

Analisi del carico polmonare di fibre di amianto: problematiche di laboratorio e potenzialità conoscitive

Anna Benedetta Somigliana

Centro regionale di Microscopia Elettronica - ARPA Lombardia

Pietro Gino Barbieri

Già Direttore UOPSAL ATS Brescia

SOMMARIO

- **Parte prima**: le analisi per la determinazione del carico polmonare di corpuscoli e fibre di amianto:
 - Metodo ISTISAN 17/12 – CORPUSCOLI DELL'ASBESTO
 - L'ANALISI DELLE FIBRE NEL TESSUTO POLMONARE
 - LA VALIDAZIONE DEI METODI
 - L'ACCREDITAMENTO COME GARANZIA DI QUALITA'
- **Parte seconda**: POTENZIALITA' CONOSCITIVE dell'analisi attraverso alcuni esempi tratti dall'esperienza del Servizio PSAL ASL di Brescia.

Una collaborazione iniziata nel **1998**

DGR 6/36262 del 1998 vengono approvate le Linee Guida per la Gestione del Rischio Amianto

...

Viene istituito il **Registro Regionale Mesoteliomi**

Viene assegnato il compito al **Centro Regionale di Microscopia Elettronica** di eseguire le analisi del **tessuto polmonare dei casi inviati dal registro regionale mesoteliomi**.

L'analisi nei tessuti biologici: LE TECNICHE in Letteratura

Le analisi di supporto ad una **valutazione medico legale** sono:

CORPUSCOLI DELL'ASBESTO



Tessuto polmonare
BAL
Escreato

FIBRE DI AMIANTO



Tessuto polmonare

NUMEROSE METODICHE DIVERSE sia per l'analisi delle fibre che per l'analisi dei corpuscoli

Digestione del tessuto:

- Digestione chimica: ipoclorito, KOH, enzimi....
- Plasma asher
- Tecniche miste

Espressione del risultato:

- Fibre per grammo di tessuto secco o umido
- Corpuscoli per grammo di tessuto secco o umido

Regole di conteggio:

- Conteggio corpuscoli dell'asbesto
- Conteggio di tutte le fibre
- Conteggio delle fibre $> 1 \mu\text{m}$
- Conteggio delle fibre $> 5 \mu\text{m}$

Strumento di misura:

- SEM
- TEM
- MOCF



**RISULTATI
NON
CONFRONTABILI**

L'analisi nei tessuti biologici: LE TECNICHE in Letteratura

L'indicazione



Definire dei **valori di riferimento interni** per ogni laboratorio per la **classificazione degli esposti**

Soluzione estremamente diplomatica ma ...
presenta diversi problemi:

- 1) Come si definiscono **valori di riferimento interni** per gli esposti?
- 2) **Quante analisi** sono necessarie per avere una casistica soddisfacente?
- 3) Come ci si regola quando invece i confronti sono obbligati (**le aule di tribunale**)

E alla fine controproducente perché ha **OSTACOLATO** un percorso di **STANDARDIZZAZIONE** delle metodiche analitiche

CORPUSCOLI DELL'ASBESTO: IL METODO ISTISAN17/12

- IL **GRUPPO BIOFIBRE**: è nato nel 2010 per volontà del Dr. Stefano Silvestri, su mandato del gruppo di studio nazionale sull'amianto del Ministero della Salute

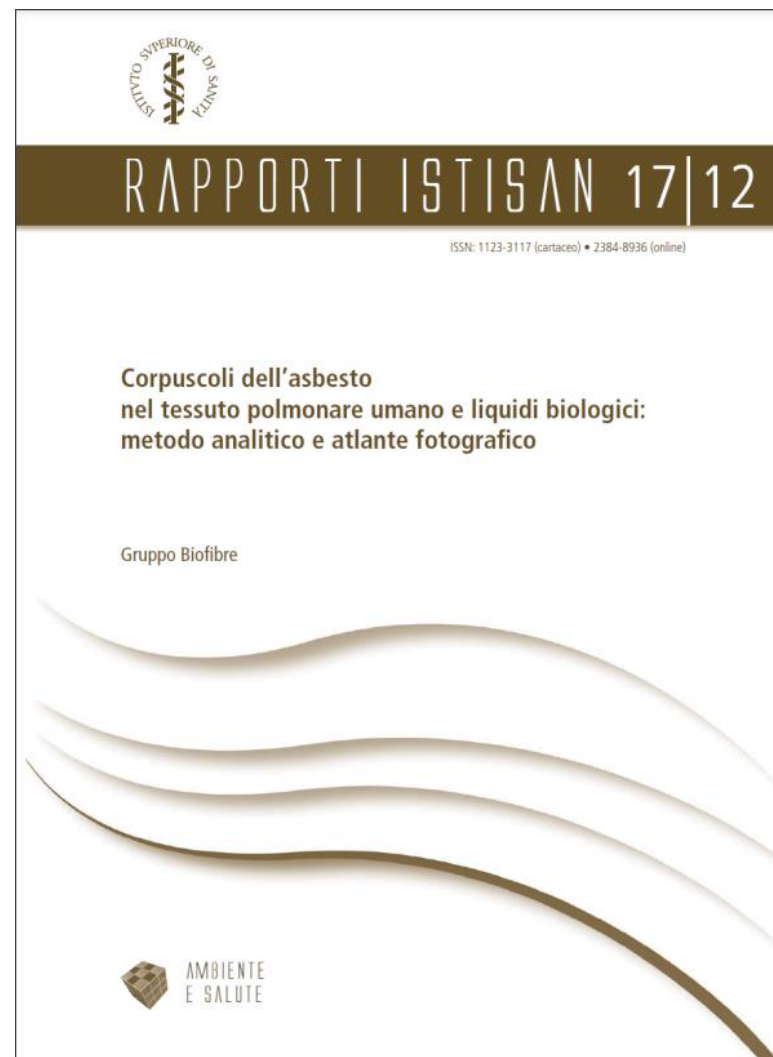
Uno dei compiti: **regole condivise a livello nazionale per l'analisi delle fibre e dei corpuscoli dell'asbesto nel tessuto polmonare.**

Il metodo **NON rappresenta una rivoluzione nel campo** ma pone attenzione su **PUNTI** fondamentali e indispensabili per eseguire analisi solide, spesso trascurati.

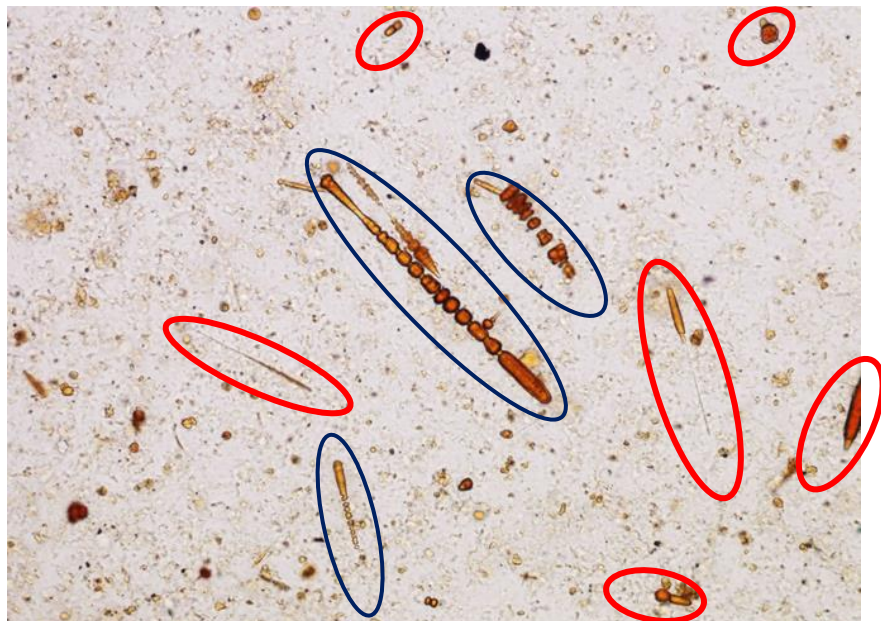
Un metodo analitico **VALIDATO**



- 1) Essere in grado di fornire un **risultato «ESATTO»**
- 2) Esser in grado di associare una **incertezza di misura** al risultato



IL METODO ISTISAN17/12: Com'è un corpuscolo dell'asbesto



Il colore dal **giallo chiaro** al **rosso mattone**

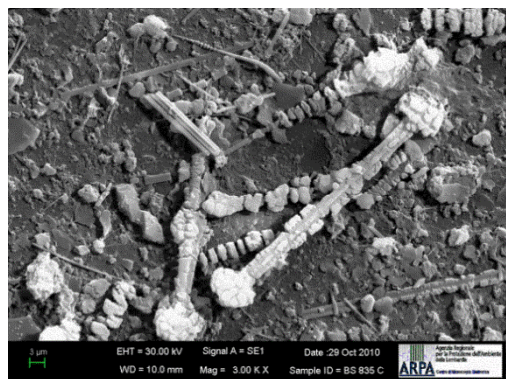
Il rivestimento può apparire **frammentato (a collana)**

In genere il rivestimento presenta **margini regolari lisci** ed è tendenzialmente **simmetrico** lungo l'asse longitudinale della fibra.

La lunghezza **da alcuni μm** a diverse centinaia di μm .

