e molecole-bersaglio endogene nucleofile, misurati in un compartimento accessibile dell'organismo.

(NRC 1989, modificata)



Caratteristiche dell'indicatore biologico di esposizione "ideale"

- a) Specificità per un solo agente chimico
- b) Sensibilità, ovvero possibilità di evidenziare anche esposizioni molto basse
- c) Facilità d'analisi: misurabile con metodiche semplici, non invasive e poco costose
- d) Persistenza, consentendo di quantificare anche l'esposizione pregressa
- e) Predittività per specifici stati patologici



Diverse categorie di IBE in base alla struttura chimica

Struttura

Esempio

- Composto tal quale
- Addotti
 - a proteine (Hb, albumina)
 - al DNA
- Metaboliti
 - Prodotti di attivazione
 - Prodotti di detossificazione
 - Metaboliti di significato incerto

Pb, benzene, ecc.

Hb-CO

B(a)P-DNA

2,5-ED

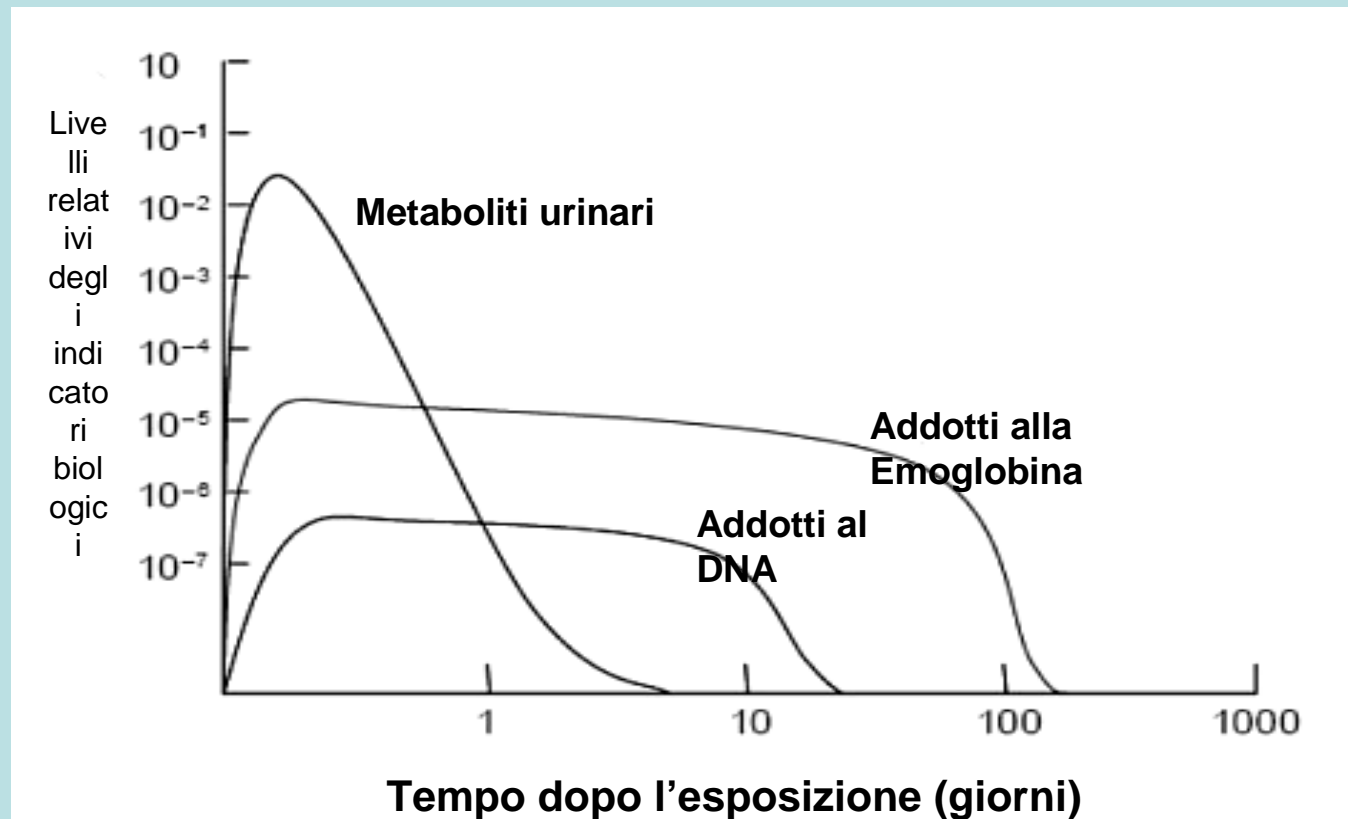
S-PMA

t,t-MA



Categorie di IBE in base all'emivita biologica

1. **molto breve** (*minuti*), es. benzene nell'aria espirata;
2. **breve** (*ore-giorni*), es. fenolo urinario nell'esposizione a benzene o il 2,5-esandione urinario nell'esposizione ad esano;
3. **media** (*giorni-settimane*), es. i metalli pesanti (piombo, mercurio, cadmio) dosati nel sangue,
4. **lunga** (*settimane-mesi*) es. gli addotti al DNA o all'Emoglobina di composti o metaboliti elettrofili;
5. **molto lunga** (*anni*), es. piomburia dopo chelazione indicativa della concentrazione ossea del metallo.

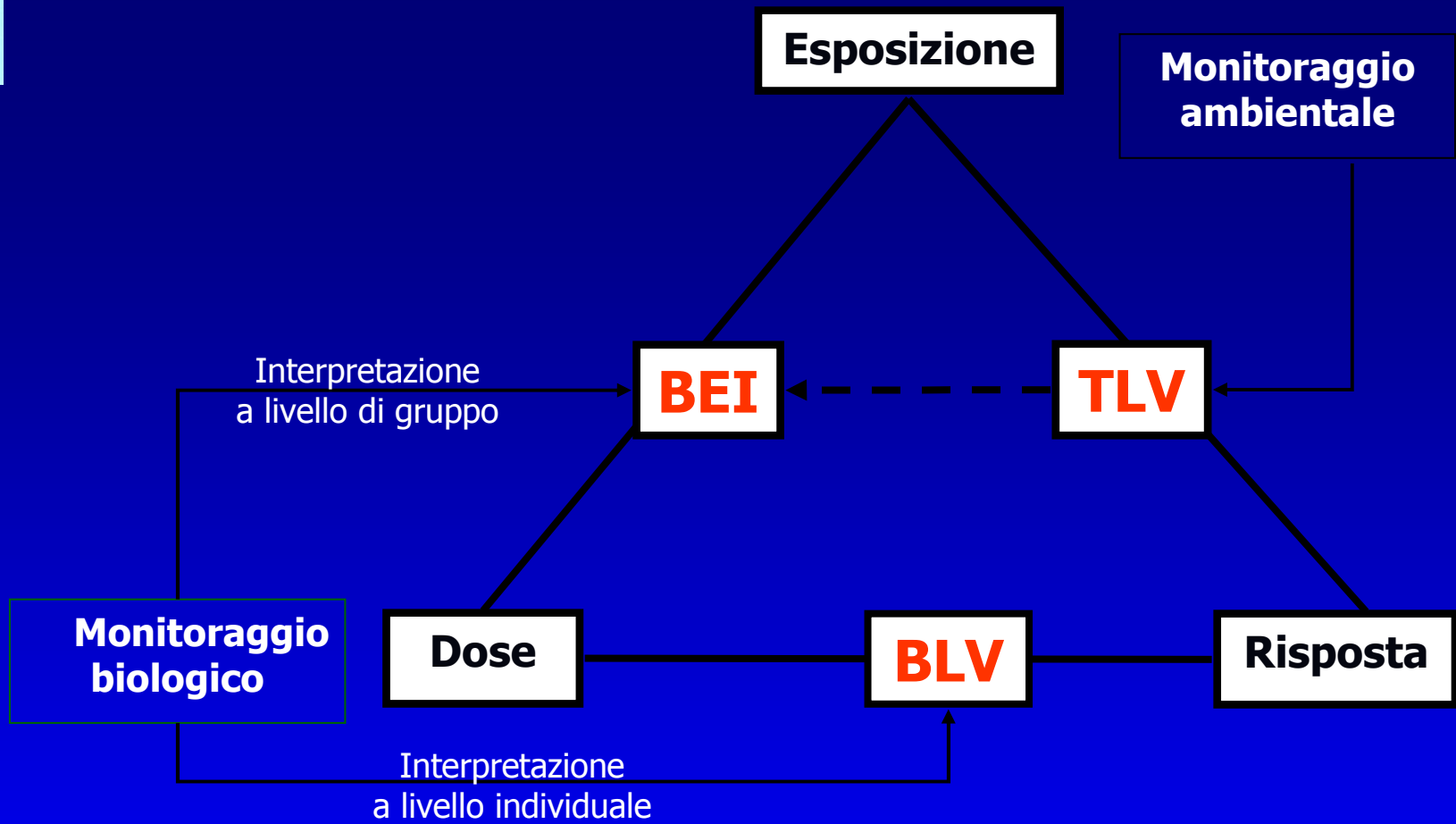


Andamento nel tempo di ipotetici indicatori di esposizione in funzione dell'emivita biologica.



