

Aggiornamenti in tema di tossicologia del piombo

Pietro APOSTOLI

Cattedra di Medicina del Lavoro, Università degli Studi, Brescia

Riassunto. - Negli ultimi dieci anni sono state acquisite nuove conoscenze sugli effetti conseguenti all'esposizione a basse dosi di Pb. Si tratta in particolare degli effetti a carico del sistema nervoso, dell'apparato cardiovascolare, del sistema endocrino ed immunitario, degli enzimi contenenti eme e del sistema riproduttivo. Il problema di una eventuale azione mutagenica e cancerogena del Pb sull'uomo resta invece ancora aperto. Molti degli effetti sopra richiamati sono stati dimostrati per piombemie anche sensibilmente inferiori ai correnti valori limite o addirittura ai livelli di riferimento della popolazione generale. Per effetti, come quelli sull'eme, sul sistema nervoso centrale e la pressione arteriosa non è stato inoltre possibile fissare una soglia. Notevole attenzione deve essere quindi dedicata agli effetti subclinici molto precoci i quali formano un continuo con quelli classicamente dovuti al Pb differendone solo per il loro grado. Di fronte alle mutate condizioni di esposizione pare opportuno un riesame dei modelli di prevenzione per il Pb con due obiettivi differenziati: a) l'annullamento degli effetti dose-dipendenti che si manifestano ancora per esposizioni elevate in gruppi particolari di professionalmente esposti e non; b) la riduzione al più basso livello possibile degli effetti privi di soglia (finora) accertata nella popolazione generale.

Parole chiave: piombo, tossicologia, effetti clinici, indicatori biologici, esposizione professionale.

Summary (*Current issues on lead toxicology*). - In the past 10-15 years increasing attention has been paid to subclinical effects and to early or subtle health effects induced by lead (Pb) exposure. They form a continuum with classical clinical effects differing from them only for their degree. Accurate knowledge has been acquired on the effects of low level Pb exposure, especially concerning the effects on the nervous system, the cardiovascular system, the endocrine and immune system, on heme containing enzymes, and on reproductive function. The question of a possible mutagenic and carcinogenic action of Pb on humans is still open. Many of the above mentioned effects have been observed for blood lead (PbB) levels below the current limits proposed for workers and the general population. In addition, for certain effects, like those on heme, central nervous system, and blood pressure, it has not been possible to establish a clear threshold value. A critical evaluation of the current prevention models appears to be appropriate to eliminate the dose-dependent effects occurring in highly exposed groups and to reduce, as much as possible, the effects without threshold in the general population.

Key words: lead, toxicology, clinical effects, biological markers, occupational exposure.

Introduzione

Il piombo (Pb) è sicuramente l'elemento che attraverso preistoria e storia, alchimia e scienza, più si è prestato a testimoniare l'evoluzione degli strumenti e dei metodi utilizzati per lo studio dell'esposizione e degli effetti dei tossici ambientali e lavorativi. Limitandoci in questa sede alle tappe percorse in questo secolo dalla medicina del lavoro, va ricordato come il Pb, dopo essere stato per decenni il banco di prova delle capacità diagnostiche, terapeutiche e preventive della clinica del lavoro, è divenuto negli ultimi anni il metallo su cui sono stati validati i modelli più completi di studio nel campo della tossicologia industriale. Infatti è in relazione al Pb che, con una ampiezza ancor oggi non superata, sono stati messi a punto criteri e metodi per il dosaggio di indicatori di dose esterna ed interna, di dose metabolicamente attiva e di indicatori di effetto subcritico e critico [1].

I progressi compiuti in campo preventivo hanno ridotto nel tempo l'entità delle esposizioni professionali al metallo fino a far ritenere che ormai i problemi per la

salute conseguenti all'assorbimento di Pb fossero null'altro che un ricordo. Vi è però da rilevare che, accanto alla indubitabile, anche se non generalizzata, contrazione dell'esposizione al Pb, sono state acquisite conoscenze più precise sugli effetti correlabili con dosi via via decrescenti del metallo. Sono state così messe in evidenza nuove problematiche, tali da far ritenere il Pb tema ancora meritevole di impegno preventivo e di ricerca.

In questa rassegna saranno rivisti alcuni presupposti degli attuali modelli conoscitivi della tossicologia del Pb e saranno passate in rassegna alcune acquisizioni scientifiche relative agli effetti correlabili con gli attuali livelli di assorbimento del metallo.

Cenni di tossicocinetica

I modelli tossicocinetici che descrivono e mettono in relazione le modalità di assorbimento, distribuzione, accumulo ed escrezione del Pb sono stati proposti da alcuni decenni e la loro principale utilità è quella di

permettere previsioni circa i livelli di Pb nei diversi compartimenti, in particolare nel sangue, o circa il carico corporeo complessivo. In letteratura sono riportati modelli con un numero variabile di compartimenti, da 1 a 6 [2-8]. I modelli principali restano comunque quello a tre compartimenti di Rabinowitz *et al.* [4] e quello a cinque compartimenti di Bernard [7]. Nel modello di Rabinowitz *et al.* [4] venivano proposti tre pool principali, sangue, tessuti molli e osso, con aree di sovrapposizione tra sangue e parte più labile del Pb del tessuto molle e tra questo e l'area a scambio più rapido del tessuto osseo trabecolare. Una interessante revisione di questo modello ha portato ad individuare un maggior numero di compartimenti [9]. Il modello di Bernard rappresenta il principale riferimento modellistico utilizzato tra l'altro dalla Occupational Safety and Health Administration (OSHA) per valutare, in ambiente lavorativo, la relazione tra Pb nell'aria (PbA) e Pb nel sangue (PbE). In tale modello i 5 compartimenti sono rappresentati da sangue (R1), osso corticale (R2), osso trabecolare (R3), tessuti molli a scambio lento (R4) e tessuti molli a scambio rapido (R5). Il vantaggio di questo modello rispetto a quelli con minor numero di compartimenti è quello di proporre, per l'osso, due pool con velocità di trasferimento del Pb differenziate (2-3 volte più rapide per l'osso trabecolare). Inoltre si suppone che le velocità di scambio tra R3, R4 ed R1 siano tali da garantire un rilascio di Pb continuativo e di entità sufficiente a elevare la PbE anche dopo la sospensione dell'esposizione. Tra le revisioni del modello di Bernard di un certo interesse appare quella di Bert *et al.* [8] le cui previsioni sono molto simili ai dati sperimentali e alle previsioni ottenute con l'uso di altri modelli, quali quello di Rabinowitz *et al.* [4] e Griffin *et al.* [10], mentre con il modello originale di Bernard [7] i dati calcolati risultavano sovrapponibili solo con i dati sperimentali relativi ad esposizioni a più lungo termine.

Oltre al numero di compartimenti un altro elemento importante nell'approccio modellistico è quello della individuazione delle funzioni matematiche che interpolano i dati. Per il Pb la maggior parte degli autori hanno utilizzato funzioni lineari semplici di primo grado o esponenziali [4, 8, 9]. Attualmente si ritiene che la funzione che meglio interpola la concentrazione di PbA e PbE sia di tipo curvilineare [11-13]. Permangono tuttavia i sostenitori di modelli lineari o esponenziali [14, 15] che sottolineano, tra i limiti dei modelli curvilineari, in particolare quello di non essere in grado di predire i valori di PbE, conseguenti all'assorbimento di Pb proveniente da fonti diverse da quella aerea. Snee [14] propone nella sua regressione un coefficiente angolare di circa $1 \mu\text{g Pb}/100 \text{ ml}$ nel sangue per $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ di PbA ($\pm 0,7 \mu\text{g Pb}/100 \text{ ml}$ per limiti di confidenza del 95%). Angle *et al.* [15] valutando i contributi alla PbE provenienti sia dall'aria che dal suolo (a loro volta condizionati dal PbA)

propongono nel loro modello lineare incrementi nel sangue di 4-5 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ per ogni aumento di $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ di Pb nell'aria.

