

Le endotossine batteriche, un rischio biologico emergente? Studi effettuati in impianti di trattamento e gestione rifiuti.

IVAN CASTROVILLARI – Dott. Tecnico della Prevenzione nell'Ambiente nei Luoghi di Lavoro - Libero professionista.

La gestione dei rifiuti è uno dei problemi di grande interesse della nostra epoca per le implicazioni ecologiche, sanitarie, economiche e sociali che la caratterizzano. La normativa ambientale ha imposto criteri sempre più stringenti a tutela dell'ambiente e della salute dei cittadini, i quali a loro volta sono diventati sempre più consapevoli ed attenti ai pericoli che possono derivare da uno smaltimento improprio dei rifiuti. Nasce quindi la necessità di ricorrere a sistemi alternativi di gestione, in linea con la logica della sostenibilità e con lo scopo di trarre un valore aggiunto dal rifiuto e non soltanto un costo sociale. I metodi utilizzati per ottimizzare tale gestione tendono a ridurre la quantità di materiale smaltito, attraverso l'educazione dei cittadini, il riciclo e l'uso di tecnologie per il riutilizzo di materiali ed produzione di energia. Questo nuovo sistema ha comportato la nascita e la crescita di attività produttive dedicate alla raccolta, trattamento, recupero e stoccaggio dei rifiuti, con il conseguente aumento dei



lavoratori impiegati nel settore
Numerosi studi hanno messo in evidenza il "settore rifiuti" per quanto riguarda sia gli infortuni che le malattie professionali sul lavoro, queste ultime spesso sottostimate a causa della scarsa specificità dei sintomi e della carenza dei sistemi di sorveglianza. Tuttavia, anche a fronte di evidenze scientifiche, la consapevolezza degli addetti a queste attività è ancora scarsa, anche a causa del basso livello di formazione e della frequente provenienza da paesi stranieri.

Rimane ancora molto lavoro da fare, soprattutto nella scelta di modelli tecnici di valutazione del rischio, in modo che questi possano rappresentare ausili decisionali nella gestione del rischio stesso, oltre che nell'implementazione di nuove tecnologie e nell'educazione dei lavoratori.

E' in tale ottica di cambiamento dei rischi professionali; che è importante che gli operatori della prevenzione si attivino in maniera adeguata cooperando e promuovendo la prevenzione .

IL RISCHIO BIOLOGICO NELLA GESTIONE DEI RIFIUTI

Il rischio biologico è uno dei temi ripresi dal D.lgs. 81/08 in materia di salute e sicurezza sul lavoro. Tale rischio, riferito al titolo X, comprende tutte le attività che possono comportare un'esposizione ad agenti biologici in maniera deliberata e non (rischio potenziale). Nel settore occupazionale, si possono distinguere attività che comportano l'uso di microrganismi opportunamente selezionati, mentre altre che pur non prevedendone uno specifico uso, espongono il lavoratore a rischi legati ai microrganismi stessi.

Tra tali attività rientrano quelle destinate alla gestione del rifiuto ed al trattamento dello stesso (compostaggio, biostabilizzazione, depurazione delle acque, trattamento del percolato ecc..) le quali sono correlate alla presenza di rischi per la salute a breve e lungo termine. In tali situazioni i microrganismi presenti possono essere veicolati in maniera diversa in relazione alle condizioni ambientali (condizioni meteo/climatiche, presenza di vento ecc..), al tipo di rifiuto ed alle modalità di trattamento.

Le principali **vie di contatto** per i lavoratori esposti possono essere: muco-cutanea, apparato digerente e respiratoria.

La **sintomatologia** clinica osservabile è relativa a: irritazione polmonare, diarrea, dolori articolari, febbre, brividi, stanchezza insolita. Limitate evidenze epidemiologiche, hanno posto l'attenzione sui possibili effetti cancerogeni a danno dei lavoratori esposti.

I bio-aerosol possono contenere una moltitudine di microrganismi

differenti vitali e non vitali, nonché componenti biologiche attive da essi derivati. In linea generale, l'inalazione di microrganismi ha quale principale conseguenza, il manifestarsi di una reazione di "ipersensibilità immediata" o allergia; questa reazione è dovuta alla presenza di anticorpi antigene-specifici appartenenti alla classe IgE delle immunoglobuline circolanti (Burrell, 1991). Il rischio maggiore di sviluppare allergie si presenta per quei soggetti già predisposti o "sensibili", ed a causa di fattori genetici individuali; per tali persone infatti anche concentrazioni estremamente basse di specifici allergeni aero-dispersi sono sufficienti a scatenare massicce risposte immunitarie con conseguenze anche gravi.

In tale contesto appare importante sottolineare che molte componenti tossiche possono essere associate al particolato e, quando vengono inalate in analogia a quanto avviene per le polveri, è possibile determinarne effetti sulla salute in funzione della dimensione aero-dinamiche.

Numerosi studi hanno evidenziato come l'esposizione ripetuta nel tempo a microrganismi, non determini soltanto effetti acuti ma anche cronici.

I principali agenti biologici da considerare come potenziale fonte di rischio per gli addetti al trattamento di R.S.U. e produzione di compost sono:

Micotossine con potenziali attività tossica e/o cancerogena

Alcuni VOCs derivanti dal metabolismo di alcuni ceppi fungini con potenziali attività irritanti e/o antigeniche (NH₃, H₂S, ecc..)