Rapporto tra emivita biologica e tempo di prelievo

Emivita	Indicatore biologico	Tempo di prelievo	Esempio
< 2 hr	Aria espirata	Istantaneo	Solventi organici
2 < 10 hr	Urine o sangue	Fine turno	Metaboliti di solventi org.
10 < 100 hr	Urine o sangue	Fine settimana	
> 100 hr	Urine o sangue	Indifferente	piombo



Relazione tra Esposizione, Dose interna e Risposta e rispettivi Valori Limite

TLV®: valore limite di soglia (*threshold limit value*);
BEI®: indice biologico di esposizione (*biological exposure index*)
BLV: valore limite biologico (*biological limit value*).

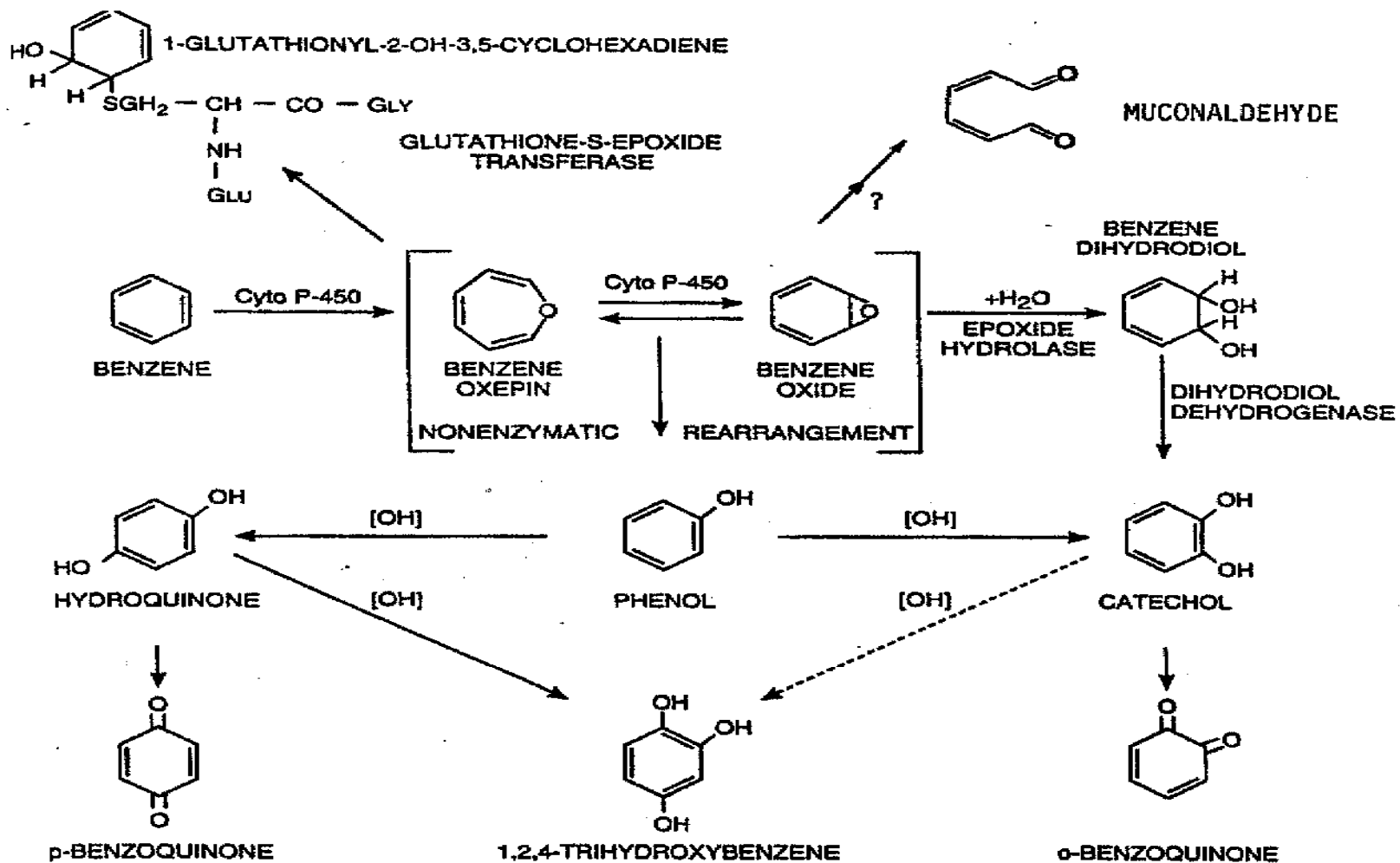


Fattori che modificano il rapporto tra valori ambientali (TLV®) e biologici (BEI®)

- Sensibilità analitica
- Variabilità biologica
 - assorbimento
 - distribuzione
 - metabolismo
 - escrezione
 - accumulo
- Carico di lavoro
- Esposizione multipla
- Dieta



Vie metaboliche del benzene



$R = 0.40, p < 0.026$

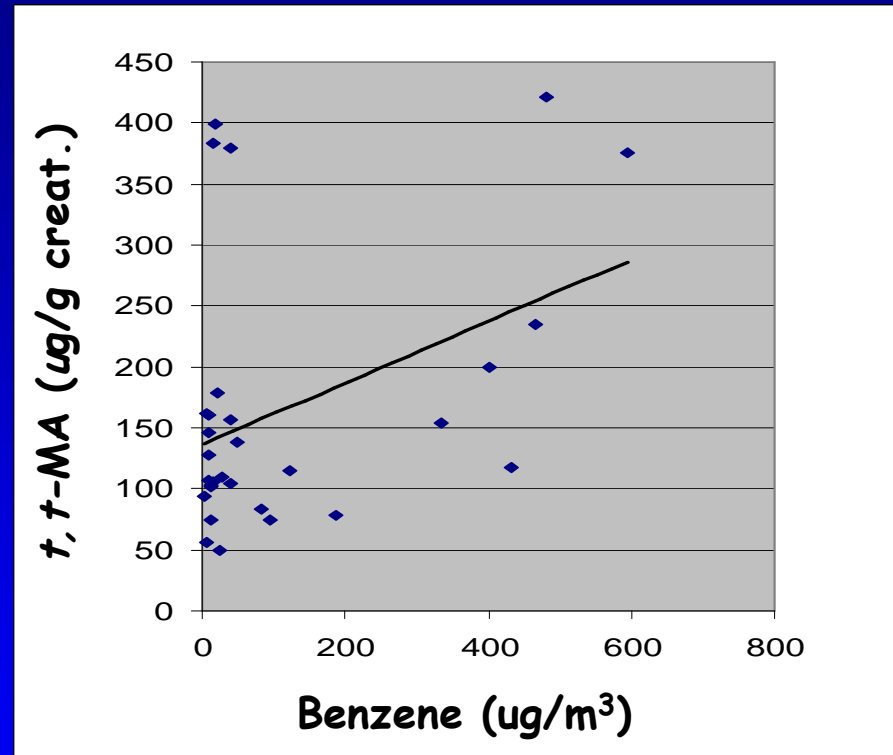
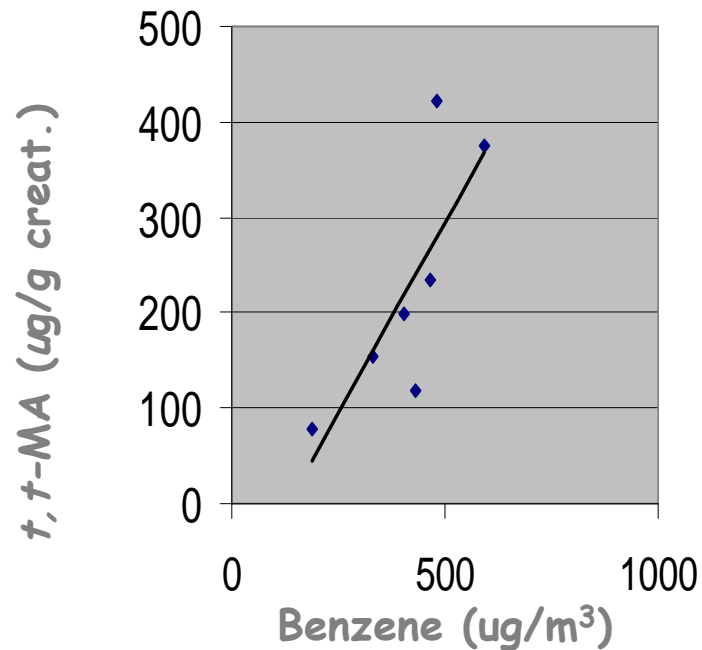


Fig. 7 - Correlation between exposure to environmental benzene and urinary *t,t*-MA in all workers.