I modelli curvilineari, che hanno raccolto il maggior consenso in questi ultimi anni, sono stati via via integrati valutando altri parametri come la frazione di Pb trattenuata e quella assorbita a livello polmonare, il rapporto tra le variazioni di PbE e di PbA (che si modifica sia con il variare di PbE che di PbA), il parametro α , definito come il contributo alla PbE derivante da una esposizione a $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ di Pb nell'aria e che tiene conto dei valori iniziali di PbE. Studi condotti con isotopi hanno permesso di proporre un valore di α intorno a 3 e coefficienti angolari compresi tra 0,5 e 7 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ di Pb nel sangue, con valori intorno a 2 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ per gli adulti e 4 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ per i bambini, per ogni incremento di $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ di Pb nell'aria [12].

Nella determinazione del rapporto PbA/PbE in ambito lavorativo è stato utilizzato dall'OSHA il modello multicompartmentale di Bernard [7], integrato da Ashford *et al.* [16] in modo da tenere conto di alcune importanti variabili lavorative ed espositive, inclusa la granulometria delle polveri. Questa integrazione denominata *assumption C* proponeva di considerare i primi $12,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ di polveri composti da particelle di diametro inferiore a $1 \mu\text{m}$ e le restanti di diametro superiore. Per le particelle inferiori ad $1 \mu\text{m}$ era stato previsto un assorbimento del 37%, mentre per quelle maggiori se ne proponeva uno pari a quello delle particelle assorbite per via digestiva, pari cioè all'1,8%.

Un'altra integrazione al modello originale fu l'introduzione dell'anzianità di lavoro come variabile d'interesse con le seguenti anzianità medie ponderate: 0,9 3,4 9 16 e 28,5 anni. Infine come PbE di partenza (*e*) su cui basare i calcoli venne considerata una PbE media di $19 \pm 9,5 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$.

La funzione relativa al modello proposto era pertanto la seguente: $\text{piombo nel sangue} = F(\text{anzianità lavorativa, storia espositiva, granulometria delle particelle, variabilità individuale}) + e$.

I punti della modellistica OSHA maggiormente criticati sono risultati essere: a) le assunzioni relative ai valori granulometrici delle polveri che pur essendo state confermate [17] si sono dimostrate poco sostenibili in alcune situazioni di lavoro con conseguente diversa stima della PbE [18, 19]; b) l'aver definito come respirabili solo le polveri con diametro inferiore a $1 \mu\text{m}$, quando vi sono sufficienti evidenze per ritenere che percentuali di assorbimento sicuramente superiori all'8% possono manifestarsi per polveri comprese fra 1 e $5 \mu\text{m}$ e anche fra 5 e $10 \mu\text{m}$; c) la mancata valutazione di altre variabili delle polveri come il loro peso specifico, e la loro solubilità; ad es. alcuni sali di piombo vengono assorbiti in minor quantità data la loro bassa solubilità; d) la mancata previsione delle sensibili modificazioni del rapporto PbA/PbE, indotte dall'adozione di provvedimenti di prevenzione individuale e ben documentate anche recentemente [20].

Significato e limiti di alcuni indicatori di effetto

Rispetto alle puntualizzazioni, avvenute a fine anni '70 e inizio anni '80, su significato ed uso degli indicatori di effetto per il Pb [1], in anni recenti si sono approfonditi e sviluppati i seguenti aspetti: a) rivalutazione sia delle relazioni tra i diversi indicatori di effetto e di dose sia della possibilità di un utilizzo dei primi per valutare gli attuali livelli di esposizione lavorativa (intervalli di PbE compresi tra 30 e 50 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$); b) individuazione di tecniche analitiche con maggiore sensibilità e specificità, idonee quindi allo studio degli effetti indotti da dosi via via sempre più basse; c) individuazione di nuovi indicatori di effetto.

Per l'acido δ -aminolevulinico urinario (ALA-U) oltre ai problemi connessi con la raccolta delle urine ed alla normalizzazione del valore per la densità della stessa nei campioni spot, ve ne sono altri collegati con le tecniche analitiche oggi utilizzate, quali il metodo Davis e Andelman [21], caratterizzato sì da facile esecuzione e quindi pratico per attività di screening, ma non molto specifico. Ciò è dovuto in gran parte alla presenza di *ALA-like compounds* la cui interferenza aumenta nei casi di esposizioni a basse dosi di Pb e quindi con minori livelli di ALA-U indotti dal Pb. Alcuni autori [22] hanno quantificato il peso di tali interferenti intorno al 20% per valori di ALA-U superiori ai 15 mg/l e compreso tra il 20 e l'80% per valori inferiori. Per questi motivi sono state messe a punto nuove tecniche di separazione su colonna con lettura spettrofotometrica o tecniche liquido-cromatografiche [22-25] con le quali è stato possibile determinare con più precisione i bassi valori di ALA-U e si è notevolmente migliorata la correlazione tra ALA-U e PbE anche per valori di PbE al di sotto dei 35 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$.

Vanno poi ricordati alcuni problemi riguardanti la definizione del cut-off dell'ALA-U rispetto al valore limite della PbE. Infatti fissare, come nella direttiva 82/605/CEE, un valore limite di 20 mg/g creatinina per l'ALA-U pone delle difficoltà interpretative in quanto, a tale limite, dovrebbe corrispondere un valore di PbE sicuramente maggiore di 80 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$. In alcune normative nazionali si sono previsti valori più bassi (15 mg/l nelle norme tedesca ed italiana) ma non ancora tali da apparire del tutto esenti da critiche. Infatti in alcune indagini si sono proposti valori di cut-off per PbE di 60 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ rispettivamente di 10 [26] e 5 mg/l [27].

La dimostrata correlazione della zincoprotoporfirina eritrocitaria (ZPP) con gli indicatori di dose interna e in particolare la sua capacità di individuare casi di eccessivo assorbimento di piombo, ha portato alcuni autori a considerare questo test oltre che indicatore di effetto precoce anche "parametro primario per lo screening di popolazioni esposte a piombo" ed "esame che può sostituire la PbE come indice preferenziale di esposizione a piombo" [28, 29]. L'impiego della sola ZPP in cam-

pagne di screening in ambito lavorativo è stato criticato per varie ragioni già negli anni passati. In particolare alcuni autori hanno evidenziato, a fronte di una validità diagnostica dai più ritenuta accettabile, una bassa sensibilità del test [30, 31]. La disponibilità di apparecchiature automatiche e trasportabili ha grandemente diffuso l'impiego del test anche se alcuni autori [32, 33] hanno posto l'accento sulla variabilità e lo scarso controllo della qualità analitica nei dosaggi della ZPP con ematofluorimetro. Il problema maggiore appare comunque quello della bassa sensibilità del test, già sottolineato da autori statunitensi, per gli screening nella popolazione generale [34]. In una indagine su popolazioni lavorative [32] è stato dimostrato che l'uso del test ZPP per la previsione di PbE < 40 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ sia caratterizzato da una bassa sensibilità, con elevate percentuali di falsi negativi anche adottando il livello minore di ZPP (2,0 $\mu\text{g}/\text{g Hb}$). In questo caso inoltre la relazione tra le due variabili (PbE e ZPP) non è lineare ed i valori di sensibilità e specificità sono determinati anche dall'intervallo di valori della variabile indipendente in cui cadono le osservazioni. Infatti la ZPP ben si correla (fase di massima pendenza nella curva dose risposta) con la PbE per valori di PbE variamente collocati dai diversi autori tra 45 e 60 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$. Per esposizioni a Pb di grado medio-basso, cioè tali da indurre livelli di PbE da 30 a 40 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, l'uso della ZPP come test di screening non appare consigliabile, e, se ci si dovesse orientare verso un esame unico, sarebbe più opportuno scegliere la PbE, essendo questo l'indicatore che meglio di altri è in grado di stimare l'esposizione a piombo. La ZPP resta comunque un indicatore d'effetto utile nel monitoraggio biologico (anche in considerazione della praticità ed economicità del suo dosaggio), che, se associata alla PbE, fornisce una informazione complementare. Mentre infatti la PbE riflette l'esposizione corrente, la ZPP è in grado di valutare indirettamente i depositi attivi di Pb e l'esposizione avvenuta nei 120 giorni precedenti il prelievo, riflettendo quindi una esposizione cumulativa [35].