Il rivestimento può essere **solo su un estremo della fibra**

La fibra interna appare **chiara in campo chiaro** o **appena visibile sfocchettando**

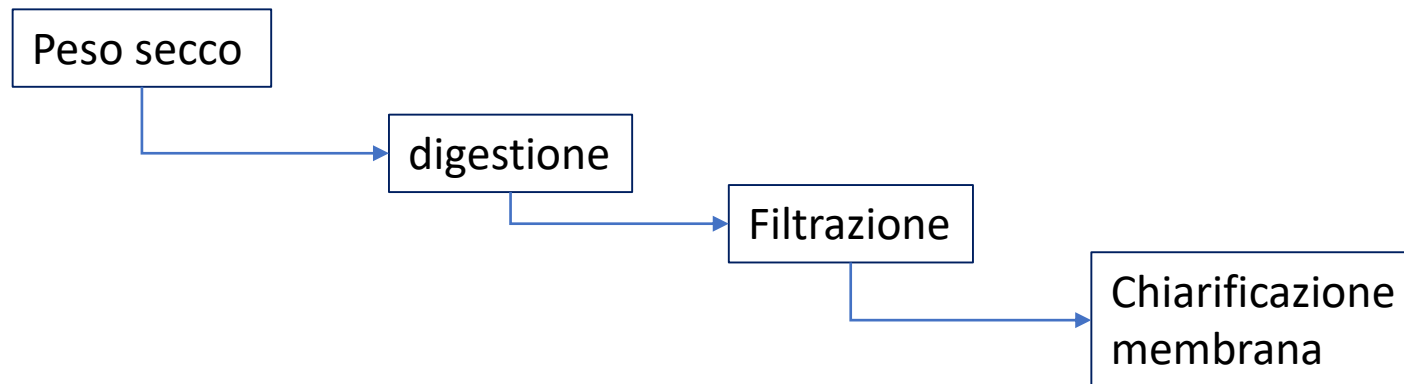


**forme
bizzarre
addensamenti
sferoidali**

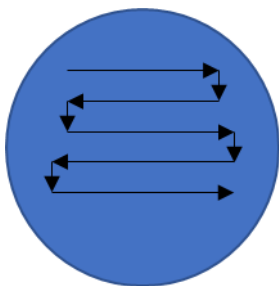
IL METODO ISTISAN17/12: Il campionamento e preparativa

- L'analisi deve essere effettuata su campioni di **parenchima polmonare sano conservato in FORMALINA** (intervento chirurgico o da autopsia). Con cautela possono essere utilizzati campioni in paraffina.
- **Campionamento rappresentativo (se realizzabile)**
- Il metodo di analisi può essere utilizzato anche **per il conteggio del corpuscoli dell'asbesto in liquidi biologici**

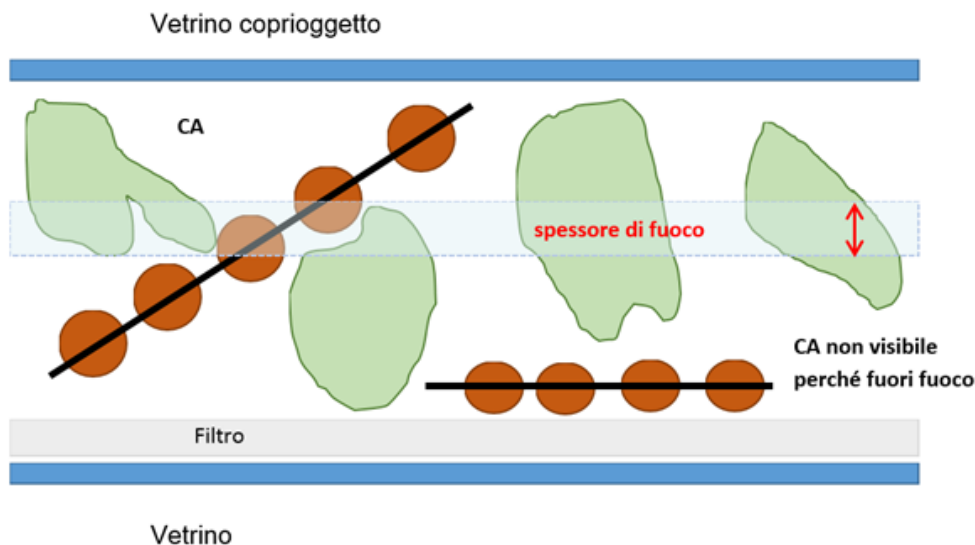
PREPARATIVA: LE FASI



IL METODO ISTISAN17/12: l'analisi in MICROSCOPIA OTTICA



- Ingrandimento di analisi elevato **400X-500X**
- Analisi in **Campo Chiaro**
- Percorso a greca con **scelta casuale dei campi di lettura**
- Lettura per **campi fissi**
- L'analisi continua finchè non conto **50 corpuscoli** o finchè non conto il n. di campi che mi garantiscono un **LOD adeguato (<1000 corpuscoli/g s.s.)**



IL METODO ISTISAN17/12: l'espressione del risultato

| | |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Analisi | <ul style="list-style-type: none"> • Ingrandimento di analisi elevato 400X-500X • Analisi in Campo Chiaro • Percorso a greca con scelta casuale dei campi di lettura – campi fissi sfocchettando tutto lo spessore |
| Espressione del risultato | $C_{CORP} \text{ (CORP/g secco)} = N_{CORP} \times \frac{1}{a \times Nc} \times A \times \frac{1}{P_{TS}}$ <p>Dove:</p> <p>N_{CORP} = numero di corpuscoli totali trovati nell'analisi, a = area del singolo campo all'ingrandimento di analisi determinata con vetrino micrometrico (mm²), Nc = Numero di campi letti, A = area effettiva del filtro (dipende dal sistema di filtrazione usato –mm²), P_{TS} = peso secco del campione sottoposto a preparazione (g)</p> <p>Se durante l'analisi non viene visto nemmeno 1 corpuscolo, ovvero se $N_{CORP} = 0$, allora il risultato sarà dato da:</p> <p style="text-align: center;">$C_{CORP} < LOD$</p> <p style="text-align: center;">$C_{CORP} \text{ (CORP/g secco)} < LOD = 2.99 \times \frac{1}{a \times Nc} \times \frac{A}{P_{TS}}$</p> <p style="text-align: right;">Il valore «vero» al 95% è compreso tra 0 e il LOD</p> |

IL METODO ISTISAN17/12: il LOD

Il risultato 0 (zero) NON ESISTE !!!!!


FONDAMENTALE:

Quando si esegue una QUALSIASI analisi è **NECESSARIO SEMPRE** conoscere qual è la **CONCENTRAZIONE MINIMA DI ANALITA CHE SI PUO' RILEVARE (LOD)**

Il LOD deve essere compatibile con il valore di riferimento con cui devo confrontare il mio risultato

| 500X | A | a | PTS | Nc | LOD (C/g.s.) |
|----------|-----|-------|------|-----|--------------|
| CI | 222 | 0,125 | 0,05 | 150 | 700 |
| CI | 222 | 0,125 | 0,02 | 380 | 700 |
| D 200 µm | 222 | 0,031 | 0,05 | 600 | 700 |
| D 200 µm | 222 | 0,031 | 0,05 | 150 | 3000 |

NON
adeguato
VR=1000



IL METODO ISTISAN17/12: la VALIDAZIONE

- Necessità di un **CAMPIONE DI RIFERIMENTO CERTIFICATO (CRM)** che non esiste
- Necessità di **laboratori che analizzano il CRM**.

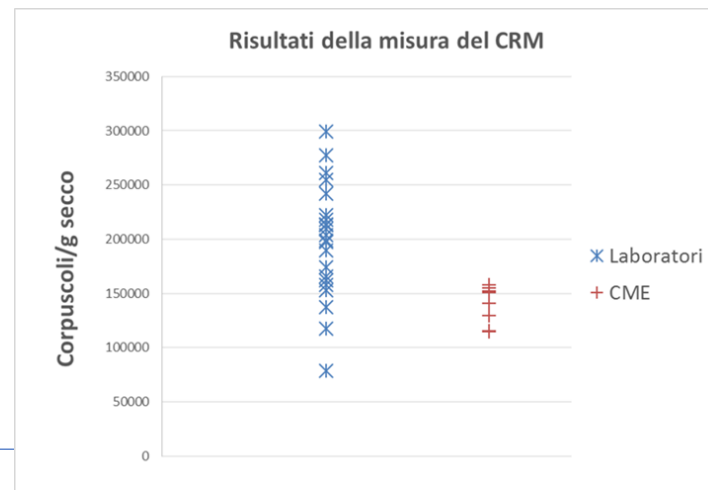
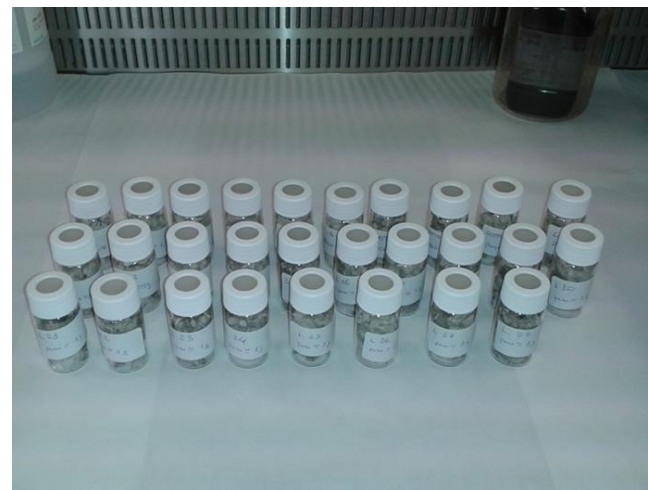
Se il campione di riferimento non c'è, lo si realizza:

- 400 g di tessuto polmonare
- Il campione è stato lavato per 24 ore in acqua bidistillata e omogeneizzato
- liofilizzazione

In tutto sono stati fatti 28 contenitori numerati da 1 a 28 da circa 1g.