L' (1-3)-β-D-glucano (prodotto fungino) e le spore di alcuni funghi (Alternaria, Aspergillus, Cladosporium, Penicillium) che hanno dimostrato attività allergenica

Gli attinomiceti con potenzialità allergiche e sensibilizzanti

Le endotossine prodotte dai batteri Gram negativi, con potenziale attività tossica e frequente possibilità di determinare reazioni allergiche e di sensibilizzazione.

Uno studio austriaco (Marth E, et al. 1999) ha seguito un gruppo di 34 dipendenti di un impianto di compostaggio nel corso di un triennio. Dallo studio è emersa una diminuzione della funzionalità polmonare nel tempo, ma comunque entro valori attesi, ed un aumento della concentrazione totale di IgE nel sangue.

Un altro studio tedesco (Schappler-Scheele et al. 1998 - 1999) ha preso in esame 362 addetti al compost in 42 impianti di compostaggio. Dallo studio è emerso che in 129 addetti erano comuni patologie quali asma, bronchite allergica, e alveolite allergica.

Allo stato attuale non esistono TLV (Valori Limite di Soglia) per tali sostanze a ragione di una non adeguata evidenza scientifica; i bio-aerosol possono contenere contaminanti saggiabili quali ad esempio endotossine, antigeni, micotossine, VOC; questi composti possono essere rilevati tramite saggi chimici, biologici ed immunologici.

ESPOSIZIONE AD ENDOTOSSINE BATTERICHE

Le endotossine batteriche, hanno rivestito notevole interesse poiché possono essere facilmente rilasciate in grandi quantità nelle polveri organiche, in forma di micro vescicole di 30-50 nm. Le endotossine sono presenti in diversi ambienti di lavoro e, qualora inalate, sono in grado di scatenare risposte infiammatorie acute e polmoniti tossiche dovute all'attivazione non specifica di macrofagi alveolari, con conseguente attivazione di citochine e altri mediatori.

Le endotossine passano in forma aerodispersa, durante la produzione e la manipolazione del materiale organico. Gli studi effettuati sulle endotossine hanno evidenziato concentrazioni rilevanti in settori occupazionali come quello della produzione primaria ed agricola (allevamenti animali, coltivazione e raccolta grano, cotone, patate, produzione di mangimi animali, macelli animali) ed in quei settori che trattano materiale organico come gli impianti di selezione e compostaggio, industrie di depurazione acque e fanghi, raccolta manuale di rifiuti, impianti di stoccaggio legna e compostaggio.

Alcuni studi in settori non professionali, sono stati condotti sull'esposizione a tali elementi biologici. In un report del 1998, venne studiata una comunità in Finlandia; più di 100 persone accusavano problemi respiratori. I ricercatori hanno evidenziato come l'acqua di un lago e del pubblico acquedotto, fosse contaminata da una concentrazione di 200-1000 ng/ml di endotossine; concentrazioni poi dimostratesi del tutto eccezionali. Successivi

Endotoxin concentrations in various occupational environments.

Source/ industry	Sampling method	No. of samples	Dust (mg/m ³)	Mean/median (range) (EU/m ³) ^a	Mea- sure
Grain					
Storage houses	Area	5	nd	170 000 (17 000–380 000)	MD
(grain/onions)	Personal	4	nd	56 000 (40 000–80 000)	MD
Silos/flour mill	Personal	31	4.4	1 150 (550–2 400)	GM
Silos containing corn	Area	15	3.3	983 (58–77 006) ^b	GM
	Area	14	1.0 ^c	526 (55–3 733) ^{b, c}	GM
Farms cultivating corn	Area	14	3.4	3 175 (499–54 653) ^b	GM
	Area	16	2.4 ^c	2 534 (284–29 266) ^{b, c}	GM
Poultry					
Catching/shackling	Personal	33	10.6	84 310 (53 130–133 860)	GM
Slaughterhouse, 2 sites	Area	10	nd	1 900 (0.2–9 400)	MD
(reindeer, poultry)	Personal	6	nd	870 (14–5 200)	MD
Waste					
Garbage handling	Area	8	nd	1 200 (9–14 000)	MD
	Personal	1	nd	2 600	S
Recycling	Personal	165	0–62	80 (2–1 980)	MD
Refuse-derived fuel	Personal	78	0.50	29 (5–346) ^b	GM
Waste collectors	Personal	47	0.58	39 (4–7 182) ^b	GM
Glass bottle recycling	Personal	182	0.18	3.6 (< 0.1–180) ^b	GM
(at point of sale)					

^a 1 endotoxin unit (EU)/m³ is approximately 0.1 ng/m³ endotoxin.

^b Levels reported in EU/m³ in the original reference. Remaining levels were calculated using a default conversion factor 10 (1 ng = 10 EU).

^c Measured in the respiratory fraction.

–: no information, AM: arithmetic mean, EU: endotoxin unit, GM: geometric mean, GSD: geometric standard deviation, MD: median, nd: not determined, R: range of means per site, S: single value.