Dopo le prime osservazioni relative alla inibizione del Pb sulla pirimidin-5-nucleotidasi (P5N) [36, 37], si sono susseguiti vari studi che hanno condotto ad una messa a punto dei metodi analitici [38, 39] e ad una più attenta valutazione dei valori della P5N nella popolazione generale [40] e del rapporto tra l'inibizione della P5N e quella di altri enzimi come la desossi P5N e l'arginasi [41].

E' generalmente accettato che il Pb inibisca la P5N, anche se *in vitro* l'azione sarebbe più evidente per altri metalli come Cd e Mg [42] e se i coefficienti di correlazione tra PbE e P5N variano sensibilmente da autore ad autore, forse a causa della criticità del tempo di esposizione rispetto alla entità dell'inibizione. Inoltre è stato sottolineato [43] come l'inibizione della P5N sia un processo lento, e quindi meglio evidenziabile nelle esposizioni croniche, e che le concentrazioni dell'acido δ -

aminolevulinico deidratasi (ALA-D) variano in dipendenza della dose in modo più evidente. Per queste ragioni la P5N non pare un indicatore utilizzabile routinariamente per il controllo di popolazioni professionalmente esposte a Pb.

Aggiornamento sui principali effetti del Pb

Di seguito saranno aggiornate le informazioni riguardanti alcuni dei principali effetti del Pb sull'uomo adulto, focalizzando l'attenzione in particolare su quelli correlabili con le esposizioni oggi di più frequente riscontro. Si tralasceranno pertanto gran parte degli effetti dimostrati da tempo, specie per elevati assorbimenti di metallo e per i quali si rimanda a quanto già noto e ampiamente valutato in sede di agenzie e organismi internazionali [44, 45].

Effetti neurotossici

Sistema nervoso centrale. - Vari studi hanno evidenziato nei lavoratori esposti a Pb una maggiore frequenza di disturbi e sintomi neuropsichici in percentuali comprese tra il 50 ed il 90%, con una relazione dose-effetto, anche se non precisa, per livelli di esposizione che variavano tra i 30 ed i 70 µg/100 ml di PbE [46-48].

Le funzioni psichiche superiori (attenzione, vigilanza, concentrazione, memoria, apprendimento), assieme ai tratti della personalità e dello stato dell'umore, sono stati gli aspetti più studiati come nello studio condotto da Baker *et al.* [49]. In un gruppo di 99 lavoratori (PbE comprese fra 13 ed 80 µg/100 ml) si evidenziarono una riduzione della performance alle prove verbali del *Wechsler adult intelligence scale* (WAIS), alle prove psicomotorie e di memoria ed alterazioni dell'umore. Tali effetti risultarono più accentuati nei lavoratori con PbE compresa tra 60 e 90 µg/100 ml.

Un'altra indagine [50] ha preso in considerazione 40 lavoratori di un'industria di accumulatori, suddivisi in due sottogruppi, con livelli di PbE compresi tra 45 e 60 µg/100 ml e inferiori a 35 µg/100 ml, e 20 soggetti di controllo. La PbE risultò, nel gruppo a più elevata esposizione, associata al calo della performance di percezione e psicomotoria. Elevati livelli di PbE risultarono inoltre associati con un maggior numero di sintomi ($r = 0,51$; $p < 0,01$). Per gli autori le alterazioni riscontrate paiono attribuibili ad una riduzione globale della performance più che ad alterazioni di funzioni psichiche specifiche.

Uno studio [51] condotto su una più ampia casistica di 288 lavoratori sempre dell'industria degli accumulatori (valori medi di PbE di 40,0 µg/100 ml, con una deviazione standard di 13,2 µg/100 ml), ha dimostrato differenze significative unicamente nel test di destrezza e velocità motoria e gli autori concludono per l'assenza di un evidente interessamento delle funzioni neuro-

psichiche a bassi livelli di esposizione a Pb. In un gruppo di 59 lavoratori maschi di un'industria di accumulatori e di un impianto di seconda fusione del Pb (PbE media di 49,6 µg/100 ml, intervallo 25-82,3 µg/100 ml) i risultati dei test evidenziarono una riduzione delle prestazioni alle prove di memoria a breve termine e di memoria di apprendimento. Una correlazione tra i risultati delle prove e i livelli di PbE risultò unicamente per uno dei test di memoria, il *sensory state memory*.

Sistema nervoso periferico. - Nello studio di Seppalainen *et al.* [52] - che ha rappresentato per anni, anche se sottoposto a pesanti critiche, il punto di riferimento in tema di neuropatia da Pb - venne osservato che parametri quali la velocità di conduzione sensitiva (VCS) e la velocità di conduzione motoria (VCM) erano correlati, in un gruppo di 61 lavoratori, con i valori medi di PbE (33,4 µg/100 ml). Gli indicatori più sensibili dell'azione neurotossica del Pb risultarono il rallentamento della velocità di conduzione delle fibre del nervo ulnare e l'aumento della latenza nella conduzione motoria del nervo mediano.

Per verificare l'eventuale tempo di latenza fra l'inizio dell'esposizione e l'instaurarsi degli effetti, venne successivamente [53] esaminato un gruppo di lavoratori neoassunti e si osservò, a distanza di un anno dall'inizio dell'esposizione, una significativa riduzione della VCS al nervo mediano; tale effetto venne evidenziato per livelli di PbE inferiori a 40 µg/100 ml.

Anche a seguito delle numerose critiche avanzate ai ricercatori scandinavi, vale la pena di prendere in esame una rassegna curata da Ehle [54], in cui sono state esaminate 19 pubblicazioni scientifiche riguardanti lo studio elettromiografico di soggetti esposti a Pb. Negli studi considerati, i livelli di PbE erano risultati compresi fra 30 e 60 µg/100 ml, con l'eccezione di 2 studi in cui i livelli erano superiori a 80 µg/100 ml. La VCM è risultata diminuita nel 40% delle osservazioni. In particolare tale diminuzione è stata rilevata nel 55% delle misurazioni effettuate al nervo mediano e nel 60% di quelle effettuate al nervo tibiale posteriore; non sono invece state rilevate alterazioni significative nel 75% delle misurazioni eseguite sul nervo ulnare e nel 77% di quelle relative al nervo peroneale. La VCS, sebbene studiata in un minor numero di lavori rispetto alla VCM, è risultata alterata nel 53% degli studi. Tale alterazione è stata rilevata nell'83% delle misurazioni eseguite sul nervo mediano e nel 50% di quelle eseguite sul nervo surale. La VCS è risultata normale nel 71% delle misurazioni sul nervo ulnare. Lo studio della correlazione tra velocità di conduzione nervosa e i livelli di PbE non ha evidenziato una associazione significativa per livelli di PbE inferiore a 70 µg/100 ml. Le alterazioni elettromiografiche significative sono state rilevate unicamente per quadri clinici manifesti di intossicazione da Pb.

Effetti cardiovascolari

E' generalmente accettato, sulla base di evidenze del passato [44] e di più recenti rassegne sugli effetti tossici del Pb sull'apparato cardiovascolare [55], che il metallo sia in grado di indurre alterazioni a livello cardiaco.