- Distribuito a **10 laboratori**
- Analisi secondo la metodica indicata
- Ogni laboratorio ha fornito **2 risultati**.

I risultati rielaborati secondo la **Norma ISO 13528: 2005**



FIBRE DI AMIANTO: METODO INTERNO

**NON ESISTE UN METODO
DI RIFERIMENTO VALIDATO**

PREDISPORRE UN METODO INTERNO

**ESEGUIRE LA VALIDAZIONE CON UN
CAMPIONE DI RIFERIMENTO
CERTIFICATO: CRM**

ESATTEZZA

| | | | | | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|--|----------------------------------------------------|-----|-----|-----|
|  AGENZIA REGIONALE PER LA PROTEZIONE DELL'AMBIENTE | Settore Laboratori U.O. Laboratorio di Milano - Sede di via Juvara | | METODO DI PROVA | | | |
| | | | Cod.: | MT. | M1. | 905 |
| | | | Revisione: 2 | | | |
| | | | Data emissione: Vedi cartiglio in ultima pagina | | | |
| | Centro di Microscopia Elettronica | | Pagina 1 di 15 | | | |
| ANALISI CONTENUTO DI FIBRE DI AMIANTO NEL TESSUTO POLMONARE | | | | | | |

INDICE

| | | |
|------|----------------------------------------------------------------|----|
| 1. | SCOPO | 3 |
| 2. | PRINCIPIO DEL METODO | 3 |
| 3. | CAMPO DI APPLICAZIONE | 3 |
| 4. | INTERFERENZE | 3 |
| 5. | CLASSIFICAZIONE | 4 |
| 6. | ACCESSORI | 4 |
| 7. | REAGENTI | 4 |
| 8. | STRUMENTAZIONE | 5 |
| 9. | PROCEDIMENTO | 5 |
| 9.1 | Condizioni ambientali | 5 |
| 9.2 | Preparazione | 5 |
| 9.3 | Preliminari | 8 |
| 9.4 | Condizioni operative | 9 |
| 9.5 | Analisi | 10 |
| 10. | TARATURA | 11 |
| 10.1 | Frequenza di taratura della strumentazione | 11 |
| 11. | CONTROLLO QUALITA' | 11 |
| 12. | CALCOLI ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI | 11 |
| 13. | QUALITA' DEL METODO | 12 |
| 13.1 | Incertezza | 12 |
| 13.1 | Linearità, sensibilità analitica (SA) e campo di applicabilità | 13 |
| 13.2 | Limite di rilevabilità (LOD o DL) | 13 |
| 13.3 | Esattezza | 14 |
| 13.5 | Robustezza | 14 |
| 14. | SICUREZZA: AVVERTENZE E PRECAUZIONI | 14 |
| 15. | RIFERIMENTI | 15 |

FIBRE DI AMIANTO: cosa ci può dire la misura del carico polmonare

INPUT: spesso incognito in modalità, tipo, tenore, durata, intensità ...

ESPOSIZIONE

Si può verificare
in **moltissimi**
modi possibili

Nascita

Decesso

OUTPUT: frantumazione, migrazione, dilavaggio, fagocitosi,
VARIABILITA' INDIVIDUALE

Carico
Polmonare

Risultato della misura

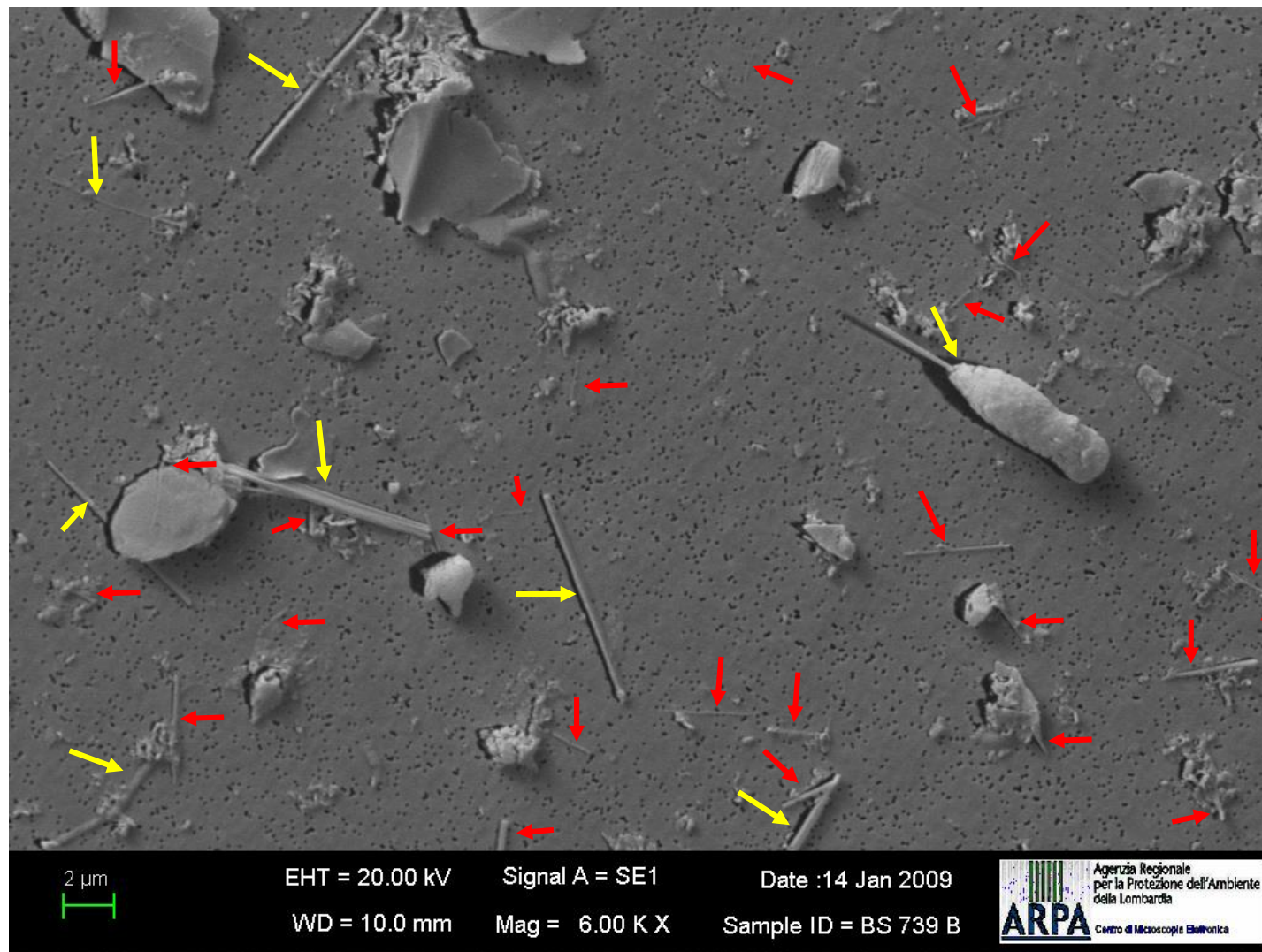
La misura ci dice:

1. **Se c'è stata una esposizione**, ma non come si è protratta nel tempo
2. **Che tipo di fibre sono state respirate** (gruppo mineralogico)