Fonte: The Nordic Expert Group of Criteria Documentation of Health Risks from Chemicals and the Dutch Expert Committee on Occupational Safety. 144 Endotoxins 2011

studi hanno evidenziato come il 97% di endotossine vengono eliminate dai trattamenti di depurazione (Anderson WB, 2002).

Altri studi hanno osservato che la popolazione non lavorativa, è esposta a bassi livelli di endotossina e che le stesse siano corresponsabili della “sindrome dell'edificio malato” (Park JH 2000). Un altro interessante studio ha analizzato le PM₁₀ in 13 locations del South California (U.S.A.) rilevando sostanziali differenze tra le varie postazioni (Mueller-Annalin et al, 2004).

MECCANISMO DI AZIONE DELLE ENDOTOSSINE

Con il termine endotossine batteriche si intendono i lipopolisaccaridi (LPS) costituenti il foglietto lipidico esterno della membrana esterna

dei batteri Gram-negativi (Dragagna, 2004).

Le endotossine sono relativamente stabili al calore. La temperatura necessaria alla loro completa inattivazione è di 177°C. I LPS rimangono stabili a 121°C per almeno 1 ora (Anderson et al 2002, Hasday JD et al 1999).

La concentrazione di endotossine rilasciate può crescere a dismisura durante la morte della cellula (lisi cellulare o digestione da parte dei macrofagi); è noto

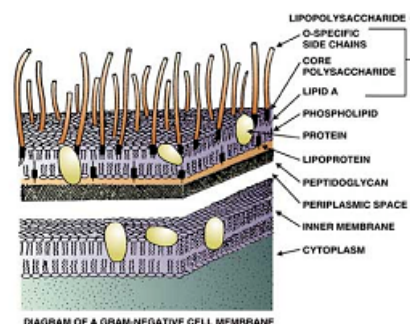
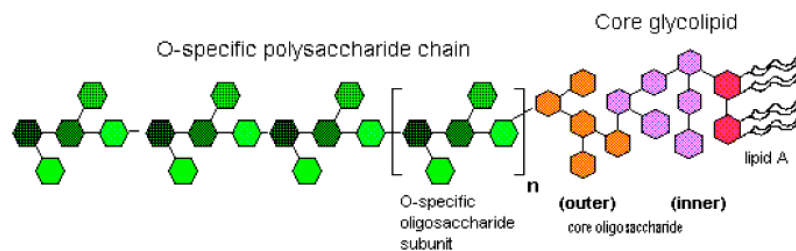


DIAGRAM OF A GRAM-NEGATIVE CELL MEMBRANE

Gram-negative bacterial endotoxin (lipopolysaccharide, LPS)



che una piccola quantità di tossine possono essere rilasciate in forma solubile in fase di crescita batterica, ma in via generale, la maggior parte dei LPS rimangono associati alla parete cellulare fino alla lisi della stessa.

I LPS sono costituiti da tre regioni: lipide A, Core R, Catena laterale O.

L'immunogenicità delle endotossine è associata ai componenti della catena laterale O, la quale contribuisce alla virulenza del microrganismo rendendolo resistente alla fagocitosi, proteggendolo dall'aggressione del complemento e degli anticorpi e generando una varietà di sierotipi che possono by-passare il sistema immunitario dell'ospite.

La tossicità delle endotossine è invece associata al lipide A; i LPS rilasciati nel sangue dai Gram- vanno a legarsi inizialmente con specifiche proteine dette LPS-binding proteins. Le LPS-binding proteins legate ai LPS interagiscono con i recettori CD14 dei monociti, dei macrofagi o delle cellule endoteliali. I recettori CD14 sono i principali siti di legame per i LPS e possono anche presentarsi in forma libera, nel comparto extra-cellulare (e quindi anche nel fluido alveolare).

I macrofagi alveolari e le cellule epiteliali tipo II, sono le principali

cellule stimulate dall'inalazione di endotossine, queste rispondono rilasciando nel sangue citochine, chemochine, favorendo adesioni molecolari e producendo prodotti che causano stati infiammatori a seguito dell'attivazione dei leucociti polimorfo nucleati (PMNs).

Quando le endotossine sono inglobate dai macrofagi alveolari, il fattore kappa B (NF-kB) attiva la produzione delle citochine infiammatorie come interleuchina (IL)-1 β , IL-6, IL-8 ed il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF α). La citochina IL-8 è la principale via che induce i PMNs a migrare nel polmone e l'elastasi neutrofila, prodotta dalla migrazione dei PMNs, è considerata essere il principale fattore che induce alla perdita di elasticità delle fibre del parenchima polmonare ed allo sviluppo di enfisema. L'elastasi è inoltre un potente stimolatore delle secrezioni mucose.

Normalmente le endotossine non passano attraverso il sistema sanguigno, tuttavia alcuni studi hanno dimostrato che nano particelle e nanobatteri possono interagire con un assorbimento sistemico (Hjelle et al, 2000). Le citochine prodotte e liberate nel sangue possono stimolare gli epatociti ed essere potenziali attivatori di proteine epatiche di fase acuta; in particolare sono state osservate elevate concentrazioni di proteine C-reattive e LPS-binding proteine

dopo l'esposizione ad endotossine aerodisperse nell'arco di 48 ore (Michel O. et al 1997).