Mentre l'indagine di Pocock *et al.* [56] ha escluso nella popolazione generale una relazione tra Pb e cardiopatia ischemica, in alcuni studi su popolazioni lavorative [57, 58] si sono dimostrate maggiori alterazioni elettrocardiografiche di tipo ischemico o una maggiore mortalità per cardiopatie. In altri studi, tali evidenze non sono state confermate [59, 60].

E' però quello del Pb sulla pressione arteriosa l'effetto che nell'ultimo decennio è stato più studiato sia con indagini epidemiologiche, soprattutto sulla popolazione generale, che sperimentali. Il punto sul quale si è incentrata l'attenzione e la discussione degli autori delle indagini epidemiologiche è se il Pb, nella relazione con la pressione arteriosa, possa essere considerato variabile indipendente. Per cercare di chiarire questo aspetto si è fatto ricorso a test statistici quali la regressione multipla, l'analisi della covarianza o ad altri test più complessi, al fine di eliminare o meglio, pesare correttamente, l'influenza di variabili diverse dal Pb ed in grado di modificare la pressione arteriosa. Queste variabili, in una delle analisi relative ai dati raccolti nel Second National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES II), sono state fatte assommare, in alcuni casi, a più di 30 e se ne è sottolineato nel contempo, da vari autori, il frequente ruolo di sovrapposizione e confondimento [61].

Nei vari studi epidemiologici su popolazione generale, si è osservata accanto alla correlazione significativa tra PbE ed ipertensione (sempre però con coefficienti di correlazione molto bassi intorno a 0,20) una contemporanea significativa correlazione con altre variabili indagate quali l'età, il BMI, l'emoglobina, la vitamina C, il potassio, il calcio, l'albumina, lo zinco (correlazione negativa).

Nel 1987 a Chapel Hill nel North Carolina, USA, si è tenuto, su questo tema, l'International symposium on lead-blood pressure relationship, le cui conclusioni sono da ritenersi, a nostro avviso, in gran parte ancora oggi valide [61]. In quella sede preponderanti nel formulare il giudizio furono i risultati ottenuti nell'ambito del NHANES II statunitense e del British regional heart survey (BRHS) e furono comunque sottolineate le seguenti esigenze che potevano diventare linee guida per future indagini: determinazione della consistenza delle relazioni osservate; correlazione con la dose; plausibilità biologica; riproducibilità sperimentale; validità dopo l'esclusione delle variabili di confondimento; numerosità del campione indagato. Si concluse comunque che - pur in modo diverso per pressione sistolica e diastolica, per maschi e femmine e per classi di età e dopo aver valutato il "peso" relativo di queste variabili - la PbE rimaneva

ancora significativamente correlata con la pressione arteriosa. Venne anche calcolato che, a un raddoppio della PbE, poteva corrispondere un aumento medio di pressione arteriosa compreso tra 1 e 5 mmHg. Inoltre, esplorando ampi intervalli di basse dosi (5-36 µg/100 ml), non era dimostrabile una dose soglia al di sotto della quale l'effetto non si manifestasse. Va comunque segnalato che gli stessi dati del BRHS e del NHANES II sono stati elaborati con diversi risultati da diversi autori [62-65].

Un altro aspetto interessante è che apparentemente un maggior incremento dei livelli pressori si realizza per più bassi valori di PbE. Questo potrebbe, tra l'altro giustificare la contraddizione tra la positività della maggior parte delle indagini epidemiologiche su popolazioni generali e negatività di gran parte di quelle condotte su popolazioni lavorative.

In una rassegna degli studi sperimentali condotti negli ultimi 40 anni sugli effetti del Pb sulla pressione arteriosa, Victery [66] ha riportato dati contrastanti per quanto concerne gli esperimenti ad alte dosi nei quali peraltro gli effetti osservati possono essere in gran parte attribuiti alla nefrotossicità del Pb. Negli studi relativi a basse dosi di esposizione invece i dati indicano in modo univoco la presenza degli effetti ipertensivi del Pb. Un'altra rassegna ad opera di Vander [67] ha considerato gli effetti del Pb sul sistema renina-angiotensina. Nei ratti, si osserva un aumento dell'attività reninica basale, per valori di PbE compresi fra 30 e 40 µg/100 ml ed in ratti di 1 mese, anche per PbE di 9 µg/100 ml.

Effetti sui sistemi contenenti eme

Oltre agli effetti sul metabolismo dell'eme a carico dell'eritropoiesi, sono stati segnalati [68] anche effetti precoci a livello di sistemi enzimatici contenenti l'eme, quali il citocromo P-450, ed effetti sul metabolismo della vitamina D che richiede, per l'idrossilazione della 2,5 diidrossivitamina D, una idrossilasi presente a livello renale contenente eme. Lo stesso argomento è stato affrontato da Silbergeld [69], che afferma che la deplezione dei depositi di eme può influenzare un ampio numero di sistemi enzimatici. Ciò potrebbe a sua volta indurre effetti neurotossici, per la sottrazione di eme dalle reazioni ossidative nei citocromi. L'alterata sintesi dell'eme determinerebbe quindi una diminuzione della glia o di altri componenti, con conseguente alterazione delle interazioni tra neuroni e glia necessarie per la produzione di neurotrasmettitori. La ridotta produzione di eme potrebbe avere ripercussioni sulla produzione di due molecole coinvolte nei sistemi neuromodulatori, la glicina (precursore dell'ALA) e la serotonina. Le considerazioni riguardanti il ruolo dell'alterata produzione dell'eme nei meccanismi di tossicità del Pb sono importanti anche perché esiste una certa variabilità genetica

nella sensibilità dell'ALA-D all'azione del Pb, che potrebbe determinare diverse suscettibilità individuali. La definizione di indicatori biologici di effetti precoci sulla sintesi dell'eme, anche all'interno di altri sistemi enzimatici e dei citocromi, potrebbe in futuro fornire nuove basi per comprendere i meccanismi d'azione, le soglie d'azione e la reversibilità degli effetti.

Effetti mutageni e cancerogeni

La valutazione delle proprietà cancerogene e mutagene del Pb si basa su studi di tipo sperimentale su animali, su test a breve termine e su studi epidemiologici.

Molti studi in genere condotti più di 10 anni fa, sono stati rivolti alla valutazione delle proprietà cancerogene di sali solubili, prevalentemente acetato e subacetato di Pb, scelti sulla base della loro facilità di somministrazione.

Complessivamente, pur se presentano qualche limite di tipo metodologico - piccoli gruppi di animali, dati non precisi né sui ceppi utilizzati né sulle sopravvivenze, presenza di altri rischi concomitanti - gli studi sugli animali sono da considerarsi definitivi nel dimostrare le proprietà cancerogene dei sali solubili del Pb in roditori, poiché è stata dimostrata la cancerogenicità per diverse vie di esposizione, in vari organi, in un notevole numero di studi, in ambedue i sessi e con la presenza di una relazione dose-risposta.

L'International Agency for Research on Cancer (IARC) conclude affermando che per il Pb inorganico vi è sufficiente evidenza per la cancerogenicità negli animali, mentre l'evidenza è inadeguata per il Pb metallico ed il Pb ossido [70].

La United States Environmental Protection Agency (USEPA) afferma inoltre che da un punto di vista qualitativo, tutti i composti del Pb sono da considerarsi potenzialmente cancerogeni [45].

Alcuni studi di citogenetica sono stati condotti, prevalentemente negli anni '70, sui linfociti periferici di lavoratori esposti a Pb, impiegati in vari settori produttivi esponenti a Pb (fonderie di Pb, ceramica, produzione di batterie, produzione di ossidi di Pb, vigili urbani). Sono stati ottenuti risultati positivi in lavoratori che presentavano PbE comprese tra 10 e 100 µg/100 ml, e risultati negativi per PbE tra 46 e 120 µg/100 ml [71-73]. I differenti risultati sono peraltro imputabili principalmente a differenze di tipo metodologico ed a differenze nell'esposizione professionale, che appare non ben caratterizzata né quantificata.