A (R= 0.79, p<0.035)



B (R= - 0.11, NS)

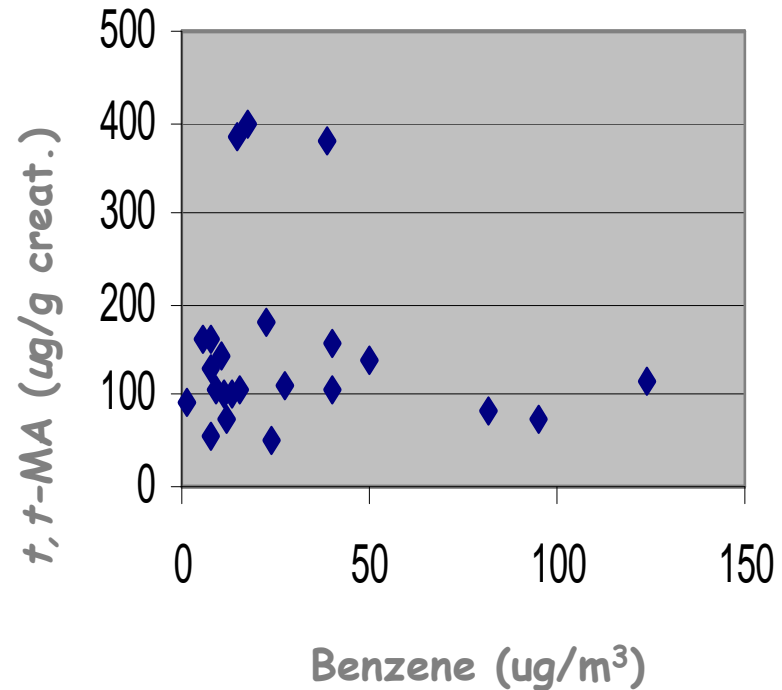
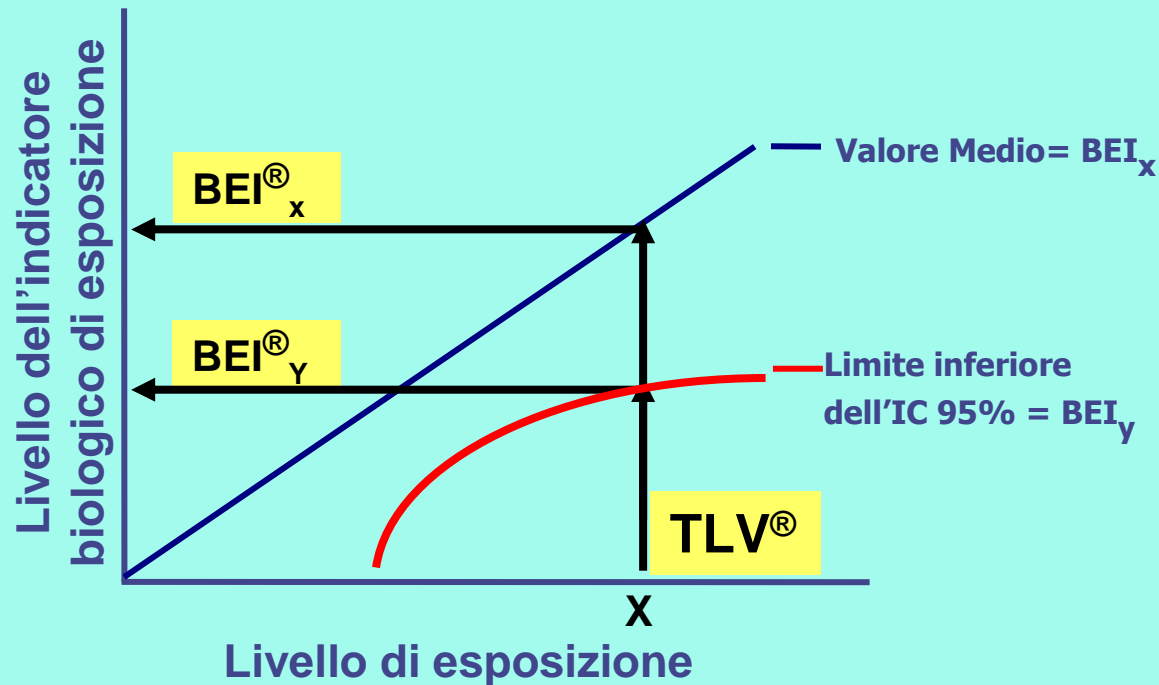


Fig. 8 - Correlation between environmental benzene and urinary *t,t*-MA in workers with exposure >160 (A) or <160 (B) $\mu\text{g}/\text{m}^3$.



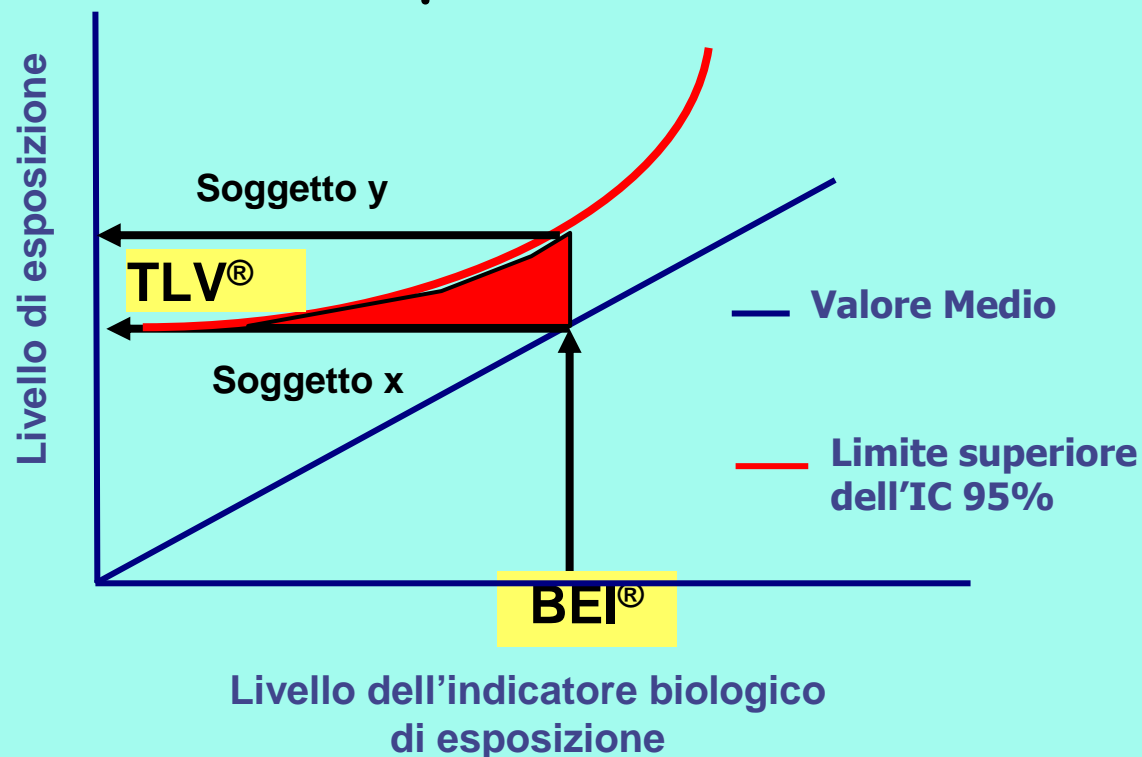
Effetto della variabilità individuale sul rapporto tra TLV[®] e BEI[®]



I valori di monitoraggio ambientale (TLV[®]) possono sopra- o sottostimare la reale esposizione individuale del lavoratore rappresentata dall'indicatore biologico (BEI[®]).



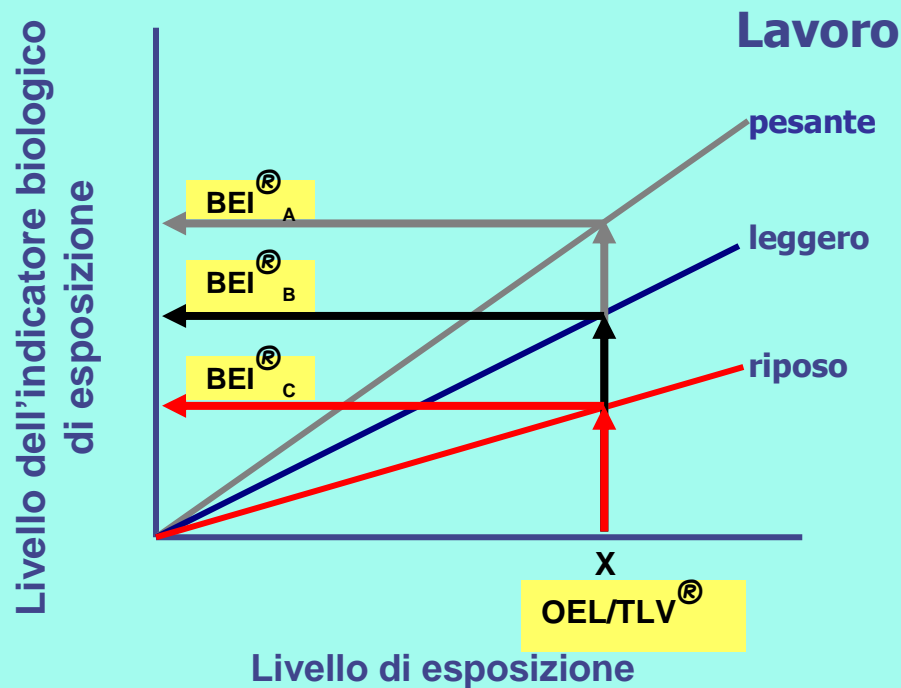
Effetto della variabilità individuale sul rapporto tra BEI^{\circledR} e TLV^{\circledR}



La dispersione dei dati intorno alla media (retta di regressione) non consente di applicare il concetto di BEI^{\circledR} a livello individuale, in quanto ciò potrebbe condurre ad una sottostima dell'esposizione reale e quindi del rischio (Soggetto y).