L'iniziale attivazione del fattore di Hageman, coinvolto nella coagulazione del sangue, può inoltre innescare alcuni sistemi umorali con conseguente coagulazione disseminata intravascolare, emorragie interne e rilascio di bradichinina e altri peptici vasoattivi che causano shock ipotensivo (Prescott 1998).

Effetti sulla salute di tipo acuto, dopo l'inalazione di endotossina, sono: febbre, brividi, tosse secca, senso di costrizione toracica, dispnea, dolori articolari e sintomi simil-influenzali, tutti sintomi correlati all'inalazione di polveri organiche (sindrome tossica ODTS).

Studi epidemiologici su uomo e animali, suggeriscono che esposizione cronica ad endotossine può causare sintomi simili a bronchite cronica, asma e riduzione delle funzioni polmonari o infiammazioni croniche. La malattia oggetto di studio è la broncopneumopatia cronica ostruttiva (COPD).

Attualmente la reazione di Schwartzman, (danno tissutale citochine- dipendente), costituisce il modello per studiare gli effetti patologici dei LPS in vivo ed ha portato alla conclusione che il TNF (fattore di necrosi tumorale) è uno dei principali mediatori di tali effetti.

Numerosi studi sono presenti in letteratura, sia su persone che animali, per maggiori dettagli consiglio di visionare la documentazione del Dutch Committee on Occupational Safety reperibile sul sito osha.europa.eu.

TECNICHE E METODICHE DI CAMPIONAMENTO

Allo stato attuale le metodiche di campionamento ed analisi presenti in letteratura, non hanno portato ad un protocollo condiviso e generalmente accettato da tutti.

Il CEN (*technical committees 137 working group 5*), ha proposto delle indicazioni tecniche in merito alla questione, da cui sono derivate alcune norme tecniche di interesse:

UNI EN 13098, “*Linee guida per la misurazione di microorganismi e di endotossine aerodispersi*”, Luglio 2002.

UNI EN 14031:2005 *Atmosfera nell'ambiente di lavoro - Determinazione di endotossine in sospensione nell'aria*.

I lavori di produzione di standard tecnici, si sono fermati poiché nessun paese europeo ha accettato di sostenere le spese di segreteria dopo che la Svezia ha lasciato il coordinamento.

Spaan et al 2007, hanno proposto varie modifiche degli standard tecnici, ed il Dutch Expert Committee raccomanda di seguire tali modifiche.

In Italia l'UNICHIM ha istituito una commissione agenti biologici in ambienti di lavoro, mentre l'INAIL tramite il CONTARP (*Consulenza Tecnica Accertamento Rischi e Prevenzione*), ha avviato un protocollo di standardizzazione nel 2005, a livello nazionale, per l'accertamento dei livelli di contaminazione microbiologica nei comparti lavorativi di ogni tipo. L'ultima edizione (anno 2010) è disponibile on-line sul sito dell'INAIL e prende in considerazione vari metodi per il

campionamento microbiologico in genere, quali:

campionatori attivi (multistadio, monostadio, impatto ortogonale).

campionatori passivi (capsule Petri).

Campionamento su superfici (tamponi).

Ciò nonostante i campionatori attivi con convogliamento particellare su piastra, in presenza di alte cariche microbiche, possono portare a risultati sottostimati per fenomeni di aggregazioni microbiche; inoltre per evitare la disidratazione dei terreni nutritivi la durata del prelievo è breve, con conseguente flusso di aspirazione elevato. Solitamente tali campionatori sono impiegati per una valutazione quantitativa di batteri e miceti e non per la determinazione di endotossine. Lo stesso documento riporta in bibliografia le norme UNI EN precedentemente elencate, per la ricerca di endotossine batteriche.

In tale contesto è importante essere consapevoli, e la letteratura lo conferma, che le metodiche di campionamento ed analisi influiscono significativamente sul risultato finale.

Di seguito si vuole riportare una panoramica di alcuni degli studi effettuati, considerando le più recenti indicazioni tecniche, al solo fine orientativo nella scelta dei metodi da seguire.

La maggior degli studi, peraltro svolti in paesi esteri ed in vari settori professionali (allevamento, agricoltura, rifiuti ecc.), hanno scelto di determinare le endotossine a seguito di **campionamenti di polveri** (frazione inalabile, respirabile, polveri totali, PM10) o mediante **impinger** (prelievo di aria con gorgogliamento in soluzione

sterile). Allo stato attuale la soluzione che garantisce risultati migliori è il campionamento di polveri (frazione inalabile) con successiva estrazione in liquido (Dutch Expert Committee 2011)



Campionatore ad impatto ricircolante SAS PCR (Stephenson 2004).

Recenti indagini, effettuate sul territorio nazionale, per la determinazione delle endotossine, hanno impiegato un campionatore portatile di bioaerosol “SAS-pcr” con sistema di cattura in fluido, mediante impatto ricircolante, denominato Tunnel del vento a bassa velocità “LSWT”. L'aria aspirata dallo strumento ed il fluido di raccolta confluiscono congiuntamente attraverso un condotto a spirale e vengono convogliati in un recipiente di raccolta. Il liquido è mantenuto in costante ricircolazione per prolungare e favorire il contatto liquido/bioaerosol. Il principio è molto simile a quello dell'impinger, in cui i microrganismi sono tenuti in soluzione liquida. La strumentazione è automatica e programmabile in funzione del volume di aria che si vuole campionare.