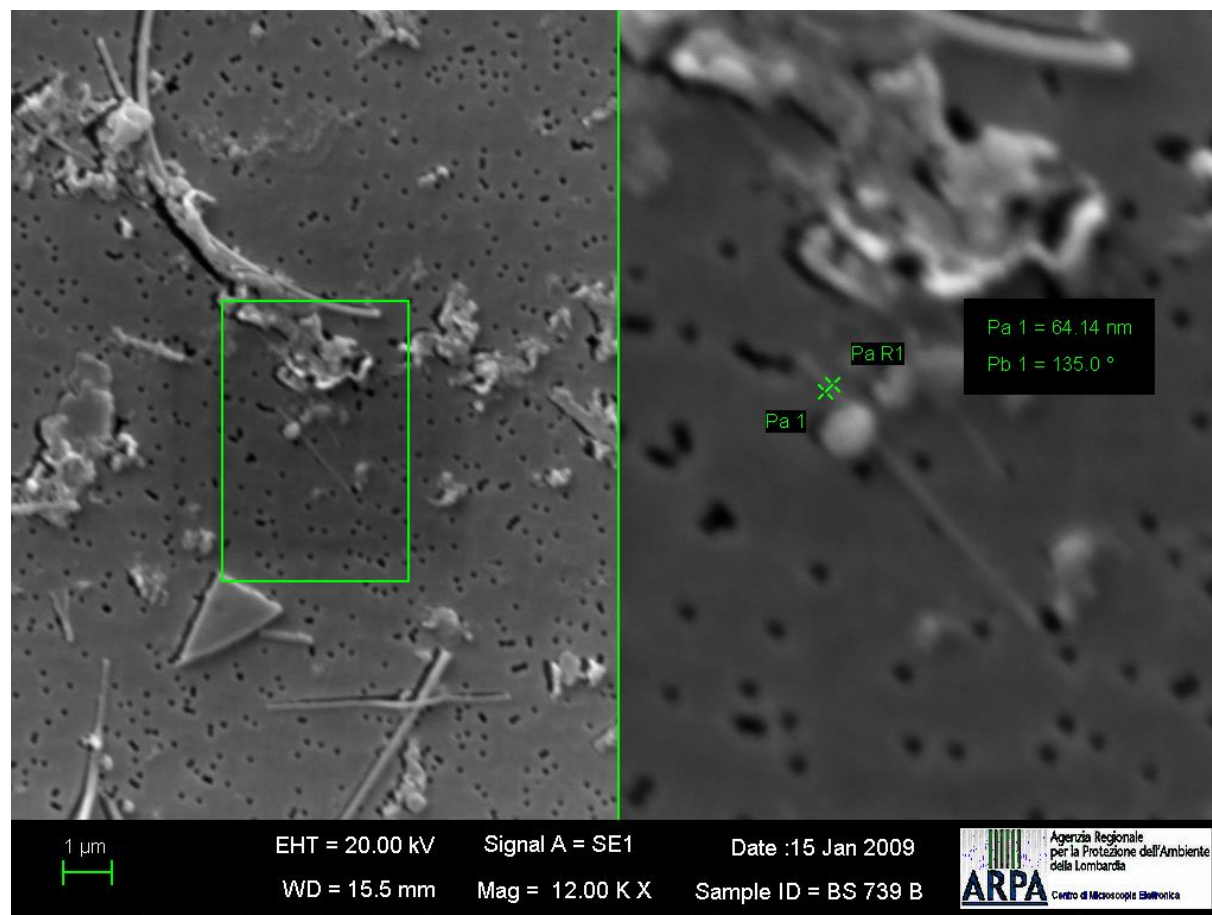
Tempo

ATTENZIONE Un risultato negativo **NON esclude** una pregressa esposizione (problema del crisotilo)

FIBRE DI AMIANTO: fibre di amianto $\geq 1 \mu\text{m}$ VS $\geq 5 \mu\text{m}$



FIBRE DI AMIANTO: QUALI?



Qualunque sia la scelta

$\geq 1 \mu\text{m}$

$\geq 5 \mu\text{m}$

Il problema non è vedere le fibre, **ma vedere TUTTE le fibre** presenti nel campo

ANCHE LE PIU' SOTTILI

È necessario condurre l'analisi ad ingrandimento **ELEVATO (5000X)**

Per evitare una sottostima del risultato

FIBRE DI AMIANTO: La validazione

Fibre con lunghezza:

$\geq 1 \mu\text{m}$

Esistono 2 campioni di riferimento di tessuto polmonare umano liofilizzato certificati per il contenuto di fibre di **amianto** $\geq 1 \mu\text{m}$:
BCR 665 e BCR 666

Questi CRM sono utilizzabili per la validazione

$\geq 5 \mu\text{m}$ - **NON ESISTONO CRM**



FIBRE DI AMIANTO: la METODICA

1. LIOFILIZZAZIONE:

disidratazione del campione **SENZA** restringimento del tessuto che comporterebbe la frantumazione delle fibre di amianto e determinazione del peso secco

2. ELIMINAZIONE DELLA PARTE ORGANICA:

L'incenerimento **con inceneritore al plasma di ossigeno** permette di eliminare la componente organica del tessuto polmonare senza danneggiare la componente inorganica (contenente le fibre di amianto)

3. FILTRAZIONE

la cenere viene risospesa in acqua distillata e filtrata su membrana in policarbonato con porosità **0,2 μm**

4. ANALISI AL SEM-EDS

La membrana è fissata su stub portacampione del SEM, metallizzata **con oro** ed analizzata a **12.000X**

5. REGOLE DI CONTEGGIO

Fibre di amianto **$\geq 1 \mu\text{m}$** - Risultato espresso in **ff/g tessuto secco**

Se non vengono contate fibre il risultato è **C < LOD**

(LOD \approx 300.000 ff/g tessuto secco)

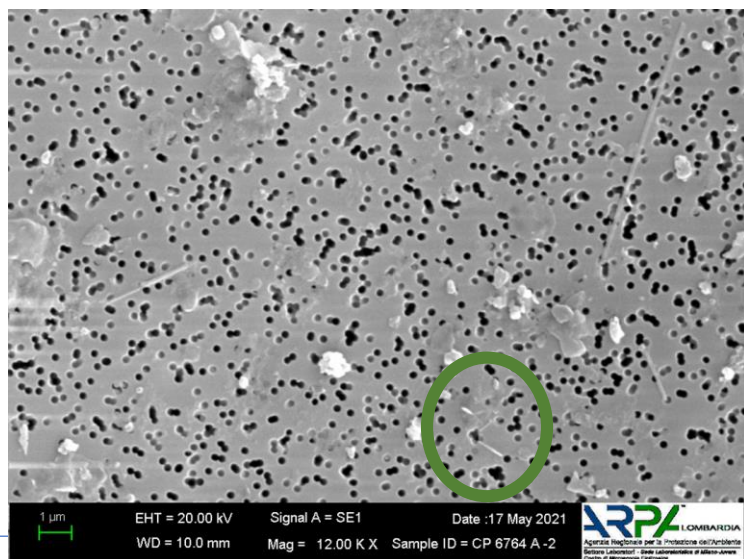
FIBRE DI AMIANTO: l'eliminazione della parte organica

Il plasma asher consente un grado di «pulizia» della membrana difficilmente raggiungibile con la sola digestione chimica

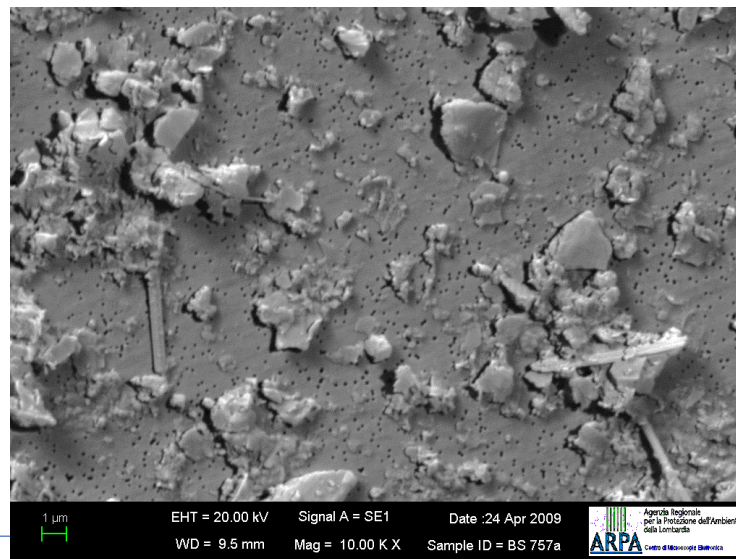
- Il filtro deve essere preparato in modo tale che si **vedano i buchi** della membrana
- Se più di **1/8 del campo** è coperto da particolato o residuo non digerito, il campo deve essere scartato
- Se **¼ dei campi** sono da scartare, il campione va ripreparato

Esempi:

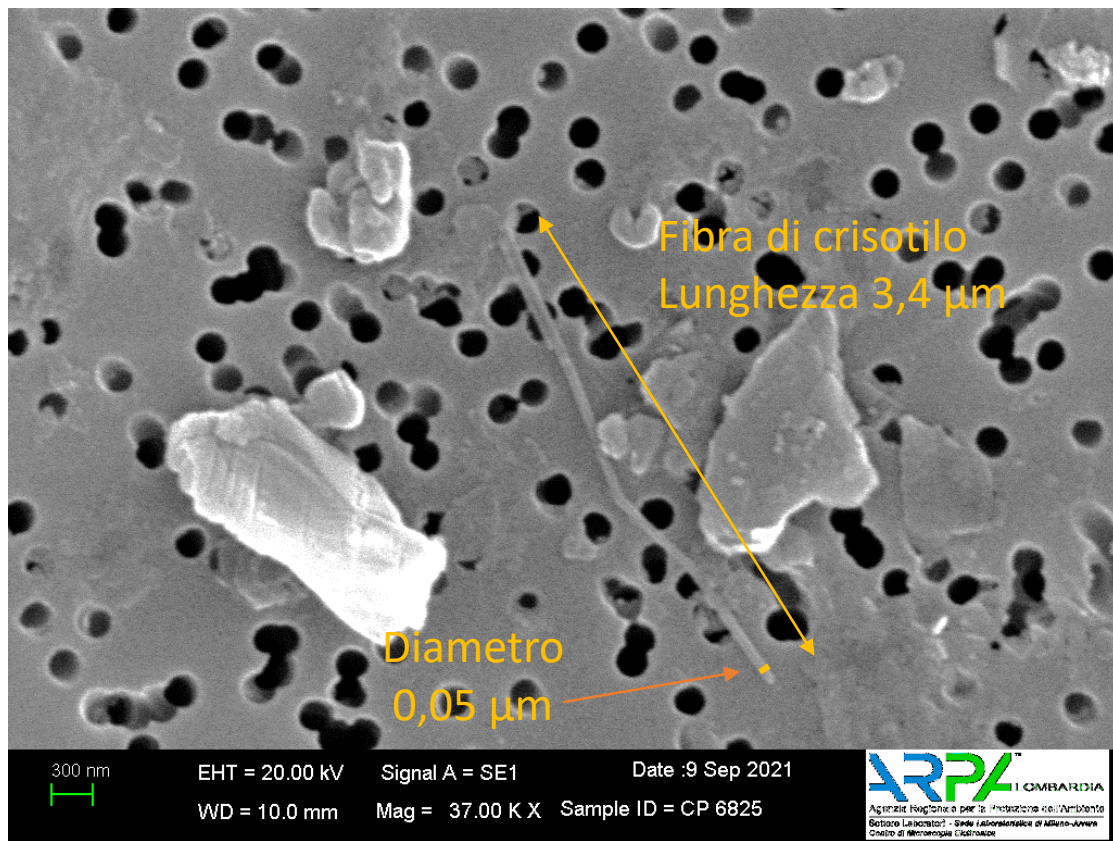
OTTIMA PREPARAZIONE:
si vedono bene anche fibre piccole e sottili