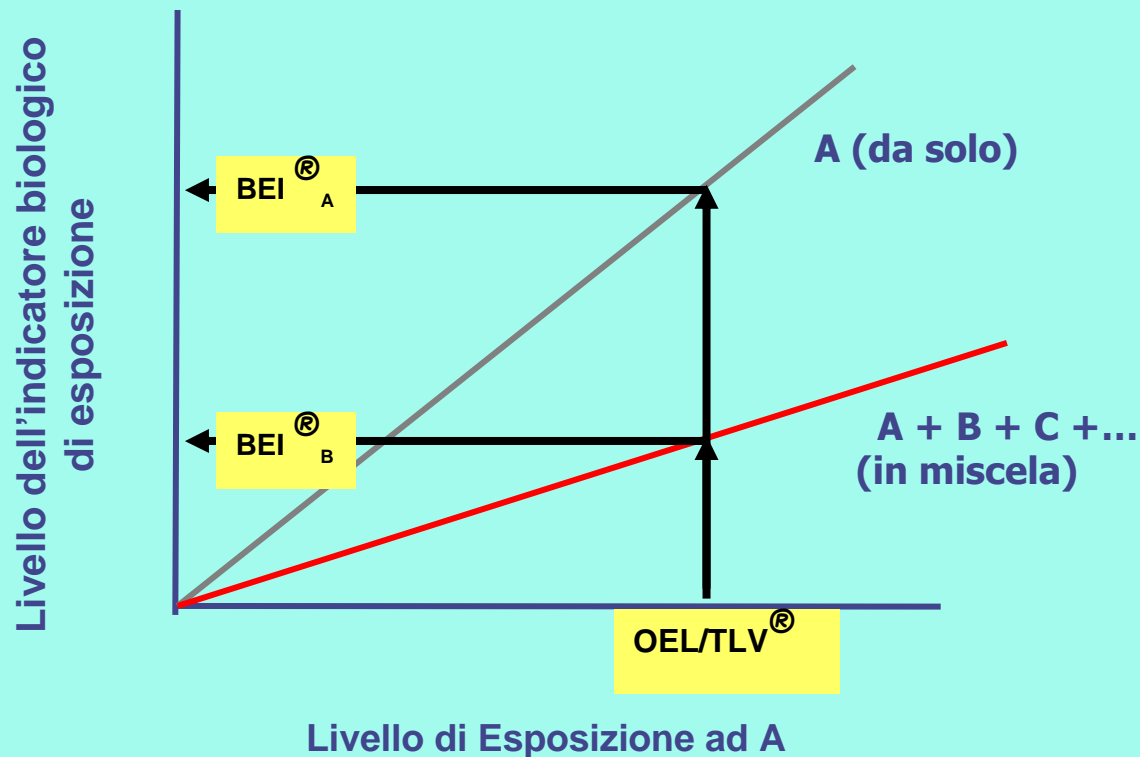
Effetto del carico di lavoro sul rapporto tra OEL/TLV^{\circledR} e BEI^{\circledR}



Il carico di lavoro modifica la pendenza della relazione tra indicatore di esposizione (OEL/TLV^{\circledR}) e dose (BEI^{\circledR}): per uno stesso OEL/TLV^{\circledR} dovrebbero in realtà essere proposti BEI^{\circledR} diversi corrispondenti a carichi di lavoro diversi (A, B, C).



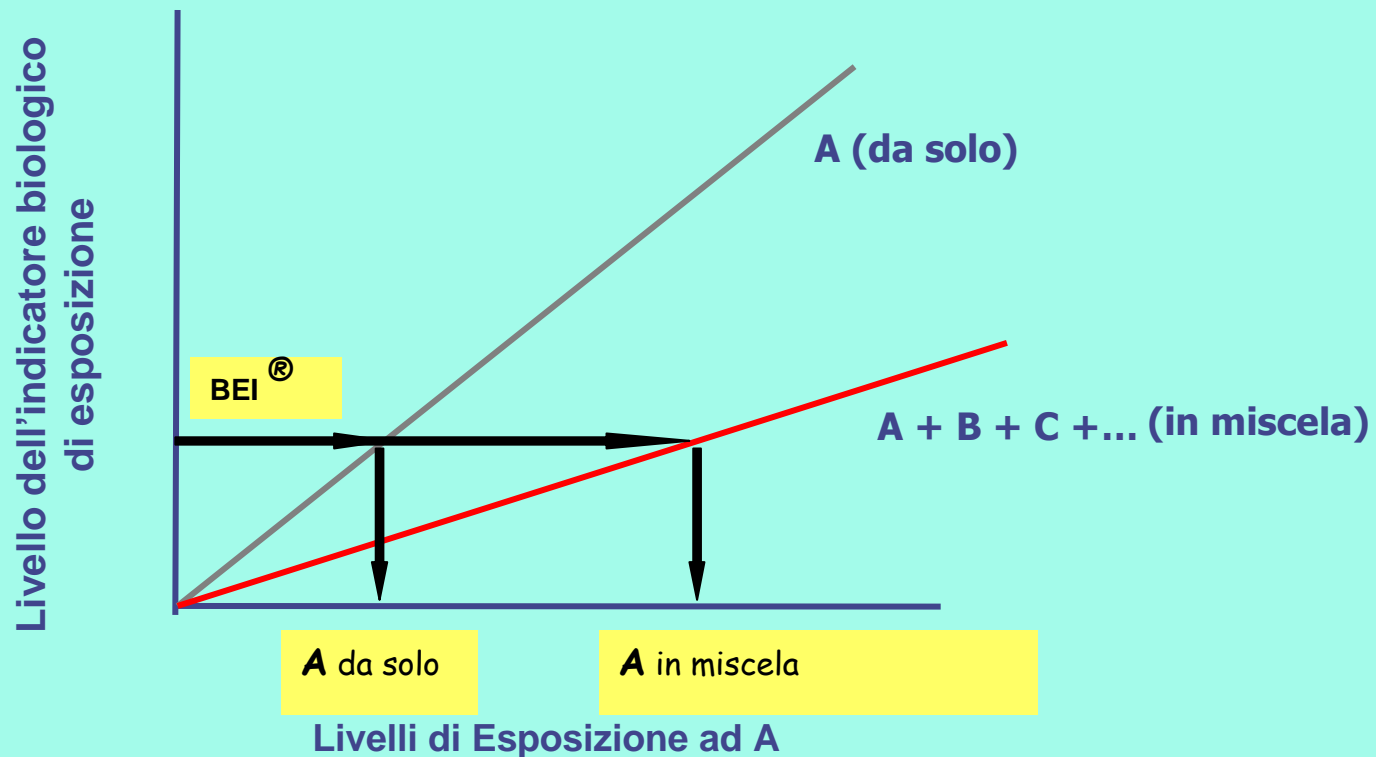
Effetto dell'esposizione multipla sul rapporto tra OEL/TLV^{\circledR} e BEI^{\circledR}



La relazione esposizione-dose (OEL/TLV^{\circledR} - BEI^{\circledR}) è modificata dalla presenza di altri composti in miscela, tanto che dovrebbero essere previsti BEI^{\circledR} differenziati per soggetti esposti a singole sostanze (A) o a miscele (A+B+C+...).



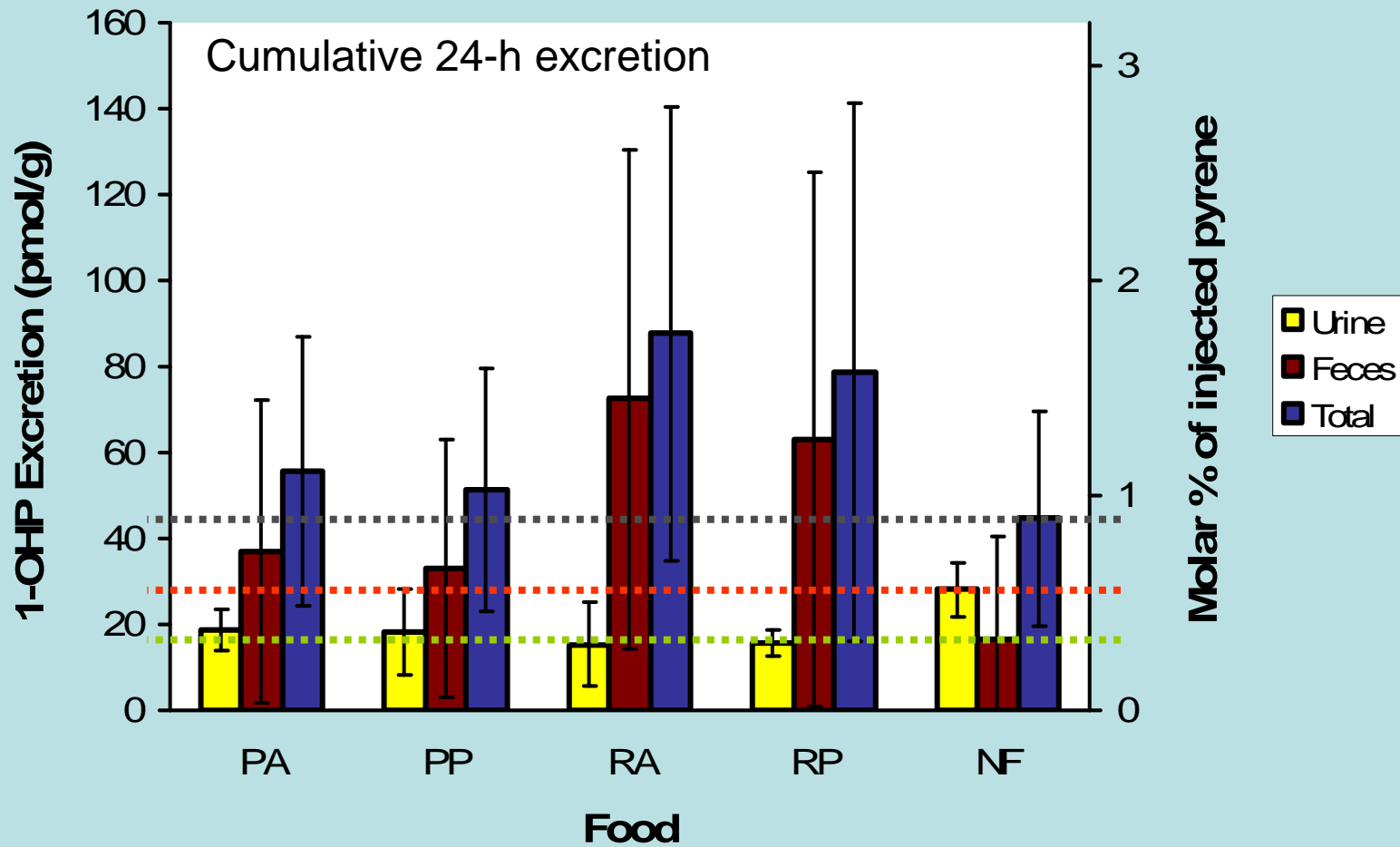
Effetto dell'esposizione multipla sul rapporto tra BEI[®] e OEL/TLV[®]