Un confronto interessante tra campionamento di polveri ed impinger, viene riportato nella ricerca di autori italiani n. B/97-2/DIPIA/03 della Bioequal Srl in collaborazione con l'Università del Piemonte Orientale. La ricerca mostra nelle conclusioni

che il campionamento delle polveri (in particolare su filtri in fibra di vetro e a bassi flussi di aspirazione – 1 lt/min) è più efficiente rispetto all'impinger. Pochi al momento gli studi di confronto tra i due metodi, in particolare si segnalano Duchaine et al. (2001 - confronto in 7 granai ed 8 segherie) e Stephenson et al. (2004 – confronto tra vari metodi di campionamento).

Per quanto riguarda l'impinger esso si può associare sia a postazioni fisse che aspiratori personali sul corpo dei lavoratori; si sottolinea che la soluzione deve essere fatta gorgogliare a bassi flussi (1 lt/min) poiché evapora facilmente. L'utilizzo su campo dello strumento risulta poco pratico e la facile evaporazione delle soluzioni, utilizzate come mezzo di raccolta, limita sensibilmente la durata dei prelievi di aria (specialmente in periodi caldi).

Alcuni studi hanno analizzato come le differenze di stagione (inverno estate), non evidenziano differenze circa i livelli di endotossina (Opplinger et al.



Impinger in vetro

2005), tuttavia condizioni di umidità ambientale e frequenti aerosols causano intasamento dei filtri, l'uso dell'impinger potrebbe costituire una valida alternativa al campionamento su filtro (Contal et al. 2004).

IL CAMPIONAMENTO IN IMPIANTI DI TRATTAMENTO RIFIUTI

Innanzitutto è parere di chi scrive che l'analisi dei **fattori ambientali** e la scelta della **postazione di campionamento**, sono aspetti tanto importanti quanto il campionamento stesso; è infatti nei punti critici del processo lavorativo che deve essere effettuato il monitoraggio.

Il tecnico dovrebbe stilare un protocollo d'intervento a seguito di un sopralluogo preliminare, prendendo in considerazione varie criticità, come ad esempio i fattori ambientali che influiscono sui microrganismi e sul materiale particellare entro cui possono essere adesi, le sinergie con altri gruppi di agenti biologici, la possibilità che il lavoratore vi entri in contatto ed in che modo.

Indubbiamente concentrazioni significative di microrganismi è possibile rilevarle in siti ove avviene la degradazione della materia organica (aia di maturazione, cilindri biostabilizzatori ecc..) o dove viene manipolato e stoccato il compost (locali di carico mezzi ecc..), inoltre la presenza di fattori ambientali come vicinanza a corsi di acqua, alberi e fogliame possono aumentare la concentrazione di microrganismi aerodispersi (Daniel Hryhorczuk et Al. 2001).

Altro aspetto da tenere in considerazione è l'attività dell'impianto. Uno studio (Jager et al. 1994), ha dimostrato che i batteri presenti nell'aria durante la triturazione del compost variavano da 21.201 - 84.806 CFU/m³, rispetto a 1.979-3.869 con impianto fermo e 495-1.312 CFU/m³ in zone limitrofe all'impianto.

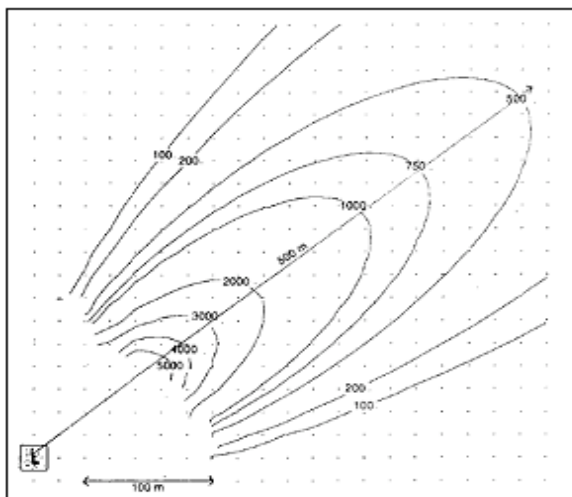
Studi in impianti di depurazione delle acque, hanno evidenziato che livelli elevati di endotossine erano associati al processo di rimescolamento delle acque o dei fanghi (Thorn et al. 2002).

Altri fattori importanti sono la presenza di vento e la conformazione del territorio ove è ubicato il sito. Uno studio condotto dal dipartimento di Salute di New York nel West Islip, ha analizzato alcuni siti intorno ad un impianto di compostaggio. I risultati hanno mostrato analoghe concentrazioni di spore, *Aspergillus* e *Actinomiceti* fino a 8 km dalla struttura (Boehler et al. 1994).

Un altro studio ha portato all'applicazione di un modello matematico per determinare la dispersione degli inquinanti aerei (Danneberg, et al 1997), ipotizzando una dispersione di microrganismi. Tale modello viene riportato nelle istruzioni tecniche del Ministero dell'Ambiente Tedesco (TA-LUFT). Ad oggi i risultati applicativi di tale modello devono ancora essere esaminati.