PREPARAZIONE NON OTTIMALE:
NON RIESCO A VEDERE TUTTE le fibre
POSSIBILE SOTTOSTIMA DEL RISULTATO



FIBRE DI AMIANTO: l'eliminazione della parte organica

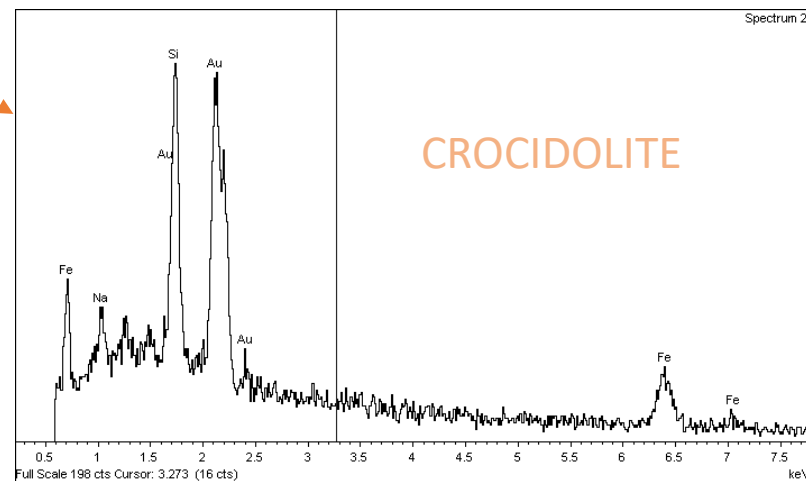
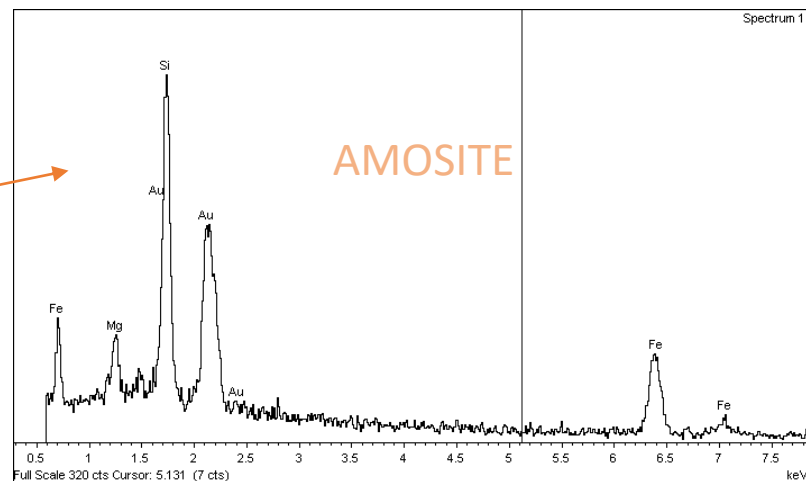
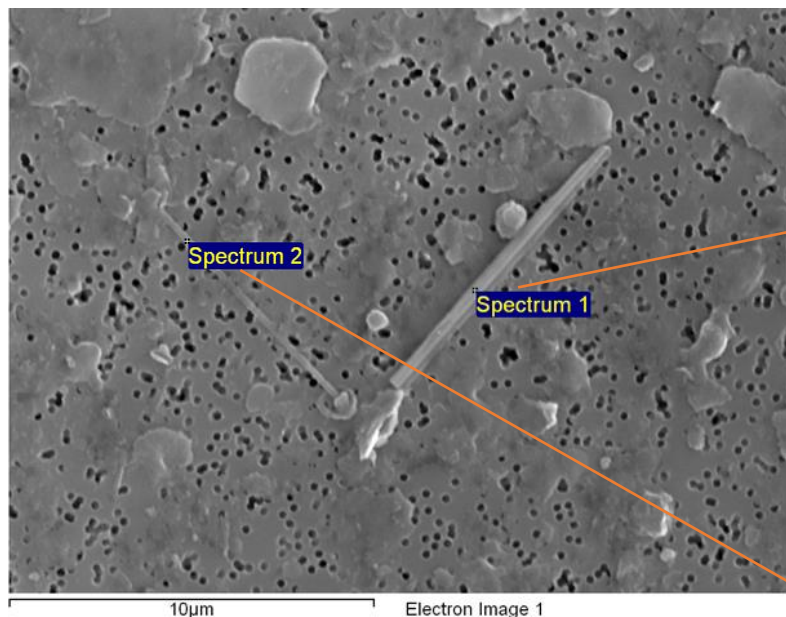


Filtro ottimale per l'analisi

Soprattutto le fibre di crisotilo possono essere sottilissime

Ben visibili solo con un campione molto pulito da interferenze

FIBRE DI AMIANTO: l'eliminazione della parte organica



Un filtro privo di interferenti presenta fibre «pulite» e l'identificazione tramite lo spettro X è più semplice

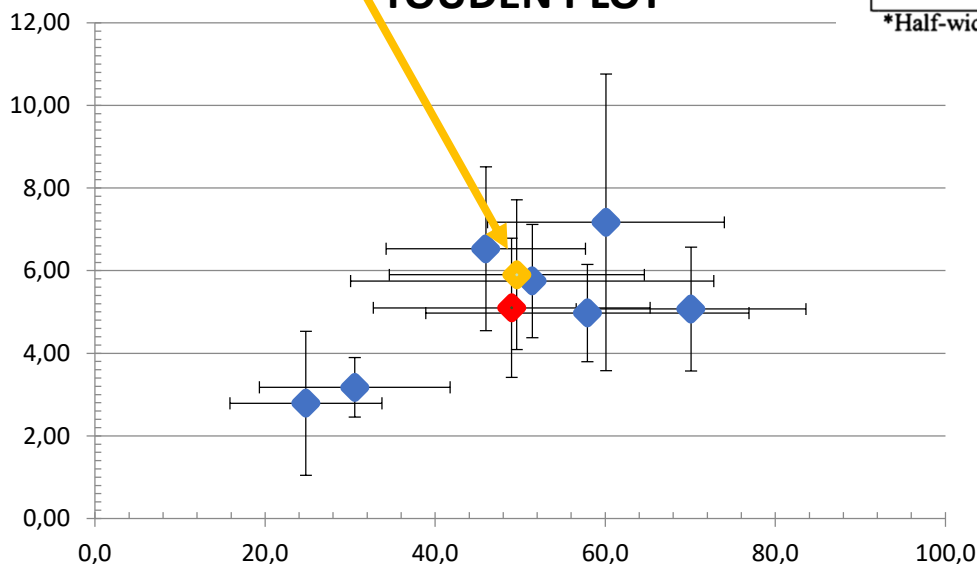
Più la fibra è sottile, più difficile è ottenere uno spettro X identificativo di buona qualità

FIBRE DI AMIANTO: la VALIDAZIONE con BCR665 e BCR666

I CAMPIONI DI RIFERIMENTO CERTIFICATI

Visualizzazione grafica dell'esattezza

YOUDEN PLOT



- Results of laboratories participating to the validation process
- Certified reference values
- Results of ARPA Lombardia Laboratory

Table 10-1. Certified values of amosite/crocidolite and anthophyllite, million fibers/g dry tissue.

| Material | Fiber type | Certified value, million fibers/g dry tissue | Uncertainty, * million fibers/g dry tissue |
|----------|---------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------|
| BCR 665 | Amosite/crocidolite | 49 | 16 |
| BCR 665 | Anthophyllite | 1.8 | 0.9 |
| BCR 666 | Amosite/crocidolite | 2.5 | 0.9 |
| BCR 666 | Anthophyllite | 5.1 | 1.5 |

*Half-width of the 95 % confidence interval.

Per la validazione si acquista il Materiale di Riferimento Certificato e lo si PREPARA e ANALIZZA molte e molte volte.

I risultati vengono **CONFRONTATI** con il valore di riferimento certificato

METODI VALIDATI

L'UTILIZZO DI METODI
standardizzati e VALIDATI

È SUFFICIENTE
A GARANTIRE LA QUALITA' DEL DATO ???

NO!!!!!!

L'UTILIZZO DI METODICHE
VALIDATE E' NECESSARIO,
MA NON E' SUFFICIENTE

PER GARANTIRE LA QUALITA' DEL DATO E' NECESSARIO **L'ACCREDITAMENTO** AI SENSI
DELLA NORMA **ISO 17025**

L'**accreditamento** è l'attestazione, da parte di **un Ente che agisce quale garante super partes**, della competenza, indipendenza e imparzialità degli organismi di certificazione, ispezione e verifica, e dei laboratori di prova e taratura.