Debole effetto è stato dimostrato su esposti con più di 50 µg/100 ml di PbE, mentre un incremento nella frequenza di *sister chromatide exchanges* (SCE) è stato riscontrato in 10 lavoratori esposti a Pb da lungo tempo, con PbE comprese tra 29 e 75 µg/100 ml e ZPP tra 50 e 750 mmol/l [74]. Tale dato è in accordo anche con studi sperimentali condotti *in vitro* su linfociti umani incubati

in presenza di Pb [75]. Huang *et al.* [76] hanno dimostrato un significativo aumento di frequenza di SCE in 21 operai con PbE superiore a 80 µg/100 ml. Apostoli *et al.* [77] non hanno osservato alcun incremento dell'attività mutagena delle urine in lavoratori esposti a Pb, di anzianità lavorativa media pari a circa 13 anni e PbE media di circa 50 µg/100 ml, rispetto ad un adeguato gruppo di controllo.

Sono disponibili, a partire dagli anni '60, i dati di alcuni studi epidemiologici condotti su popolazioni lavorative esposte a Pb inorganico. Uno studio su una coorte di lavoratori di una fabbrica di batterie in Inghilterra è stato intrapreso da Dingwall-Fordyce e Lane nel 1963 per essere poi ampliato e rivalutato da Malcom e Barnett [78] e più recentemente da Fanning [58]. I risultati globali del periodo di 60 anni di osservazione mostrano che l'*odds ratio* è vicino all'unità e che non si è notata alcuna differenza statisticamente significativa per ogni causa di morte, né eccessi di rischio per neoplasie maligne.

Il pattern della mortalità di 1987 soggetti che avevano lavorato per almeno 1 anno in una fonderia primaria di Pb tra il 1940 ed il 1965 è stato confrontato con la mortalità della popolazione bianca maschile degli Stati Uniti [79]. La mortalità per cancro non era globalmente aumentata nei lavoratori, tuttavia vi erano eccessi di rischio, seppur non statisticamente significativi, per tumori renali, respiratori e vescicali. Un tempo di esposizione superiore ai 20 anni e una latenza superiore ai 20 anni erano associate positivamente con i tumori dell'apparato respiratorio [79].

Cooper *et al.* [80] hanno seguito nel tempo, fino al 1980, una coorte composta da 6819 lavoratori, di cui 2300 impiegati in fonderie primarie e raffinerie di Pb e 4519 in fabbriche di recupero batterie. Tra i lavoratori delle batterie fu notato un eccesso di mortalità significativo dovuto a tutte le neoplasie, ai tumori dello stomaco e dell'apparato respiratorio (trachea, bronchi e polmoni), mentre non è risultato significativo l'eccesso di mortalità per tumori del fegato, della vescica e della laringe. Nel gruppo delle fonderie fu riscontrato un eccesso di mortalità per tutte le neoplasie. Non venne dimostrata alcuna correlazione con la durata dell'esposizione.

Gerhardsson *et al.* [59] hanno effettuato uno studio retrospettivo di mortalità su 3832 lavoratori, impiegati per almeno 3 anni e prima del 1967 presso una fonderia primaria di rame, relativamente agli anni compresi tra il 1950 e il 1981. Rispetto alle popolazioni di riferimento locali e nazionali utilizzate per calcolare le morti attese, i soggetti con alta esposizione hanno mostrato un incremento non significativo della mortalità per cancro polmonare, senza che peraltro fosse messa in evidenza una relazione dose-risposta.

Ades e Kazantzis [81] hanno compiuto uno studio di coorte retrospettivo per esaminare la mortalità per tumore polmonare in una coorte di 4393 soggetti impiegati in una fonderia primaria di zinco, cadmio e piombo. Lo

studio ha evidenziato un eccesso statisticamente significativo di mortalità per cancro polmonare, particolarmente evidente per coloro che erano impiegati da più di 20 anni, con correlazione significative con la durata di esposizione.

Uno studio caso-controllo è stato inoltre eseguito su 4173 lavoratori per valutare il ruolo di specifiche aree, processi o agenti inquinanti nel causare il tumore. Venti controlli appaiati sono stati scelti per ogni caso di cancro polmonare, per un totale di 2717 controlli. Il follow up è durato 10 anni e sono state ottenute da igienisti industriali stime dell'esposizione cumulativa a Cd, As, Zn, SO₂, polveri totali e Pb. Lo studio ha confermato il rischio di cancro del polmone, che è risultato correlato con la durata dell'esposizione. Inoltre, la mortalità per tale tumore è risultata correlata con l'esposizione cumulativa ad As e Pb. L'analisi non consente peraltro di discriminare se l'incremento del rischio sia dovuto al Pb, all'As o ad altri inquinanti.

Questo aspetto della non corretta valutazione dei diversi fattori di confondimento, siano essi lavorativi o non lavorativi è stato sottolineato da diversi autori, tanto da far concludere ad alcuni di essi [82] che, nonostante l'evidenza positiva di cancerogenicità in studi sperimentali, sulla base degli studi epidemiologici il Pb, se lo presenta, presenta un basso rischio cancerogeno per l'uomo.

Effetti sulla riproduzione

Il Pb è un metallo per il quale da tempo noti gli effetti tossici sulla riproduzione, sia a livello sperimentale su animali che su popolazioni professionalmente esposte. Le evidenze sono per lo più qualitative e mancano precise informazioni sulle relazioni dose-risposta. La maggior parte degli studi sperimentali sono stati condotti su roditori, ma sono disponibili anche ricerche su primati. Le esperienze hanno dimostrato che il Pb esercita un effetto tossico sulle gonadi dei roditori - con degenerazione dell'epitelio germinale, delle cellule del Leydig e del Sertoli, con riduzione del peso dei testicoli - ed è in grado di indurre infertilità o riduzione della fertilità.

Nei roditori, è stata inoltre dimostrata oligospermia, riduzione della motilità degli spermatozoi ed inibizione della spermatogenesi. In sintesi, PbE superiori a 70 µg/100 ml determinano riduzione del peso testicolare, PbE superiori a 60 µg/100 ml causano diminuzioni degli spermatozoi, PbE di 32 µg/100 ml condizionano degenerazione di spermatociti e spermatidi, PbE di 17 µg/100 ml determinano anomalie delle cellule del Sertoli. Va peraltro riportato che alcuni studi, per PbE comprese tra 10 e 65 µg/100 ml non hanno riscontrato alcun effetto sullo sperma o sull'apparato riproduttivo maschile.

Un numero relativamente scarso di studi è stato condotto su lavoratori esposti per la valutazione degli effetti del Pb sulla riproduzione. Lo studio più noto,

citato e discusso è quello di Lancranjan *et al.* che hanno dimostrato un effetto sulla spermatogenesi, astenospermia e ipospermia [83]. Un'altra ricerca è stata condotta da Wildt *et al.* [84], che hanno studiato in lavoratori esposti (PbE media 46,1 µg/100 ml) la qualità del liquido seminale, non riscontrando alcuna differenza rispetto ai soggetti di controllo.

Fischer-Fischbein *et al.* [85] hanno riportato un caso di infertilità in un istruttore per l'uso di armi da fuoco, ricoverato con una PbE di 88 µg/100 ml. La terapia chelante indusse un miglioramento sia nella conta che nella motilità degli spermatozoi, con il ripristino di una condizione di fertilità.

Cullen *et al.* [86], in 7 soggetti con PbE compresa tra 66 e 139 µg/100 ml hanno riscontrato difetti della spermatogenesi in cinque soggetti, dei quali due presentavano azoospermia e due oligospermia.

Tuohimaa e Wichmann [87] hanno studiato il liquido seminale di 19 lavoratori di una fonderia di metalli, la cui PbE variava tra 30 e 60 µg/100 ml al momento dell'analisi, ma che in passato per tutti era risultata superiore a 60 µg/100 ml dimostrando una ipospermia ed un'astenospermia in due lavoratori.