Per la scelta della **linea di campionamento** possono essere utilizzate sia pompe portatili (Thorne et al. 2002; Simpson et al. 1999, Thorne et al. 2001, Zock et al 1995, Liesivuori et al. 1994) che campionatori fissi, sebbene questi ultimi siano utilizzati più di frequente (anche contemporaneamente a quelli personali).

Entrambi possono essere associati a porta-filtri conici metallici GSP per l'alloggiamento di filtri da 37 mm, in linea con le disposizioni per il campionamento della frazione inalabile delle polveri (EN 481 ecc..).



Predizione della dispersione di microrganismi applicando il modello matematico in accordo con le TA-LUFT (Danneberg, et al 1997).

Il campionamento in postazione fissa si svolge solitamente ad un'altezza di 1,5 mt da terra.

Il **flusso di campionamento** può variare da 1 a 4 l/min per campionamenti personali di polveri o 15 l/min per il campionamento di polveri totali. Secondo lo studio B/97-2/DIPIA/03, sembra che la capacità di recuperare le endotossine possa essere aumentata effettuando il campionamento ad un basso flusso (1 lt/min), tale ipotesi deve essere verificata con ulteriori studi di comparazione.

Le indagini più recenti hanno impiegato un flusso di campionamento di 3,5 lt/min per il campionamento della frazione inalabile delle polveri, sia in postazione fissa che portatile (Spaan et al, 2008).

Durante il campionamento è buona norma includere un bianco di campo.

Prima della scelta del flusso di campionamento, è necessario fare una precisazione; è parere di chi scrive che il campionamento debba essere effettuato prendendo

in considerazione un turno lavorativo (6-8 ore) o quanto meno un periodo di tempo rappresentativo, in modo da ottenere risultati ponderati in funzione delle variabili ambientali.

I filtri per il campionamento, sono stati scelti in vario materiale: PVC (Mahar et al 1999, Dutkiewicz et al 1989), cellulosa (Breum et al. 1997), fibra di vetro, teflon, policarbonato (Nielsen et al 1998, Chang et al 2001) e filtri Isopore (Thorne et al. 1998, Thorne et al. 2002, Thorne et al. 2001).

La tipologia maggiormente utilizzata è quella dei filtri in fibra di vetro perché sembrano avere dei recuperi maggiori così come riportato in studi di confronto tra diversi filtri (Darragh et al. 1997, Laitinen et al. 1994, Tongeren et al. 1997, Hollander et al 1993, Simpson et al. 1999, Thorne et al. 2003, Chang et al. 2001; Zock et al 1995).

Al termine del campionamento i filtri devono stoccati e trasportati ad una T° di -18°C prima dell'estrazione in laboratorio.

I filtri devono essere trattati e sterilizzati prima dell'utilizzo in campo; in particolare considerando i filtri in fibra di vetro alcuni autori consigliano di trattare gli stessi a 180°C per almeno 4 ore o 210°C per 60 min.

Per la determinazione gravimetrica delle polveri, i filtri devono essere pesati prima e dopo l'uso con una bilancia analitica e in condizioni controllate di temperatura ed umidità (in accordo con le disposizioni UNI EN).

Per l'estrazione delle endotossine dal filtro impiegato per il campionamento, non esiste un metodo standard. Molti laboratori utilizzano per lavare il filtro acqua apirogena o tamponi come TRIS e tretilamina fosfato (pH 7,5) con o senza soluzione detergenti come Tween 20, Tween 80, Triton X-100 o saporina (5-10 ml ca.). Gli studi di Morris et al. 1988, hanno dimostrato che l'estrazione con acqua è molto variabile se confrontata con l'utilizzo di soluzioni detergenti (Tween). La maggior parte degli studi ha però mostrato come l'aggiunta del Tween alla soluzione di estrazione ha migliorato l'efficienza dell'estrazione stessa; l'uso di tamponi o soluzioni disperdenti facilita lo svolgimento del LAL test (test per la determinazione delle endotossine).

Il Dutch Expert Committee 2011, consiglia di utilizzare una soluzione detergente (es. Tween), mentre l'analisi dovrebbe essere effettuata in acqua apirogena, per diminuire la potenziale interferenza con il diluente. Per vari settori industriali, sono stati osservati effetti sistemici dipendenti dalle diverse procedure, probabilmente per

differenze legate alla matrice campionata. La Commissione raccomanda di adottare le modifiche proposte da Spaan et al. 2007.

L'estrazione viene generalmente effettuata mediante agitatore e/o per sonicazione dei filtri con durate e temperature di estrazioni variabili (più comunemente 1h a T ambiente). Per maggiori dettagli vedi Rylander's (1982), Millner (1987) e Olenchok (1983), Fisher and Foarde (1987), Spaan (2008).

La determinazione utilizzata nella maggior parte degli studi per rilevare e quantificare le endotossine, ha visto applicare il LAL test che utilizza il lisato degli amebociti del granchio a ferro di cavallo (*Limulus Polyphemus*). Il metodo maggiormente utilizzato e sicuramente più sensibile è stato il Quantitative Kinetic Chromogenic LAL (Douews et al. 1995, Van Tongeren et al. Breum et al 1997, Darragh et al 1997, Thorn et al. 2002, Chang et al. 2001, Spaan et al.2008), sebbene vengano utilizzati anche il Chromogenic end point LAL, il *Limulus* gel clot assay ed il Kinetic Turbidimetric.