In Italia l'ente nazionale di Accreditamento è **ACCREDIA**

IL RAPPORTO DI PROVA

Rapporto di Prova n. 0031560 / Sede E Rev. 0

Data di emissione: 18/11/2021

Numero identificativo campione: 0031560 / Sede E

Campione di (α): **Matrice Biologica**
Tessuto polmonare

Richiedente (α):

Prelevatore (α): Cliente

Data di campionamento (α): 26/07/2021

Paziente:

Data di
accettazione: 04/10/2021

Data inizio
prove: 27/10/2021

Data fine
prove: 18/11/2021

Risultati delle prove

| Parametro Metodo | Unità di misura | Risultato | Incertezza estesa § | LOD |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|------------|------------------------|---------|
| Corpuscoli dell'amianto (CA) Polmone SX lobo inferiore <small>Rapporti ISTISAN 17/13</small> | corpuscoli/g tess secco | 31.000 | 18.000 - 43.000 | 740 |
| Amianto - fibre >1 µm Polmone SX lobo inferiore <small>MT.M1.905 rev 2 2015</small> | f/g tess secco | 10.000.000 | 6.800.000 - 14.000.000 | 370.000 |
| Amianto Crisotilo - fibre >1 µm <small>MT.M1.905 rev 2 2015</small> | f/g tess secco | 0,00 | - | - |
| Amianto anfibolo commerciale (amosite+ crocidolite) - fibre >1 µm <small>MT.M1.905 rev 2 2015</small> | f/g tess secco | 9.500.000 | - | - |
| Amianto calcio-anfibolo non commerciale (tremolite+actinolite) - fibre >1 µm <small>MT.M1.905 rev 2 2015</small> | f/g tess secco | 500.000 | - | - |
| Amianto Antofillite - fibre >1 µm <small>MT.M1.905 rev 2 2015</small> | f/g tess secco | 0,00 | - | - |

MT.XX.YYY: MT indica un metodo di prova interno del laboratorio, XX individua la UO/sede laboratoristica e YYY identifica il codice numerico

NOTE TECNICHE: La lunghezza ed il diametro geometrico medio delle fibre di amianto trovate sono risultate rispettivamente 2.9 µm e 0.16 µm *. Le fibre di amianto sono state identificate come amianto delle varietà crocidolite e tremolite.

§ L'incertezza è espressa sotto forma di estremi dell'intervallo di confidenza del 95% (fattore di copertura k=2,1).

Firmato digitalmente da:

ACCREDIA,

Prima di consentirti di
mettere il marchio sul
rapporto di prova,
controlla tutto:

Sistema

Personale

Strumenti

Materiali di riferimento

Capacità tecnica ad
eseguire la prova

Riferibilità metrologica

Controllo di qualità

...

RIEPILOGO PARTE PRIMA

L'analisi del carico polmonare da fibre di amianto e corpuscoli dell'asbesto non è semplice

Per quanto riguarda l'analisi dei CORPUSCOLI DELL'ASBESTO è stata messa a punto e **VALIDATA** una metodica di RIFERIMENTO nazionale: **ISTISAN 17/12**

L'utilizzo di metodiche di riferimento **VALIDATE**, se esistenti, è **sempre PREFERIBILE** perché favorisce il confronto dei risultati.

In assenza di metodiche di riferimento validate il laboratorio deve procedere alla **VALIDAZIONE** della propria metodica attraverso l'uso di **MATERIALI DI RIFERIMENTO CERTIFICATI** (ES. BCR665 BCR666)

L'ACCREDITAMENTO DI ACCREDIA AI SENSI DELLA NORMA ISO-17025 RAPPRESENTA LA MASSIMA GARANZIA DI QUALITA'

Parte seconda: potenzialità conoscitive dell'analisi

- Razionale dell'analisi del carico polmonare residuo di fibre di asbesto
- Alcuni esempi tratti dall'esperienza del Servizio PSAL dell'ASL/ATS di Brescia
- Circostanze nella quali l'analisi del carico polmonare di fibre ha consentito di:
 - svelare esposizioni occupazionali prima ignorate
 - quantificare l'imprevedibile entità dell'esposizione ambientale ad amianto

Parte seconda: potenzialità conoscitive dell'analisi

Esposizione ad amianto e indicatori biologici di dose interna

Da circa 30 anni sono stati individuati ed utilizzati 2 indicatori biologici di dose interna ottenuti dall'analisi di campioni di tessuto polmonare:

1. Corpuscoli di amianto (osservati al MO e ME)
2. Fibre di amianto (osservate al ME, SEM o TEM)

La letteratura ha evidenziato l'esistenza di una buona correlazione tra le concentrazioni di corpuscoli e fibre di amianto ritenute nei polmoni ed entità della esposizione subita, permettendo, su base probabilistica, di distinguere i soggetti professionalmente esposti dalla popolazione generale

Parte seconda: Carico polmonare di fibre di amianto

Le concentrazioni di fibre di amianto rilevate al microscopio elettronico in campioni di tessuto polmonare sono il riflesso di numerose variabili tra cui:

1. Tipo di fibra ed entità dell'esposizione
2. Biopersistenza (> per anfiboli vs crisotilo)
3. Tempo trascorso tra fine esposizione ed analisi
4. Fattori individuali
5. Raccolta e preparazione del campione
6. Metodica di analisi e microscopio usato (TEM vs SEM)
7. Esperienza del laboratorio di analisi

Suggerita una concentrazione di 500.000 fibre di anfiboli/gr. tessuto secco polmonare per discriminare soggetti con mesotelioma da esposizione professionale rispetto alla popolazione generale (Tuomi 1989, Tuomi 1991)

Parte seconda: potenzialità conoscitive dell'analisi

Contenuto polmonare di fibre di amianto e mesoteliomi maligni

- Utilità dell'analisi del carico polmonare di fibre di amianto per integrare le informazioni anamnestiche nei casi di MM.
Buona correlazione tra concentrazione di fibre e categorie predefinite di esposizione (Mowè 1984, Warnok 1989, Tuomi 1991, Karjalainen 1993, Takahashi 1994, McDonald 1996, Dufresne 1996, Henderson 1997)
- Consensus Report Helsinki 1997
Valori di riferimento (fibre di anfiboli per gr. di tessuto secco) per identificare soggetti ad alta probabilità di esposizione professionale
- Report ERS Working Group. (De Vuyst et al. *Eur Respir J* 1998).
Linee Guida per l'analisi di fibre minerali in campioni biologici

Parte seconda: I VALORI LIMITE DI RIFERIMENTO

Indicatori biologici di dose cumulativa ad amianto: proposta di valori limite di riferimento (1)

Consensus Report Helsinki 1997 (Asbestos, asbestosis, and cancer: The Helsinki criteria for diagnosis and attribution)

“L’analisi delle concentrazioni nel tessuto polmonare dei corpuscoli e delle fibre di asbesto può fornire dati a supporto della storia occupazionale”

 A scopo clinico sono suggeriti i seguenti valori di riferimento per identificare soggetti con elevata probabilità di esposizione professionale a polveri di asbesto:

1. > **1.000.000 fibre di anfiboli (> 1 µm)** per gr. di tessuto secco o
> **100.000 fibre di anfiboli (> 5 µm)** per gr. di tessuto secco
2. > **1.000 corpuscoli di asbesto** per gr. di tessuto secco (100 c.a. per gr. tessuto fresco) o
3. > **1 corpuscolo di asbesto per ml.** di fluido di lavaggio al BAL

NB: 1 alla microscopia elettronica, 2 e 3 al MO (laboratorio qualificato)

Parte seconda: potenzialità conoscitive dell'analisi

Biopersistence of Respirable Synthetic Fibers and Minerals: The Point of View of the Epidemiologist

Paolo Boffetta

International Agency for Research on Cancer, Lyon, France

Biopersistence of fibers and minerals in human respiratory tissues is an important aspect of the toxicity of these agents. However, few data are available from human studies. Although a number of studies have measured the lung burden of asbestos and other minerals in exposed humans, few presented information relevant to biopersistence of these agents. The studies analyzing asbestos lung burden in workers at different intervals following cessation of exposure suggest a linear decrease in concentration over time, that is independent of duration of exposure. However, the available evidence on asbestos is too sparse to allow a firm conclusion; almost no data are available on other minerals. — Environ Health Perspect 102(Suppl 5):11–13 (1994)

Key words: asbestos, biopersistence, epidemiology, synthetic fibers, minerals

Introduction

Biopersistence of fibers and minerals in human respiratory tissues is an important aspect of the toxicity of these agents.

The causal pathway leading to chronic damage caused by an external agent can be viewed as a model including six steps (Figure 1) (1). In epidemiologic studies of the fibrogenic or carcinogenic action of inorganic agents, a qualitative or semiquantitative estimate of external exposure is usually the only information available on dose. Furthermore, little information is available on early biologic effects or altered structure functions, and the pathway leading to chronic disease from external exposure is not known. Biopersistence is among the factors that influence the biologically effective dose, which is defined as the amount and type of inhaled fibers or minerals interacting with the appropriate biologic targets. A valid estimate of the biologically effective dose would greatly assist the interpretation of results of epidemiologic studies, especially in studies dealing with low exposures and doses.

Biopersistence of Fibers and Minerals in Humans

Although a number of investigators have analyzed the content of fibers (mainly asbestos) and other minerals in human res-

piratory tissues (mainly the lung), these studies are of limited value to elucidate the processes of retention, dissolution, and translocation of the inhaled material. From recent reviews on asbestos (2,3), it can be concluded that the asbestos content of lung tissue is higher in asbestosis and lung cancer patients than in patients with pleural mesothelioma or pleural plaques (2). However, differences in analytic techniques, and in the physical characteristics of fibers, make the comparison of results between studies somewhat problematic.

No study has so far specifically addressed the issue of persistence of fibers or minerals in the human lung. The difficulties in carrying out such a study are briefly reviewed below. However, a few studies have analyzed asbestos content in lungs of miners, textile and asbestos cement workers at various intervals after cessation of exposure. Such investigations offer some information on the biopersistence of asbestos fibers in human lungs.