Studi condotti su donne con intossicazione da Pb hanno messo in evidenza una riduzione della fertilità e un incremento degli aborti spontanei, delle malformazioni e dei nati pretermine [88].

Needleman *et al.* [89] hanno esaminato 4354 nati con malformazioni congenite, per valutarne la relazione con la PbE materna. Essi hanno suddiviso le PbE in 4 gruppi (< 4,8; 4,9-6,5; 6,6-8,6; 8,7-35 µg/100 ml) ed hanno riscontrato una correlazione lineare delle malformazioni totali classificate come "minori", con l'incremento della PbE.

McMichael *et al.* [90] e Baghurst *et al.* [91] hanno studiato 774 gravidanze, in una città in cui era attiva una fonderia primaria di Pb. La PbE media materna era pari a 11,2 µg/100 ml, mentre nel cordone era pari a 10,1 µg/100 ml, con valori superiori a quelli del gruppo di controllo. È stato evidenziato un lieve incremento di parti pretermine correlato con l'incremento dei livelli di Pb del cordone. Non è stata rilevata alcuna associazione con aborti, malformazioni o basso peso alla nascita.

Uno studio nel quale sono state controllate 511 donne impiegate in una fabbrica di cuproleghe (e quindi esposte non solo a Pb) ha dimostrato una maggiore frequenza di aborti, frequenza che aumentava anche nelle mogli di operai che lavoravano nella fabbrica [92, 93]. Anche in un gruppo di donne i cui mariti erano esposti a Pb è stata dimostrata una diminuzione del tasso di natalità [94].

Discussione e conclusioni

Gli elementi che oggi limitano maggiormente le conoscenze tossicologiche sul Pb possono essere così riassunti: a) difficoltà nel dimostrare l'esistenza di preci-

se relazioni dose-risposta da cui deriva l'impossibilità di definire dei livelli di non effetto; spesso pertanto le nostre conoscenze restano prevalentemente qualitative; b) difficoltà nella estrapolazione delle curve dose-risposta per dosi comprese tra i 60-70 µg/100 ml e i limiti superiori degli intervalli di PbE della popolazione generale (10-20 µg/100 ml); c) difficoltà nel trasferire all'uomo dati sperimentali ottenuti sull'animale; d) difficoltà nell'interpretare i dati epidemiologici perché spesso sono carenti o assenti le informazioni sulle caratteristiche dell'esposizione (solo Pb, Pb più altri metalli; Pb più altri composti chimici); la quantificazione corretta della esposizione (per assenza di dati di monitoraggio ambientale e/o biologico attuabili e riferiti ai periodi in cui le patologie possono essere insorte); una corretta valutazione dei fattori di confondimento extralavorativi o individuali; e) difficoltà nel distinguere gli effetti da Pb cui si è esposti in ambito lavorativo da quelli del Pb ambientale-alimentare, specie per le basse-bassissime dosi di metallo; f) possibilità di effetti combinati con altri metalli o tossici organici lavorativi ed extralavorativi; g) carenze di strumenti e metodi per lo studio dei meccanismi e la dimostrazione di effetti a livello subcellulare, cellulare o tissutale. A fronte di questo tipo di difficoltà dovrebbero essere rivisti alcuni principi dei modelli preventivi finora adottati anche perché probabilmente semplici aggiustamenti degli attuali limiti non appaiono sufficienti a controllare effetti così vari per natura e graduazione. Se infatti da una parte sono stati finora conseguiti importanti risultati quali la riduzione o la scomparsa delle classiche manifestazioni cliniche da intossicazione da Pb, dall'altra sono stati confermati o scoperti effetti per livelli di PbE ben al di sotto dei valori limite attualmente fissati dalle normative europee (70-80 µg/100 ml) e in Italia (60-70 µg/100 ml) dal Decreto Legislativo 277/91 [95].

Si richiama inoltre l'attenzione su effetti (quali quelli sull'eme, sul SNC e sulla pressione arteriosa) per i quali è difficile proporre una soglia mentre resta ancora in parte aperta la problematica del Pb come mutageno-cancerogeno.

Andrebbe pertanto valutata l'opportunità di proporre un modello di intervento che si ponga obiettivi differenziati:

- l'annullamento degli effetti dose dipendenti che si manifestano per esposizioni superiori a quelle della popolazione generale;

- la riduzione al più basso livello possibile degli effetti senza soglia (o a soglia non ancora accertata) attraverso interventi preventivi e normativi rivolti non solo ai lavoratori ma anche alla popolazione generale.

Potrebbe rientrare nel primo obiettivo la prevenzione di quegli effetti che riconoscono, allo stato attuale delle conoscenze, una soglia per livelli di PbE compresi tra 40 e 50 µg/100 ml.

Effetti descritti per PbE più basse non appaiono controllabili se non con azioni che vanno oltre l'ambito lavorativo, esistendo un "fondo naturale" di Pb, che

permanerà nei prossimi decenni, in grado di determinare valori di PbE come quelle oggi dimostrabili nella popolazione generale e per i quali già sono stati dimostrati effetti.

Ciò rimanda al necessario collegamento tra valori limite in ambito lavorativo e valori di riferimento (o anche limite) per la popolazione generale.

Se l'obiettivo è la prevenzione nei luoghi di lavoro degli effetti correlabili con un assorbimento di Pb superiore a quello che si realizza nella popolazione generale, il grado di esposizione della popolazione generale è un elemento di riferimento fondamentale per stabilire livelli di azione motivati e sostenibili.

Una modalità di definizione dei livelli di azione e di valori limite potrebbe essere quella di prevederli non in termini assoluti ma relativi rispetto ai valori riscontrati nella popolazione generale cui appartengono i lavoratori. Si fisserebbero così non valori assoluti, ma percentuali di incremento che tengano conto da un lato dell'entità della PbE della popolazione generale e dall'altro di valori operativi (livelli di azione, valori limite). Una simile scelta appare però di difficile realizzazione non solo per la mancata definizione dei presupposti scientifici relativi al significato tossicologico degli incrementi di dose, ma anche per alcuni aspetti applicativi quale quello della necessità di disporre di dati di PbE di partenza disaggregati, non solo per paese, ma per specifiche aree di uno stesso paese.

Appare più realistico adottare ancora livelli operativi generali, invitando i singoli paesi ad adeguarli alle diverse condizioni espositive realmente esistenti ed al loro modificarsi nel tempo. Questo resta però un tema di grande interesse su cui varrebbe la pena di programmare adeguate ricerche.

Lavoro presentato su invito.

Accettato il 29 luglio 1997.

BIBLIOGRAFIA

1. ALESSIO, L. & FOÀ, V. 1983. *Lead*. L. Alessio, A. Berlin, M. Boni & R. Roy (Eds). CEE, Luxembourg. (CEE monographs on human biological monitoring of industrial chemicals). p. 105-132.
2. FISHER, H.L. 1969. A model for estimating the inhalation exposure to radon 222 and daughter products from the accumulated lead 210 body burden. *Health Phys.* **16**: 597-616.
3. AHLGREN, L., HAEGER-ARONSEN, B., MATTSSON, S. & SCHUTZ, A. 1980. *In vivo* determination of lead in the skeleton following occupational exposure. *Br. J. Ind. Med.* **37**: 109-113.
4. RABINOWITZ, M.B., WETHERILL, G.W. & KOPPLE, J.D. 1977. Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *J. Clin. Invest.* **58**: 260-270.
5. BATSCHELET, E., BRAND, L. & STEINER, A. 1979. On the kinetics of lead in human body. *J. Math. Biol.* **8**: 15-23.
6. CHAMBERLAIN, A.C. 1985. Prediction of response of blood lead to airborne and dietary lead from volunteer experiments with lead isotopes. *Proc. R. Soc. London B. Biol. Sci.* **224**: 149-182.