Da una ricerca bibliografica sugli studi fatti, è stata evidenziata la capacità del (1,3)- β -D-Glucano (di origine fungina) di poter influire sul LAL test. Tali elementi possono causare l'attivazione della cascata di reazioni caratteristica del LAL test, determinando quindi una sovrastima dell'effetto imputabile alle endotossine (Zhang et. Al 1991, Hodes et al. 1987).

Lo studio italiano B/97-2/DIPIA/03 ha scelto di impiegare il LAL test senza l'utilizzo di un β bloccante

(sostanza che inibisce l'effetto dei β -Glucani) per rilevare l'effetto complessivo; inoltre sia le endotossine che i β -Glucani, provocano simili reazioni tossiche e pertanto individuare l'effetto combinato di tali elementi è stato ritenuto opportuno in quel contesto.

Il Dutch Expert Committee on Occupational Safety 2011, raccomanda di misurare le endotossine, usando la più recente versione del LAL-TEST (NEN-EN 14031 procedura con regolazioni, studio Spaan et al. 2007), per non sottostimare l'esposizione.

LIMITI OCCUPAZIONALI PROPOSTI

Come precedentemente detto, la più recente documentazione al riguardo è stata emanata dal Nordic expert group and Dutch DECOS nel 2011, andando ad integrare la precedente documentazione del 1998. Il documento è stato redatto dalle autorità olandesi, svedesi e norvegesi e stabilisce criteri di valutazione supportati dai dati scientifici più avanzati al momento. Dal documento emerge

quanto segue:

Gli effetti critici, dovuti all'esposizione e inalazione di endotossine, compromettono la funzionalità respiratoria polmonare. I dati indicano che effetti non avversi della funzionalità respiratoria (FEV1), nel lungo termine, sono riscontrabili entro valori di 90 EU/m³ (9 ng/m³) di endotossine aerodisperse (EU=Unità Endotossiche). La diminuzione del FEV1 dopo 40 anni di esposizione, entro valori di 90 EU/m³, è stato calcolato essere di ca. 120 ml ed è considerato come un effetto non-avverso.

In 25 operatori ecologici è stato osservata una significativa diminuzione del FEV1 il giovedì della settimana lavorativa, rispetto ai valori del lunedì. Campionamenti personali hanno evidenziato livelli di endotossina di 13 EU/m³ contestualmente ad esposizione a batteri ($1.2 \times 10^6/\text{m}^3$) e spore di funghi ($4 \times 10^5/\text{m}^3$), Heldal KK et al 2003.

In Olanda, allo scopo di definire concentrazioni massime ammissibili di endotossine è stato redatto un report nel 1998 nel quale veniva stabilito come limite raccomandato quello di 50 EU/m³ (5 ng/m³).

Biological effects caused by acute/short-term endotoxin occupational exposure.

Study design/ population	Work history	Endotoxin level	Parameters measured	Effects
4-day follow-up, cotton workers, n=25 controls, n=9 (scientists)	>8 yrs	Range 1-400 EU/m ³ (0.1-40 ng/m ³)	<i>Blood:</i> CD14 receptor on monocytes	CD14 \uparrow at the end of the 1st day, but back to normal at the end of the week.
1-week follow-up, domestic waste collectors, n=47 controls, n=15 (office workers)	5 yrs	GM (range) 39 (4-718) EU/m ³ (3.9 (0.4-718) ng/m ³)	<i>NAL:</i> IL-6, IL- 8, IL-1 β , TNF α , cell counts and differentials. <i>Serum:</i> IgE	IL-8 \uparrow (1.8 \times) and total cell \uparrow (3.3 \times) at the end of the week.
4-day follow-up, waste handlers, n=31 no controls	1.5 yrs	Median (range) 13 (4-183) EU/m ³ (1.3 (0.4-18.3) ng/m ³)	<i>NAL:</i> MPO, ECP, IL-8, cell counts and differentials	ECP \uparrow (1.8 \times) and % PMNs \uparrow (1.6 \times) at the end of the week.

ECP: eosinophilic cationic protein, EU: endotoxin unit, GM: geometric mean, Ig: immunoglobulin, IL: interleukin, MPO: myeloperoxidase, NAL: nasal lavage, PMN: polymorphonuclear leukocyte, i.e. neutrophil, TNF α : tumour necrosis factor alpha.

Fonte: The Nordic Expert Group of Criteria Documentation of Health Risks from Chemicals and the Dutch Expert Committee on Occupational Safety. 144 Endotoxins 2011

CONCLUSIONI

Al momento non esistono dubbi sulla correlazione tra endotossine e malattie polmonari, tuttavia è necessario ricercare ulteriori evidenze per determinare gli effetti dose-risposta in maniera più specifica. Sono ancora poche le evidenze scientifiche sui possibili effetti cancerogeni o sulla popolazione sensibile.

E' necessario svolgere maggiori studi su varie attività produttive, non solo quelle che trattano rifiuti. Sarebbe interessante verificare anche l'impatto sulla popolazione non professionale e/o in zone limitrofe ad impianti trattamento rifiuti, depurazione e trattamento acque ecc..