Sebastien et al. measured fiber content in 161 lung tissue samples of asbestos textile workers from South Carolina, and asbestos miners and millers from Quebec (4). The main purpose of the study was to explain the higher risk of respiratory cancer in textile workers than in miners, both exposed to chrysotile from the same kind of fiber source. The authors present concentrations of chrysotile and tremolite according to duration of employment and time since cessation of employment. Although the number of samples in some duration-cessation cells are small, a decrease in concentration of both types of

fiber with time since cessation of employment is suggested among both textile workers and miners exposed for 200 months or more; results for workers exposed for a shorter period are less easily interpretable (Figure 2).

Concentration of asbestos fibers according to time since first exposure (latency), duration of exposure, and time since cessation of exposure were also presented by Pooley (5), who analyzed lung tissue of 20 cases of asbestosis among Canadian chrysotile miners, 16 of whom had a detectable level of fibers (5); by Gylseth, Mow, and Wannag, who presented results based on four mesothelioma and four lung cancer cases among workers in a Norwegian asbestos cement plant mainly exposed to chrysotile (6); and by Dodson et al., who analyzed lung tissue samples from 12 workers of a Texas amosite plant, six of whom were employed for not more than 3 months (7).

Results of these studies according to duration of exposure and time since cessa-

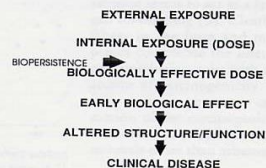


Figure 1. Model of pathway between exposure and disease.

1994

Aspetto rilevante della dose interna:
la biopersistenza delle fibre di amianto

Suggerito un decremento lineare della concentrazione polmonare delle fibre di amianto nel tempo, indipendentemente dalla durata dell'esposizione

This paper was presented at the Workshop on Biopersistence of Respirable Synthetic Fibers and Minerals held 7-9 September 1992 in Lyon, France. Address correspondence to Dr. Paolo Boffetta, International Agency for Research on Cancer, 150, Cours Albert-Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, France. Telephone 33 72 73 84 85. Fax 33 72 73 85 75.

Parte seconda: potenzialità conoscitive dell'analisi

BIOPERSISTENZA E CLEARANCE DELLE FIBRE DI ASBESTO. Evidenze di letteratura

Lippmann M. Effects of fiber characteristics on lung deposition, retention, and disease. *Environ Health Perspect* 1990;88:311–17.

Broaddus VC, Everitt JJ, Black B, et al. Non-neoplastic and neoplastic pleural endpoints following fiber exposure. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2011;14:153–78.

Berry G. Models for mesothelioma incidence following exposure to fibres in terms of timing and duration of exposure and the biopersistence of the fibres. *Inhal Toxicol* 1999;11:111–30.

Churg A, Wright JL. Persistence of natural mineral fibres in human lungs: an overview. *Environ Health Perspect* 1994;5:229–33.

Albin M, Pooley FD, Strömberg U, et al. Retention patterns of asbestos fibres in lung tissue among asbestos cement workers. *Occup Environ Med* 1994;51:205–11.

Churg A. Deposition and clearance of chrysotile asbestos. *Ann Occup Hyg* 1994;38:625–33, 424–5.

Parte seconda: potenzialità conoscitive dell'analisi

Downloaded from <http://oem.bmj.com/> on November 8, 2016 - Published by group.bmj.com
online First, published on November 7, 2016 as 10.1136/oemed-2015-103382
Exposure assessment

ORIGINAL ARTICLE

Residual fibre lung burden among patients with pleural mesothelioma who have been occupationally exposed to asbestos

Enzo Merler,¹ Anna Somigliana,² Paolo Girardi,^{1,3} Pietro Gino Barbieri⁴

ABSTRACT

Objectives To evaluate the lungs asbestos fibres concentration in participants with malignant pleural mesothelioma (MPM) who have been occupationally exposed.

Methods The lung samples were obtained from pleuropneumonectomies or autopsies of 271 male MPMS. The lung samples were examined through scanning electron microscopy. Retrospective assessment was used to assess for asbestos exposure. This study includes 248 MPMS with an occupational exposure defined as either 'definite' or 'probable' or 'possible'.

Results The participants had finished working in asbestos exposure conditions more than 20 years ago (on average 26.1±11.0 years). The fibre burden resulted with a geometric mean equal to 2.0 (95% CI 1.6 to 2.4) million fibres per gram of dry lung tissue. The burden was higher among participants employed in asbestos textiles industry and in shipyards with insulation material, if compared with construction workers or non-asbestos textile workers or participants working in chemicals or as auto mechanics. 91.3% of MPMS had a detectable amount of amphibole fibres. A strong lung clearance capability was evident among workers exposed to chrysotile fibres. Owing to that, the 1997 Helsinki Criteria for occupational exposure were reached in <35% of cases among participant working in construction, in metallurgical industry, in chemical or textile industry and among those performing brake repair activities.

Conclusions The MPM cases are now occurring in Italy in participants who ceased occupational asbestos exposure decades before the analysis. A large majority still shows a residual content of amphibole fibres, but given the lung clearance capability, attribution to occupational exposure cannot rely only on fibres detection.

What this paper adds

- ▶ The residual asbestos fibre lung burden was investigated in a large set of malignant pleural mesothelioma cases related to asbestos occupationally exposed workers, whose exposure ceased several years before the tissue analysis.
- ▶ Given the time passed between the exposure and the tissue analysis, the burden of lung fibres represents only partially the cumulative exposure, since only amphibole fibres persist in the lungs, whereas chrysotile fibres largely disappear, due to the difference in lung clearance rates of these two asbestos fibres types.
- ▶ Considering the fibre burden in patients with a work history as asbestos occupationally exposed workers, a significant amount of fibre burden was detected in a large number of these patients, but in some cases it was below the threshold proposed to be considered as significant of occupational exposure.
- ▶ The pre-eminent importance of gathering information on occupational asbestos exposure, in the framework of a health surveillance system, is stressed.

lungs, is strongly associated with inhalation of all types of asbestos fibres, and occurs after a long latency (median 44.6 years among males; 45.2 years among females).¹

Despite the ban, in Italy the incidence of MPMS is still increasing.²

The content and types of asbestos fibres retained

271 analisi del contenuto polmonare di fibre di amianto in casi di mesoteliomi pleurico

Il carico polmonare residuo di fibre rappresenta **solo in parte la dose cumulativa,**

inversamente proporzionale al tempo trascorso dalla cessazione dell'esposizione

Il modesto carico residuo di crisotilo in soggetti con esposizione rilevante a questa sola fibra è coerente con la sua elevata clearance

Mesoteliomi pleurici da insolita e ignorata esposizione professionale ad amianto. Ruolo dei Servizi territoriali di prevenzione nell'individuazione della pregressa esposizione lavorativa

SANDRA LOMBARDI, R. GIRELLI, P.G. BARBIERI

Servizio Prevenzione e Sicurezza Ambienti di Lavoro e Registro Mesoteliomi Maligni Provincia di Brescia, Azienda Sanitaria Locale di Brescia, Brescia

**3 casi di mesotelioma pleurico
in addetti alla tornitura e
rettifica di componenti di rotori
per motori elettrici di utensili
manuali (ricambi)**



Cortesia di R. Girelli

Parte seconda: potenzialità conoscitive dell'analisi



Caso n° 3, carico polmonare
residuo di fibre di amianto:

**16.000.000 per gr./tsp, 87%
anfiboli, 11% crisotilo)**

Asbesto crisotilo della
Amiantifera di Balangero,
sostituito con fibra di vetro dal
1992

Cortesia di R. Girelli



P.G. Barbieri, A. Somigliana¹, S. Lombardi, R. Girelli, A. Rocco, C. Pezzotti, S. Silvestri²


Riciclaggio di sacchi di juta, patologie asbesto-correlate ed esposizione ad amianto in agricoltura

Tabella I. Caratteristiche dei 16 soggetti con patologie asbesto-correlate occupati nelle imprese di riciclaggio di sacchi di juta

| N° | M/F | anno diagnosi | età | diagnosi clinica ^a | MM ^a | lat. § anni | esp. anni | I ^a | mansione prevalente | inizio-fine attività |
|----|-----|---------------|-----|-----------------------------------------|-----------------|-------------|-----------|----------------|--------------------------------------------------|----------------------|
| 1 | F | 2002 | 64 | MM pleurico epitelioide | 1 | 47 | 6 | A | cucitura sacchi | 1955-'61 |
| 2 | F | 2005 | 69 | MM peritoneale bifasico e pl.pl. | 1 | 55 | 7 | A | battitura, cucitura, selezione | 1951-'58 |
| 3 | M | 2007 | 69 | asbestosi polmonare e pl.pl. bilaterali | - | 54 | 7 | A | scarico, cernita, taglio | 1953-'60 |
| 4 | F | 2006 | 65 | placche pleuriche calcifiche bilaterali | - | - | 7 | A | sfilacciatrice, pulitura | 1955-'62 |
| 5 | M | 2006 | 69 | placche pleuriche calcifiche bilaterali | - | - | 4 | A | scarico, sfilacciatrice | 1961-'64 |
| 6 | F | 1978 | 59 | MM pleurico | 2 | 30 | 27 | B | cucitura; esposiz. familiare | 1947-'73 |
| 7 | F | 2002 | 52 | MM pleurico epitelioide e pl.pl. | 1 | 45 | 16 | B | esposizione familiare e collaborazione saltuaria | 1950-'73 |
| 8 | F | 1983 | 33 | asbestosi polmonare e pl.pl. | - | 20 | 10 | B | cucitura sacchi | 1963-'73 |
| | | 2002 | 52 | carcinoma squamoso polmone | | 39 | | | | |
| 9 | F | 1986 | 40 | asbestosi polmonare | - | 22 | 8 | B | cucitura sacchi | 1962-'70 |
| 10 | F | 1994 | 55 | placche pleuriche | - | 31 | 2 | B | cucitura sacchi | 1961-'63 |
| 11 | F | 2006 | 52 | MM pleurico epitelioide e pl.pl. | 1 | 38 | 2 | C | taglio e cucitura | 1968-'70 |