7. BERNARD, S.R. 1977. Dosimetric data and metabolic model for lead. *Health Phys.* **32**: 44-46.
8. BERT, J.L., VAN DUSEN, L.J. & GRACE, J.R. 1989. A generalized model for the prediction of lead body burdens. *Environ. Res.* **48**: 117-127.
9. MARCUS, A.H. 1985. Multicompartmental kinetic model for lead. *Environ. Res.* **36**: 459-472.
10. GRIFFIN, T.B., COULSTON, F., WILLS, H. & RUSSEL, J.C. 1975. Clinical studies on men continuously exposed to airborne particulate lead. *Environ. Qual. Saf. Suppl.* **2**: 254-288.
11. HAMMOND, P.B., O'FLAHERTY, J. & GARTSIDE, P.S. 1981. The impact of air-lead on blood-lead in man: critique of the recent literature. *Food Cosmet. Toxicol.* **19**: 631-638.
12. CHAMBERLAIN, A.C. 1983. Effect of airborne lead on blood lead. *Atmos. Environ.* **17**: 2366-2367.
13. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1986. *Air quality criteria for lead*. US Environmental Protection Agency (EPA-600/8-83/028a-dF).
14. SNEE, R.D. 1981. Evolution of studies of the relationship between blood lead and air. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **48**: 219-242.
15. ANGLE, C.R., MARCUS, A. & CHENG, I.H. 1984. Omaha childhood blood lead and environmental lead: a linear total exposure model. *Environ. Res.* **35**: 160-170.
16. ASHFORD, N.A., GECHT, R.D., HATTIS, D.B. & KATZ, J.I. 1977. *The effects of OSHA medical removal protection on labor costs of selected lead industries*. US Department of Labor Massachusetts Institute of Technology, Center for Policy Alternatives, Cambridge, MA. (Report n. CPA 77/11).
17. KING, E., CONCHIE, A., HIETT, D. & MILLIGAN, B. 1979. Industrial lead absorption. *Ann. Occup. Hyg.* **22**: 213-239.
18. FROINES, J.R., WEN CHEN, V.L., HINDS, W.C. & WEGMEN, D.M. 1986. Effects of aerosol size on the blood lead distribution of industrial workers. *Am. J. Ind. Med.* **9**: 227-237.
19. HODGKINS, D.G., HINKAMP, D.L., ROBINS, T.G., LEVIN, S.P., SCHOCK, M.A. & KREBS, W.M. 1990. Air lead particle size in battery manufacturing: potential effects on the OSHA compliance model. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* **5**: 518-525.
20. ULENBELT, P., LUMENS, M.E., GERON, H.M., HERBER, R.F., BROERSEN, S. & ZIELHUIS, R.L. 1990. Work hygienic behaviour as modifier of the lead air-lead blood relation. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **62**: 203-207.
21. DAVIS, J.R. & ANDELMAN, S.L. 1967. Urinary delta aminolevulinic acid levels in lead poisoning. A modified method for the rapid determination of urinary delta aminolevulinic acid using disposable ion-exchange chromatographic columns. *Arch. Environ. Health* **15**: 53-59.
22. WITTING, U., BINDING, M. & MULLER, G. 1987. Evaluation of a new specific analysis of urinary delta aminolevulinic acid in man. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **59**: 375-383.
23. OGATA, M. & TAGUCHI, T. 1987. High performance liquid chromatographic procedure for quantitative determination of urinary delta-aminolevulinic acid as indices of lead exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **59**: 385-391.
24. OKAYAMA, A., OGAWA, Y., MIYAJIMA, K., HIRATA, M., YOSHIDA, T., TABUCHI, T., SUGIMOTO, K. & MORIMOTO, K. 1989. A new HPLC fluorimetric method to monitor urinary delta-aminolevulinic acid (ALA-U) levels in workers exposed to lead. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **61**: 297-302.
25. OKAYAMA, A., FUJII, S. & MIURA, R. 1990. Optimized fluorometric determination of urinary delta-aminolevulinic acid by using pre-column derivatization, and identification of the derivative. *Clin. Chem.* **36**: 1494-1497.
26. ALESSIO, L., BERTAZZI, P.A., TOFFOLETTO, F. & FOÀ, V. 1976. Free erythrocyte protoporphyrin as an indicator of the biological of lead in adult males. II. Comparison between free erythrocyte protoporphyrin and other indicators of effect. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **37**: 89-105.
27. LETOURNEAU, G.G., PLANTE, R. & WEBER, J.P. 1988. Blood lead and maximal urinary excretion of delta-aminolevulinic acid. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **49**: 342-345.
28. JOSELOW, M.M. & FLORES, J. 1977. Application of zinc protoporphyrin test as a monitor of occupational exposure to lead. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **38**: 63-66.
29. WILDT, K., BERLIN, M. & ISBERG, P.E. 1987. Monitoring of ZPP levels in blood, following occupational lead exposure. *Am. J. Ind. Med.* **12**: 385-398.
30. GRANDJEAN, P. & LINTRUP, J. 1979. Erythrocyte Zn protoporphyrin as an indicator of lead exposure. *Scand. J. Clin. Lab.* **38**: 669-675.
31. TELISMAN, S., KRSAMC, A. & PRIPC-MAJIC, D. 1982. The relevance of arguments for excluding ALA D from the recommended biological limit values in occupational exposure to inorganic lead. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **50**: 397-412.
32. APOSTOLI, P. & MARANELLI, G. 1986. Impiego della ZPP nel controllo biologico di popolazioni lavorative esposte a piombo metallico. *Med. Lav.* **77**: 529-537.
33. VERSCHOOR, M., WIBOWO, A. & HERBER, R. 1987. Influence of occupational low level lead exposure on renal parameters. *Am. J. Ind. Med.* **12**: 341-351.
34. MITCHELL, D.G. & DORAN, D. 1985. Effect of bias in hematofluorometer measurements of ZPP in screenings programs for lead poisoning. *Clin. Chem.* **31**: 386-390.
35. ALESSIO, L. 1988. Relationship between "chelatable lead" and the indicators of exposure and effect in current and post occupational exposure. *Sci. Total Environ.* **71**: 293-299.
36. PAGLIA, D.E., VALENTINE, W. & FINK, K. 1977. Lead poisoning. Further observations on erythrocyte pyrimidine-nucleotidase deficiency and intracellular accumulation of pyrimidine nucleotides. *J. Clin. Invest.* **60**: 1362-1366.
37. ANGLE, C. & MCINTIRE, M. 1978. Low level lead and inhibition of erythrocyte pyrimidine nucleotidase. *Environ. Res.* **17**: 296-302.
38. COOK, L.R., ANGLE, C.R. & STHOTS, S. 1986. Pyrimidine 5'-nucleotidase (P5N), and deoxypyrimidine 5'-nucleotidase (dP5N) as indices of lead exposure. *Br. J. Ind. Med.* **42**: 387-390.
39. TOMOKUNI, K. & ICHIBA M. 1988. Comparison of inhibition of erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase and delta-aminolevulinic acid dehydratase by lead. *Toxicol. Lett.* **40**: 159-163.