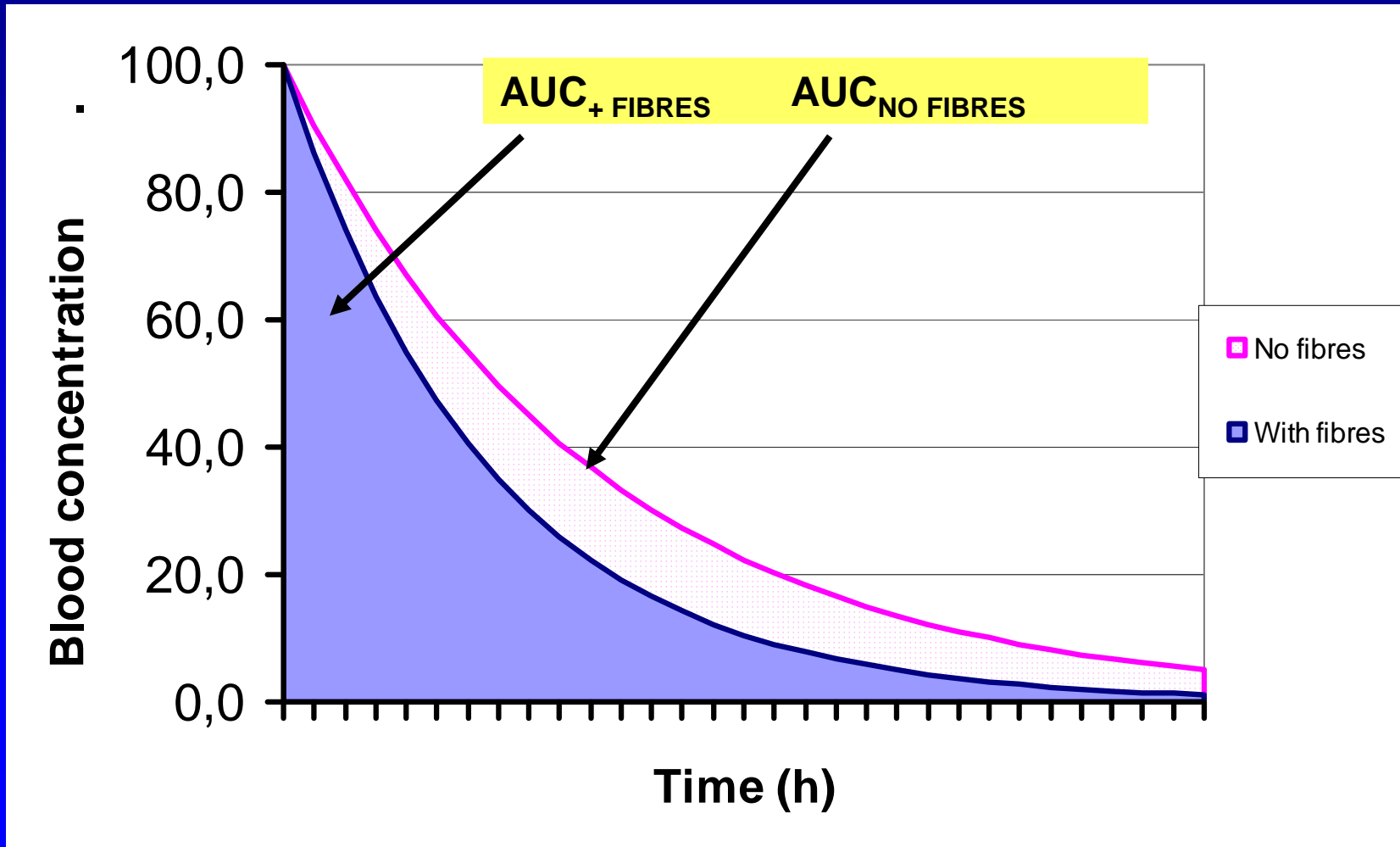
...ovvero, allo stesso livello di indicatore biologico (BEI[®]) possono corrispondere livelli di esposizione (OEL/TLV[®]) anche molto diversi tra loro: A da solo vs. A in miscela).