Carico polmonare di fibre: **400.000.000 per gr/tps**, anfiboli 100%

Pleural malignant mesothelioma in dental laboratory technicians: A case series

Carolina Mensi BSc, PhD¹  | Francesco Ciullo MD² | Gino Pietro Barbieri MD³
Luciano Riboldi MD¹ | Anna Somigliana Phys⁴ | Giulio Rasperini DDS⁵ |
Angela Cecilia Pesatori MD, PhD^{1,2} | Dario Consonni MD, PhD¹

**3 casi descritti nel Registro Mesoteliomi Lombardia, di cui
1 dal Registro Mesoteliomi di Brescia
72 anni, mesotelioma pleurico 2004**

**Dal 1953 al 1963 tecnico in laboratorio: riscaldamento e fusione sul
modello nei cilindri da inserire in fornetti coibentati e uso guanti in amianto**

Carico polmonare di fibre in SEM:

- < 380.000 ff/gts, Anf. 97%, Crisotilo 3%
- 22.000 corpuscoli di asbesto

Mesotelioma pleurico in maestra elementare: esposizione ad amianto dovuta alla pasta DAS

P.G. BARBIERI, ANNA SOMIGLIANA*, R. GIRELLI**, SANDRA LOMBARDI, MICHELA SARNICO**,
S. SILVESTRI***

E.B., diagnosi di mesotelioma pleurico 2015,
78 anni. Autopsia: conferma MPM

Carico polmonare residuo:

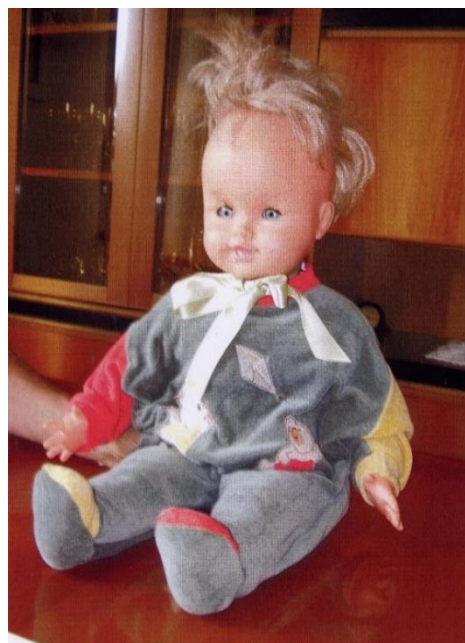
- **Corpuscoli di amianto = 1.400 g/tsp**
- **Fibre libere = 310.000 g/tsp**
 - 33% crisotilo, 76% anfiboli
- **Fibre talco = 210.000 per g/tsp**
- Analisi campione DAS: asbesto crisotilo
presumibilmente della Amiantifera di Balangero



Cortesia di R. Girelli

Mesoteliomi pleurici in addette alla fabbricazione di bambole: esposizione ad amianto?

PIETRO GINO BARBIERI¹, ANNA SOMIGLIANA², SANDRA LOMBARDI¹, ROBERTO FESTA³,
ROBERTO GIRELLI³, MICHELA SARNICO³



3 casi descritti nel Registro Mesoteliomi di Brescia, 2 nella stessa impresa.

**C.L., 56 anni, mesotelioma pleurico 2008,
Mansione: assemblaggio bambole**

Prima classificazione esposizione: “ignota”

Carico polmonare di fibre in SEM:

12.000.000 ff/gts, Anf. 97%, Crisotilo 3%

Forni elettrici per ammorbidimento dei segmenti delle bambole: coibentati
Analisi di campione massivo: asbesto crisotilo

Parte seconda: potenzialità

Ulteriori esempi di esposizione ad asbesto svelata solo tramite l'analisi del carico polmonare residuo di fibre

Tabella 1 Valutazione dell'esposizione su base anamnestica e concentrazione polmonare delle fibre di amianto in soggetti con diagnosi di mesotelioma pleurico

Table 1. First evaluation of the asbestos exposure and lung asbestos fibres concentration of subjects suffering from pleural malignant mesothelioma

| Caso | Sesso età* | Anno Diagnosi analisi | Periodo di lavoro | Attività lavorativa | Esp. Am. # | Fibre asbesto (lunghezza > 1 µm) | | | |
|------|---------------|-----------------------------|----------------------|---------------------------------------------|------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------|-----------|
| | | | | | | Concentrazione ^a (limiti confidenza) | Contenuto (%) di fibre ^{aa} | Dia µm | Lun µm |
| 1 | F 56 | 2008 | 1961-'66 | Produzione dolciumi | 8 | 12.000.000 | A 97 | 0,1 | 3 |
| | | 2009 | 1966-'75 | Assemblaggio bambole in gomma | 8 | (8.020.000-17.000.000) | C 3 | | |
| 2 | M 66 | 2006 | 1950-'90 | Giostraio | 8 | 2.900.000 | A 94 (T12) | 0,1 | 2,6 |
| | | 2006 | 1950-'90 | Possibile coibentazione di mobilhome | 5 | (1.630.000-4.800.000) | C 6 | | |
| 3 | M 70 | 2004 | 1957-'60 | Addetto distaffatura di getti fusi in ghisa | 2 | 9.300.000 | A 10 | 0,13 | 3,8 |
| | | 2005 | 1960-'74 | Add. formatura stampi e anime in fonderia | 2 | (6.260.000-13.000.000) | C 90 | | |
| 4 | M 45 | 2004 | 1977-'82 | Musicista | 8 | 3.500.000 | C 100 | 0,12 | 3,81 |
| | | 2004 | 1982-'05 | Gestore di studio di registrazione | 8 | (2.310.000-5.190.000) | | | |

* alla diagnosi

Categorie di esposizione ad amianto (secondo classificazione Re.Na.M. 2003): 2=professionale probabile, 3=professionale possibile, 5=ambientale, 8=ignota

Fibre asbesto: ^aper gr. di tessuto secco polmonare; ^{aa}A=anfiboli, C=crisotilo, T=tremolite; Dia-Lun: diametro e lunghezza geometrica media;

Parte seconda: potenzialità

Original Article

Lung Asbestos Fibre Burden and Pleural Mesothelioma in Women with Non-occupational Exposure

Pietro Gino Barbieri^{1,*}, Anna Somigliana², Yao Chen³, Dario Consonni^{4,○}, Roberto Vignola⁵ and Luigi Finotto⁶

Conclusions: Exclusive familial exposure to asbestos determined cumulative doses close to those observed in moderate occupational exposure circumstances. Our results also suggest that combined environmental and familial exposures may cause unexpectedly high cumulative fibre doses.

Parte seconda: potenzialità

Table 4. Comparison of lung asbestos body count and fibre burden in the three groups of women with MPM and non-occupational exposure (data rounded to three significant figures).

| Asbestos exposure | N | Asbestos body count (fibres per gram) (GM/GSD) | Crude GM ratio | 95% CI ^a | Adjusted GM ratio ^b | 95% CI ^a |
|----------------------------------------------------------------|---|---------------------------------------------------|----------------|---------------------|--------------------------------|---------------------|
| Group 1. Familial <i>Fincantieri</i> | 7 | 6100 (9.6) | 1.00 | Reference | 1.00 | Reference |
| Group 2. Familial + Environmental <i>Fibronit - Broni</i> | 6 | 13 800 (10.4) | 2.25 | 0.14–36.5 | 2.63 | 0.00–8494 |
| Group 3. Environmental <i>Fibronit - Broni</i> | 2 | 8400 (1.1) | 1.37 | 0.03–70.7 | 0.37 | 0.0–651 |
| Asbestos fibre count (millions of fibres per gram) (GM/GSD) | | | | | | |
| Group 1. Familial <i>Fincantieri</i> | 7 | 0.6 (2.1) | 1.00 | Reference | 1.00 | Reference |
| Group 2. Familial + Environmental <i>Fibronit - Broni</i> | 6 | 7.9 (2.1) | 12.7 | 5.00–32.2 | 6.66 | 1.40–31.6 |
| Group 3. Environmental <i>Fibronit - Broni</i> | 2 | 6.0 (2.3) | 9.73 | 2.54–37.2 | 2.46 | 0.31–19.2 |

^aCI, confidence interval; GM, geometric mean; GSD, geometric standard deviation.

^bAdjusted for duration of exposure and time since last exposure (years).

RIEPILOGO PARTE SECONDA

Nell'esperienza condotta in 20 anni dal Servizio PSAL ASL di Brescia l'analisi del carico polmonare di fibre di amianto è risultata di grande utilità perché ha:

- permesso di individuare esposizioni professionali prima ignorate e/o confermare esposizioni prima solo ipotizzate;
- consentito di stimare oggettivamente l'entità della dose cumulativa (interna) anche in assenza di misure della dose esterna;
- agevolato il riconoscimento INAIL di alcuni casi di mesotelioma;
- offerto alla A.G. elementi certi di prova dell'esposizione;
- fornito solide conoscenze sulla possibile rilevanza dell'esposizione ambientale ad amianto

Grazie per l'attenzione