E' necessario stabilire a livello internazionale un protocollo riconosciuto e condiviso, per il campionamento e l'analisi delle endotossine, nonché limiti occupazionali.

Ritengo sia compito dei professionisti che svolgono attività di prevenzione, quello di studiare i rischi emergenti anche e soprattutto attraverso la collaborazione e la condivisione dei risultati e degli studi fatti, affinché le proprie conoscenze siano messe al servizio della collettività e non del singolo.

In tale ottica il Tecnico Della Prevenzione deve far sentire la propria voce, implementando le proprie competenze tecniche e promuovendo studi e ricerche scientifiche; solo così si potrà dar luce alla figura del T.D.P. ancora troppo poco conosciuta e spesso vista con funzioni repressive.

BIBLIOGRAFIA

UNI EN 13098, "Linee guida per la misurazione di microorganismi e di endotossine aerodispersi", Luglio 2002.

UNI EN 14031:2005 *Atmosfera nell'ambiente di lavoro - Determinazione di endotossine in sospensione nell'aria.*

The Nordic Expert Group for Criteria Documentation of Health Risks from Chemicals and the Dutch Expert Committee on Occupational Safety 144. Endotoxins

Dutch Expert Committee on Occupational Standards (DECOS). Endotoxins. Rijswijk: Health Council of the Netherlands; 1998: publication no. 1998/03WGD.

Daniel Hryhorczuk 1, 2, 6, Luke Curtis1, Peter Scheff 1, 2, 3, Joseph Chung4, Michael Rizzo 3,

Cynthia Lewis5, Niko Keys6, Mike Mooney 7 Boehler W, Browne M, Cava A Haines J, Hill K, Horn E, Ju C, Kallenback L, Melius J, Racer G, Sysdek L, Garcy T, Guastefeste A,

Robbins G, Gillis S, Hill D, Tessitore R, Van Hook S, Graham S,

Santoriello M, Leith A, Marko M, Cardamone A, Gadon M, Gensburg L ,

Department of Health and the Town of West Islip, New York, March 1994.

Marth E, Reinthaler F, Haas D, Eibel U, Feierl G, Wendelin I, Jelovcan S, Barth S: Abfallwirtschaft-Gesundheit: Eine Longitudinalstudie. Schriftenr Vereins Wasser Boden Luft Hyg 1999, 104, 569-583.

Schappler-Scheele B: Arbeitsschutz in biologischen Abfallbehandlungslangen aus arbeitsmedizinischer Sicht. Schriftenr Vereins Wasser Boden Luft Hyg 1999, 104, 585-596.

Schappler-Scheele, Schurman W, Hartung J, Missel J, Benning C, Schroeder H, Lieber J: Untersuchung der gesundheitlichen Gefährdung von Arbeitnehmern der Abfallwirtschaft in Kompostierungsanlagen.

Schriftenreihe Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin 1998, 21, 11.

Jager E, Ruden H, Zeschmar-Lahl B: Kompostierungsanlagen 2.

Mitteilung: Aerogene Keimbelastung an verschiedenen Arbeitsbereichen von Kompostierungsanlagen. Zentralblatt Hyg Umweltmed 1994, 196, 367- 379.

Rylander R: Endotoxins. In: Rylander R, Jacobs RR (Eds): Organic Dusts: Exposure, Effects and Prevention. Lewis Publishers,

Boca Raton, Florida, USA 1994. 14. Sama SR, Kriebel D, Woskie

Thorn J, Beijer L, Jonsson T, Rylander R: Measurement strategies for the determination of airborne bacterial endotoxin in sewage treatment plants. Ann Occup Hyg 2002, 46, 549-554.

Oppliger A, Hilftker S, Vu Duc T: Influence of seasons and sampling strategy on assessment of bioaerosols in sewage treatment plants in

Switzerland. Ann Occup Hyg 2005, 49, 393-400

Contal P, Simao J, Thomas D, Frising T, Callé S, Appert-Collin JC, Bémer D: Clogging of filters by submicron droplets. Phenomena and influence of operating conditions. J Aerosol Sci 2004, 35, 263-278.

Michel O, Nagy AM, Schroeven M, Duchateau J, Neve J, Fondu P, Sergysels R. Dose-response relationship to inhaled endotoxin in normal subjects. Am J Respir Crit Care Med 1997;156:1157-1164.

Liebers V, Raulf-Heimsoth M, Linsel G, Goldscheid N, Duser M, Stübel H, Brüning T. Evaluation of quantification methods of occupational endotoxin exposure. J Toxicol Environ Health A 2007;70:1798-1805.

Spaan S, Doeke G, Heederik D, Thorne PS, Wouters IM. Effect of extraction and assay media on analysis of airborne endotoxin. Appl Environ Microbiol 2008;74:3804-3811.

Spaan S, Heederik DJ, Thorne PS, Wouters IM. Optimization of airborne endotoxin exposure assessment: effects of filter type, transport conditions, extraction solutions, and storage of samples and extracts. Appl Environ Microbiol 2007;73:6134-6143.

SITOGRAFIA

www.dgmp.eu

www.inail.it

www.vdi.eu

www.ohsas.eu