Diet and 1-OHP excretion

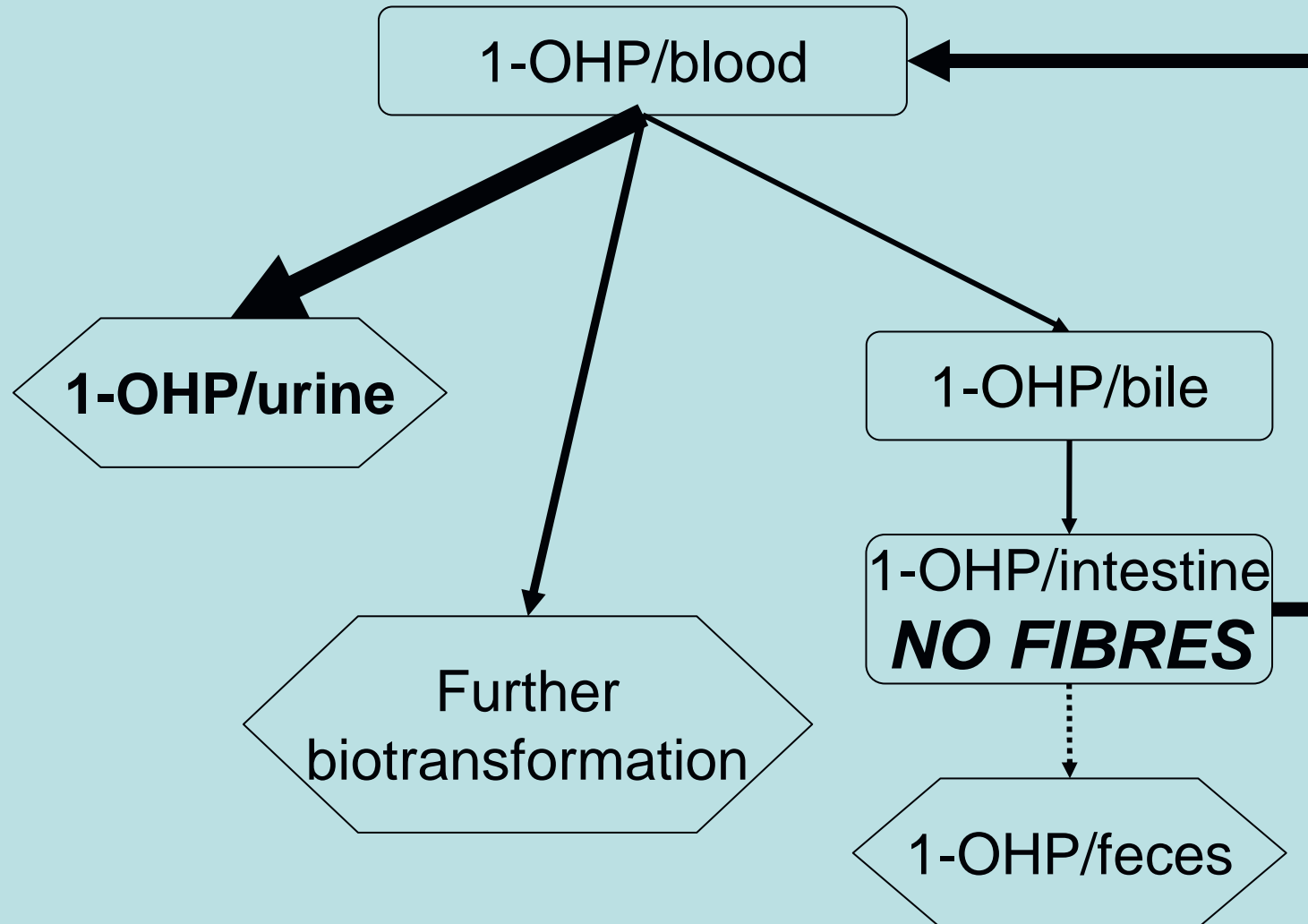
Results *in vivo*



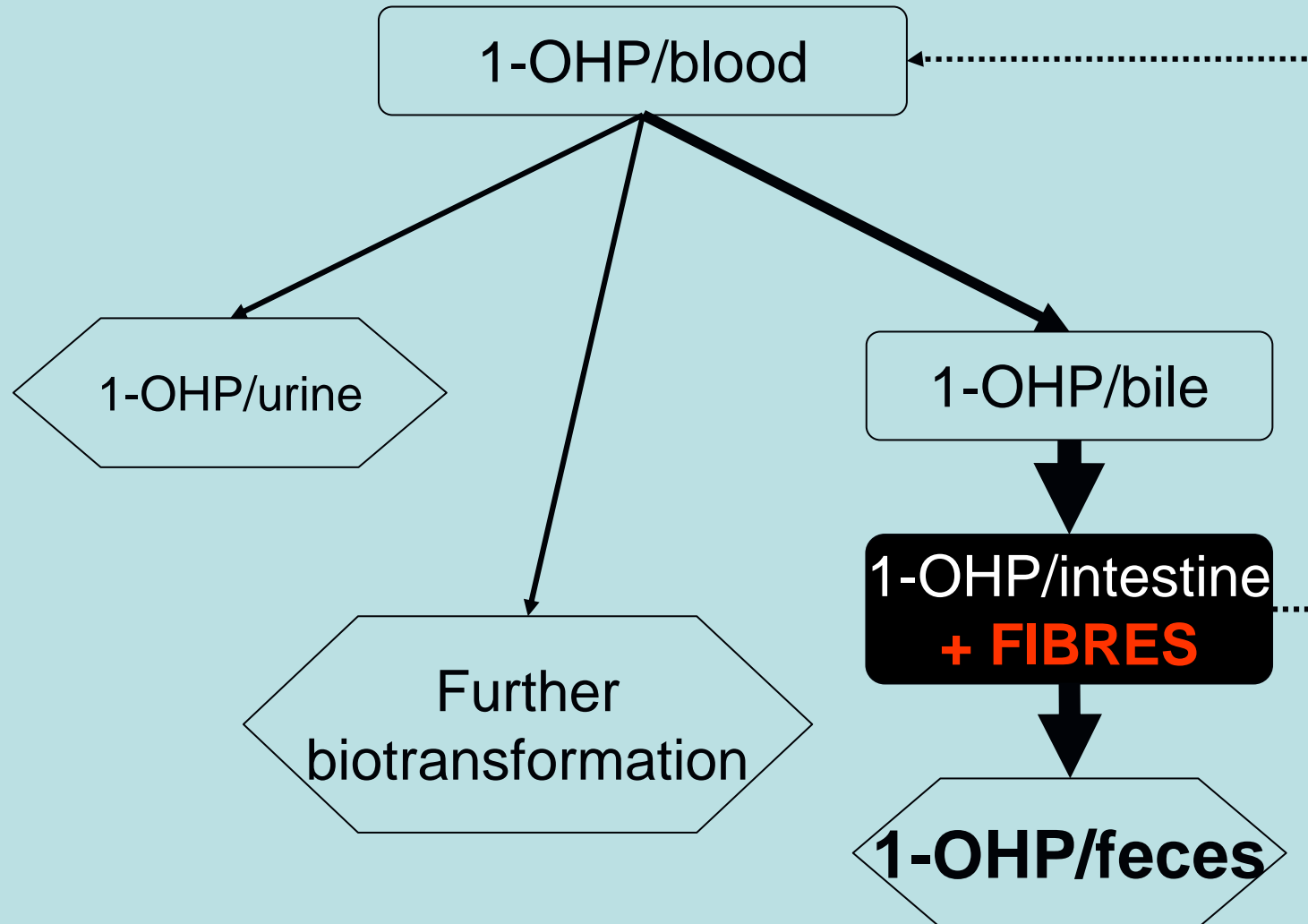
Diet and 1-OHP excretion



Effect of diet on 1-OHP excretion in rats (*No fibres*)



Effect of diet on 1-OHP excretion in rats (+ fibres)





Tre regole da non dimenticare...

1. Non esiste l'indicatore biologico di esposizione (IBE) ideale
2. Ogni IBE ha significato, modalità e tempi di campionamento propri.
3. E' importante, quindi, utilizzare, quando possibile, più IB con significato, modalità e tempi di campionamento diversi.



...altre due regole da non dimenticare:

- Un'esposizione anche protratta $> TLV$ (o $> BEI$) non comporta necessariamente un danno alla salute
- Un'esposizione $< TLV$ (o $< BEI$) non garantisce l'assenza di effetti sulla salute



2. Indicatori biologici di risposta (IBR) (o di effetto)

“Modificazioni misurabili di parametri biochimici o funzionali che, secondo la loro entità, permettono di identificare un ampio spettro di risposte biologiche, da semplici fenomeni di adattamento funzionale fino a malattie conclamate.

(NRC 1989)



Significato clinico degli indicatori biologici di effetto/risposta (IBR) di tipo classico

Tipo di indicatore	rilevanza clinica
<ul style="list-style-type: none">• di dose (<i>indiretti ma sensibili</i>)<ul style="list-style-type: none">- ALA-D, ALAU (Pb)- Inibizione AChE nel sangue (OP)	assente
<ul style="list-style-type: none">• di rischio per l'organo bersaglio<ul style="list-style-type: none">- Micro albuminuria (nefropatia diabetica)- Zn-PP eritrocitaria, porfirine urinarie (Pb)	potenziale
<ul style="list-style-type: none">• di effetto precoce<ul style="list-style-type: none">- Effetti citogenetici (composti genotossici)- Micro proteinuria (solventi organici, metalli)	dubbia
<ul style="list-style-type: none">• di danno in atto o residuo<ul style="list-style-type: none">- GOT, GPT (epatotossici)- Citologia urinaria (amine aromatiche)	certa



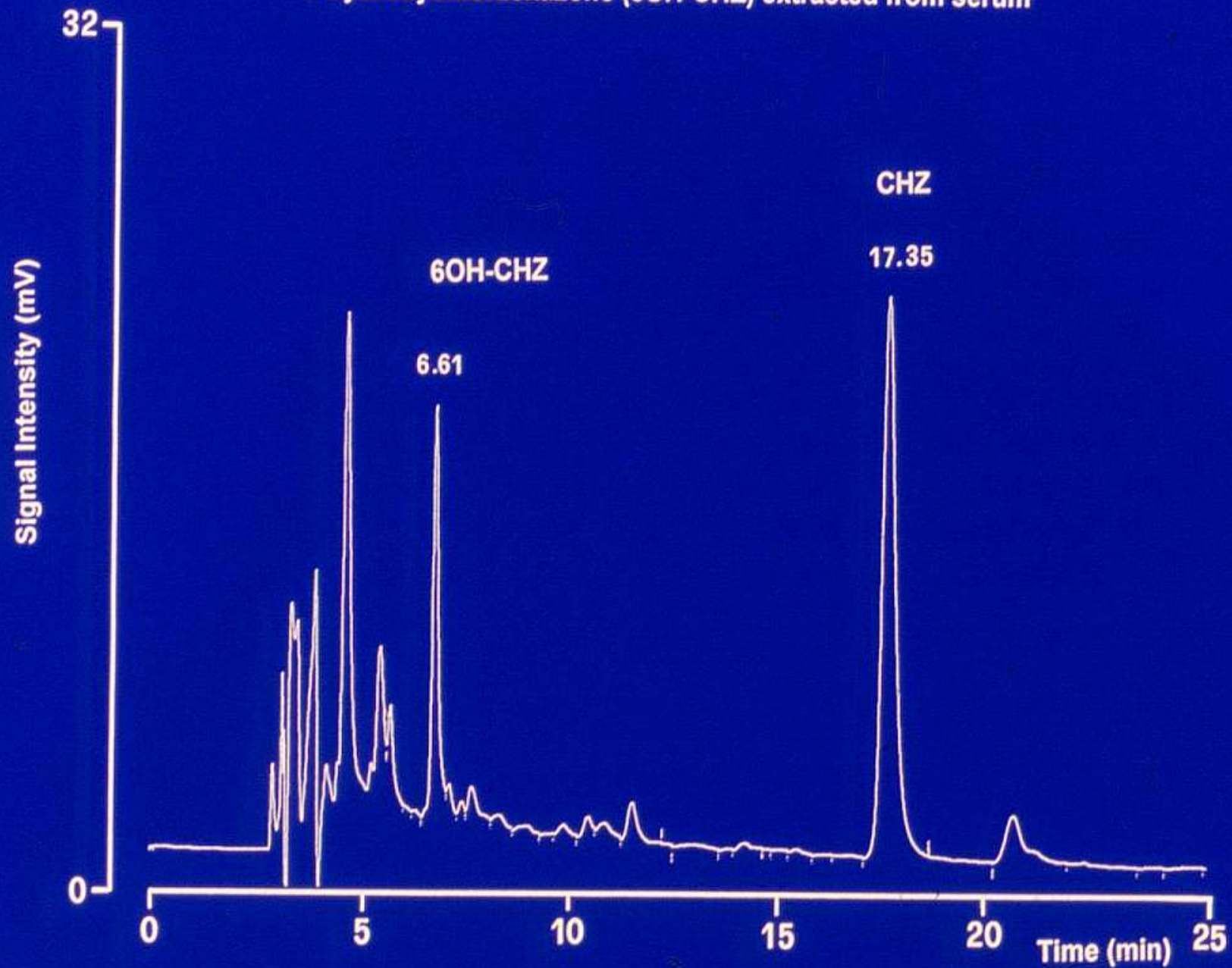
3. Indicatori biologici di suscettibilità (IBS)

Parametri biochimici o funzionali indicativi di una ridotta (o aumentata) risposta tossicocinetica o tossicodinamica, anche potenziale, conseguente l'esposizione ad un agente tossico.



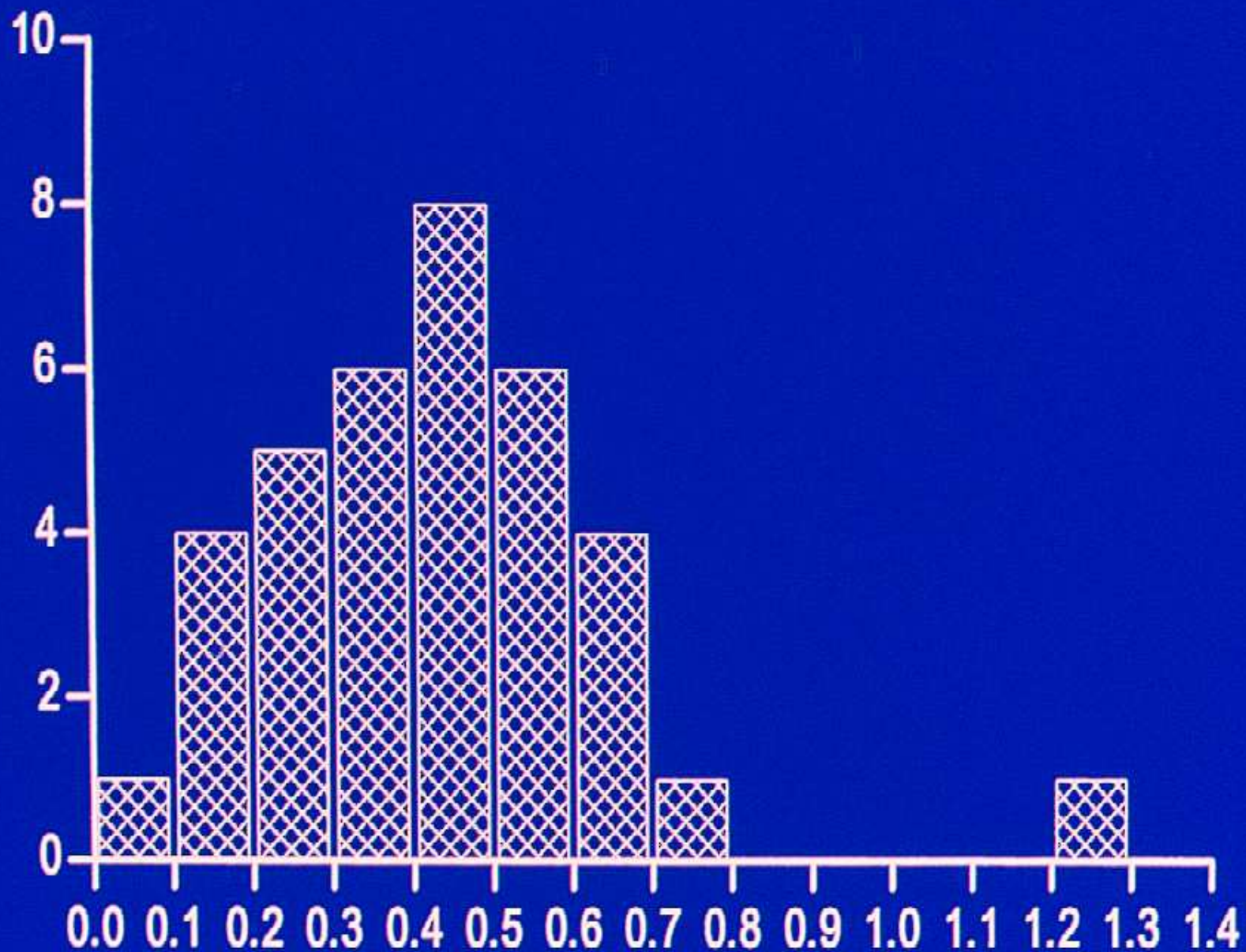


Chromatogram from HPLC analysis of chlorzoxazone (CHZ) and 6-hydroxychlorzoxazone (6OH-CHZ) extracted from serum





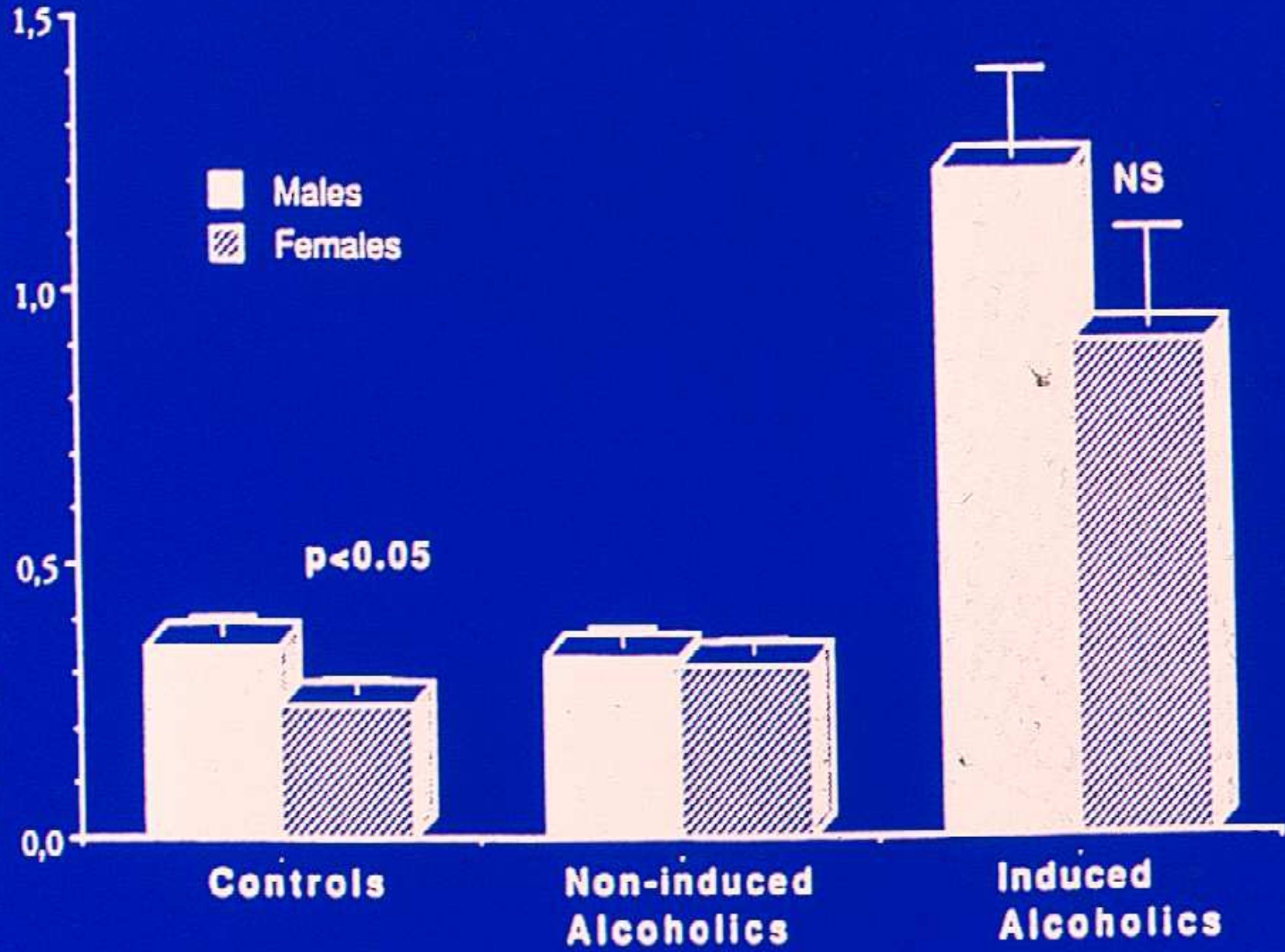
Numero di soggetti



Fenotipo CYP2E1 (6-OH-CHZ/CHZ)

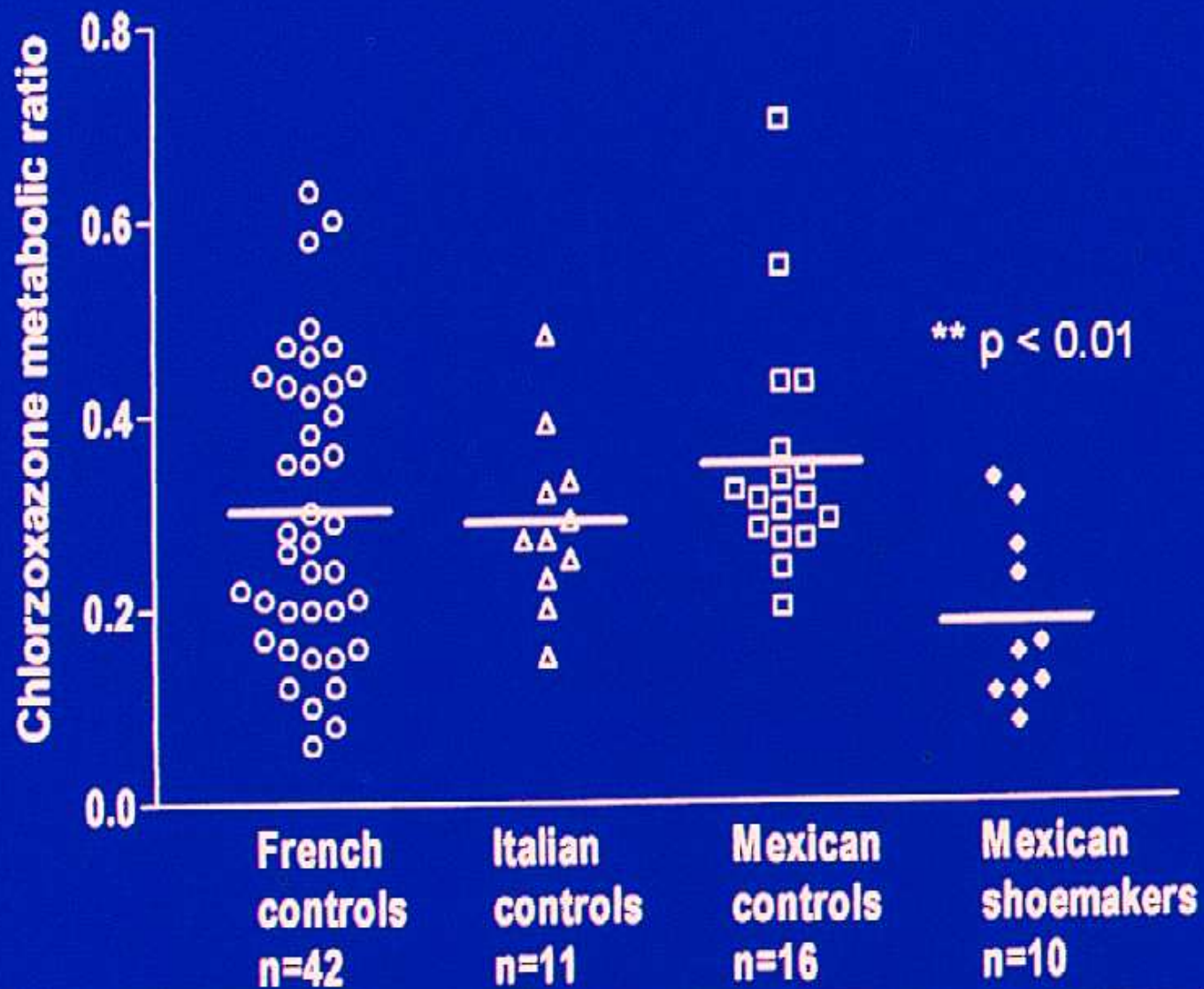


6-hydroxychlorzoxazone / chlorzoxazone ratio





Effect of volatile solvents

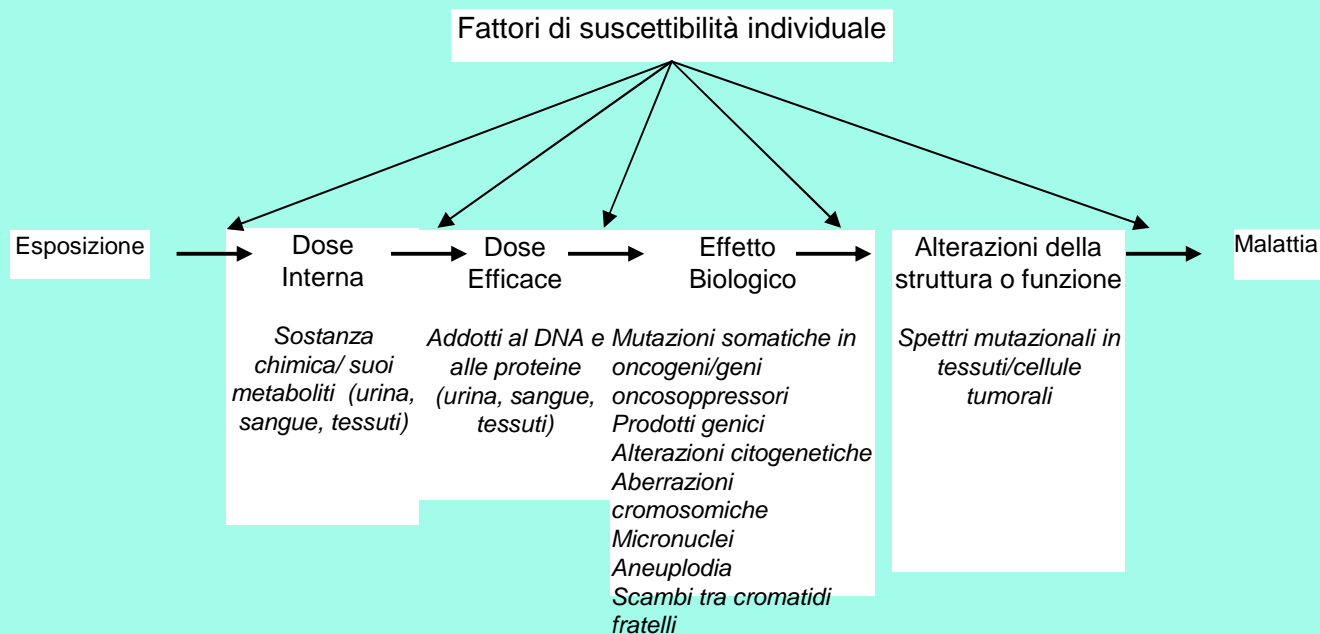




Monitoraggio Biologico dei cancerogeni



Relazione tra i diversi indicatori biologici nel continuum dall'*esposizione* alla *malattia* (tumore)



< Indicatori Biologici di Esposizione > < Indicatori Biologici di Effetto >



MECCANISMI DI CANCEROGENESI

Agenti Inizianti (genotossici)

- Alterano il DNA
- Cancerogeni completi
- Sono o formano specie reattive
(elettrofile o radicaliche)
- Spesso sono mutageni
- Basta la singola esposizione
- Assente la dose-soglia

Agenti Promoventi (epigenetici)

- Stimolano la mitosi *(mitogeni)*
- Necessitano di un iniziante
- Non sono elettrofile/radicali
- Non sono mutageni
- Necessaria l'esposizione ripetuta
- Presente la dose-soglia



Monitoraggio biologico di cancerogeni genotossici

Indicatore	significato	vantaggi/svantaggi
- Composti/metaboliti	esposizione	buona specificità
- Addotti - <i>a proteine</i> - <i>al DNA</i>	dose dose biol. efficace dose al bersaglio	alta specificità esposizione pregressa esposizione recente
- Danno citogenetico - SCE (Scambio crom. fr.) - AC (Aberrazioni cromos.) - MN (Micronuclei) - CT (Comet Test)	effetto	bassa specificità alta sensibilità qualità variabile



Monitoraggio biologico di cancerogeni epigenetici (non genotossici)

- composti tal quali o metaboliti (*sangue e urine*)
- induzione enzimatica
 - indicatori diretti (contenuto/attività di CYP, GST, ecc.)
 - Indicatori indiretti (γ GT, D-GA, ecc.)
- proliferazione cellulare
- inibizione della comunicazione intercellulare (*gap-junction*)
- apoptosi
- marker genomici o proteomici
 - espressione dell'RNA
 - espressione delle proteine



Parte 3

Aspetti etici del Monitoraggio Biologico



Phases of a Biological Monitoring Programme

(BMP)

1. planning
2. implementation
3. management of the results



**INTERNATIONAL COMMISSION
ON
OCCUPATIONAL HEALTH**



1992

**INTERNATIONAL CODE OF ETHICS
FOR OCCUPATIONAL HEALTH PROFESSIONALS**



"Biological tests and other investigations must be chosen from the point of view of their *validity for protection* of the health of the worker concerned, with due regard to their sensitivity, their specificity and their predictive value.



...Where a choice is possible and appropriate, preference must always be given to *non-invasive methods* and to examinations, which do not involve any danger to the health of the worker concerned.



If any test included in the BMP does not involve any significant risk for the worker a protocol is implemented.

If some risk is present, an independent, qualitative and quantitative *risk-benefit* evaluation has to be carried out on an individual basis.



Risk analysis of the BMP includes:

- the *type* of risk
- the *severity* of risk
- the *reversibility* of risk
- the *probability* of risk



***Benefit* analysis of a BMP includes:**

1. for the *worker*:

- **information**
- the ***severity*** of the occupational disease
- the ***probability*** of the occup. disease
- the ***type*** of marker (exposure, susceptibility, effect)
- the ***validity*** of the marker (sensitivity, specificity, predictivity)
- the ***number of workers*** involved



Per valutare l'opportunità di un test è necessario conoscere:

- » Prevalenza della patologia
- » Sensibilità del test
- » Specificità del test

Supponiamo di voler utilizzare un test predittivo di una data patologia per valutare l'idoneità di un gruppo di laboratori...



*Is this particular biomonitoring test
on this particular worker or group of
workers ethically justified?*



A BMP can be ethically classified as:

- a)* unacceptable
- b)* justified
- c)* recommended



Conclusioni

- Il monitoraggio biologico è uno strumento irrinunciabile per la valutazione del rischio chimico, sia in medicina del lavoro che in igiene industriale.



Conclusioni (2)

- Le nuove tecniche analitiche e la biotossicologia molecolare suggeriscono nuovi possibili indicatori biologici il cui significato in termini di valutazione del rischio non è tuttavia ancora chiaro.



Conclusioni (3)

- Permangono limiti pratici, scientifici ed etici del MB, ma questi non possono/devono precludere l'utilizzo dei molti test già disponibili e validati.



Grazie!

maurizio.manno@unina.it

www.occupationaltoxicology.unina.it