40. SAKAI, T. & USHIO, K. 1986. A simplified method for determining erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase (P5N) activity by HPLC and its value in monitoring lead exposure. *Br. J. Ind. Med.* **43**: 839-844.
41. COOK, L., SCHAFER-MITCHELL, M., ANGLE, C. & STHOTS, S. 1985. Assay of human erythrocyte pyrimidine and deoxypyrimidine 5'-nucleotidase by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **339**: 293-301.
42. MOHAMMED-BRAHIM, B., BUCHET, J.P., BERNARD, J. & LAUWERYS, R. 1984. *In vitro* effects of lead, mercury, and cadmium on the enzymatic activity of red blood cell pyrimidine 5'-nucleotidase. *Toxicol. Lett.* **20**: 195-199.
43. ONG, C.N., KONG, Y.M., ONG, H.Y. & TERAMOTO, K. 1989. The *in vitro* and *in vivo* effects of lead on delta-aminolevulinic acid dehydratase and pyrimidine 5'-nucleotidase. *Pharmacol. Toxicol.* **66**: 23-26.
44. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1977. *Lead*. WHO, Geneva. (Environmental Health Criteria, 3). p. 160.
45. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1986. Guidelines for carcinogenic risk assessment. *Fed. Reg.* **51**: 33992-34003.
46. HANNINEN, H., MANTERE, P., HERNBERG, S., SEPPALAINEN, A.M. & KOCK, B. 1979. Subjective symptoms in low-level exposure to lead. *Neurotoxicology* **1**: 333-347.
47. FISCHBEIN, A., THORNTON, J., BLUMBERG, W.E., BERNSTEIN, J., VALCIUKAS, J.A., MOSES, M., DAVIDOW, B., KAUL, B., SIROTA, M. & SELIKOFF, I.J. 1980. Health status of cable splicers with low-level exposure to lead: results of a clinical survey. *Am. J. Publ. Health* **70**: 697-700.
48. AWADEL KARIM, M.A., HAMED, A.S., ELHAIMI, Y.A.A. & OSMAN, Y. 1986. Effects of exposure to lead among lead acid battery factory workers in Sudan. *Arch. Environ. Health* **41**: 261-265.
49. BAKER, E.L., FELDMAN, R.G., WHITE, R.A., HARLEY, J.P., NILES, C.A., DINSE, G.E. & BARKEY, C.S. 1984. Occupational lead neurotoxicity: a behavioural and electrophysiological evaluation. *Br. J. Ind. Med.* **41**: 352-359.
50. CAMPARA, P., D'ANDREA, F., MICCIOLO, R., SAVONITTO, C., TANSELLA, M. & ZIMMERMAN-TANSELLA, C.H. 1984. Psychological performance of workers with blood lead concentration below the current threshold limit. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **53**: 233-246.
51. PARKINSON, D.K., RYAN, C., BROMET, E.J. & CONNELL, M.M. 1986. A psychiatric epidemiologic study of occupational lead exposure. *Am. J. Epidemiol.* **123**: 261-269.
52. SEPPALAINEN, A.M., HERNBERG, S. & KOCK, B. 1979. Relationship between blood lead levels and nerve conduction velocities. *Neurotoxicology* **1**: 313-332.
53. SEPPALAINEN, A.M. & HERNBERG, S. 1982. A follow up study of nerve conduction velocities in lead exposed workers. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* **4**: 721-723.
54. EHLE, A.L. 1986. Lead neuropathy and electrophysiological studies in low level lead exposure: a critical review. *Neurotoxicology* **7**: 203-216.
55. KOPP, S.J., BARRON, J.T. & TOW, J.P. 1988. Cardiovascular actions of lead and relationship to hypertension: a review. *Environ. Health Perspect.* **89**: 1-99.
56. POCOCK, S.J., SHAPER, A.G., ASHBY, D., DELVES, H.T. & CLAYTON, B.E. 1988. The relationship between blood lead, blood pressure, stroke and heart attacks in middle aged British men. *Environ. Health Perspect.* **78**: 23-30.
57. KIRKBY, H. & GYNTELBERG, F. 1985. Blood pressure and other cardiovascular risk factors of long term exposure to lead. *Scand. J. Work Environ. Health* **11**: 15-19.
58. FANNING, D. 1988. A mortality study of lead workers, 1926-1985. *Arch. Environ. Health* **43**: 247-251.
59. GERHARDSSON, L., LUNDSTROM, N.G., NORDBERG, G. & WALL, S. 1986. Mortality and lead exposure: a retrospective cohort study of Swedish smelter workers. *Br. J. Ind. Med.* **43**: 707-712.
60. SELEVAN, S.G., LANDRIGAN, P.J., STERN, F.B. & JONES, J.H. 1988. Brief report: lead and hypertension in a mortality study of lead smelter workers. *Environ. Health Perspect.* **78**: 65-66.
61. Symposium on lead-blood pressure relationships. 1988. W. Victory (Ed.). Chapel Hill, NC, 27-29 April 1987. *Environ. Health Perspect.* **78**: 3-139.
62. POCOCK, S.J., SHAPER, A.G., ASHBY, D., DELVES, T. & WHITEHEAD, T.P. 1984. Blood lead concentration, blood pressure, and renal function. *Br. Med. J.* **289**: 872-874.
63. HARLAN, W.R., LANDIS, J.R., SCHMOUDER, R.L., GOLDSTEIN, N.G. & HARLAN, L.C. 1985. Blood lead and blood pressure: relationship in the adolescent and adult US population. *JAMA* **253**: 530-534.
64. PIRKLE, J.L., SCHWARTZ, J., LANDIS, J.R. & HARLAN, W.R. 1985. The relationship between blood lead levels and blood pressure and its cardiovascular risk implications. *Am. J. Epidemiol.* **121**: 246-258.
65. GARTSIDE, P.S. 1988. The relationship of blood lead levels and blood pressure in NHANES II: additional calculations. *Environ. Health Perspect.* **78**: 31-34.
66. VICTERY, W. 1988. Evidence for effects of chronic lead exposure on blood pressure in experimental animals: an overview. *Environ. Health Perspect.* **78**: 71-76.
67. VANDER, A.J. 1988. Chronic effects of lead on the renin-angiotensin system. *Environ. Health Perspect.* **78**: 77-83.
68. GOYER, R.A. 1990. Lead toxicity: from overt to subclinical to subtle health effects. *Environ. Health Perspect.* **86**: 177-181.
69. SILBERGELD, E.K. 1990. Toward the twenty first century: lessons from lead and lessons yet to learn. *Environ. Health Perspect.* **86**: 191-196.
70. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. 1987. *Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42*. IARC, Lyon (IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, suppl. 7). p. 230-232
71. SCHMID, E., BAUCHINGER, M., PIETRUK, S. & HALL, G. 1972. Cytogenic action of lead in human peripheral lymphocytes *in vitro* and *in vivo*. *Mutat. Res.* **16**: 401-406.

72. FORNI, A., CAMBIAGHI, G. & SECCHI, G.C. 1976. Initial occupational exposure to lead: chromosome and biochemical findings. *Arch. Environ. Health* **31**: 73-78.
73. NORDENSON, I., BECKMAN, G., BECKMAN, L. & NORSTROM, S. 1978. Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. IV. Chromosomal aberrations in workers exposed to lead. *Hereditas* **88**: 263-267.
74. GRANDJEAN, P., WULF, H.C. & NIERBUHR, E. 1983. Sister chromatid exchange in response to variations in occupational lead exposure. *Environ. Res.* **32**: 199-204.
75. ANDERSEN, O., WULF, H.C., RONNE, M. & NORDBERG, G.F. 1982. Effects of metals on sister chromatid exchanges in human lymphocytes and Chinese hamster V79-Ecells. In: *Prevention of occupational cancer*. ILO, Geneva. (ILO Occupational Safety and Health Series). p. 491-450.
76. HUANG, X.P., FENG, Z.Y., ZHAI, W.L. & XU, J.H. 1988. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in workers exposed to lead. *Biomed. Environ. Sci.* **1**: 382-387.
77. APOSTOLI, P., LEONE, R., PORRU, S., FRACASSO, M.E. & ALESSIO, L. 1989. Urinary mutagenicity test in lead-exposed workers. *Mutat. Res.* **222**: 245-251.
78. MALCOM, D. & BARNETT, H.A.R. 1982. A mortality study of lead workers 1925-1976. *Br. J. Ind. Med.* **39**: 404-410.
79. SELEVAN, S.G., LANDRIGAN, P.J., STERN, F.B. & JONES, J.H. 1985. Mortality of lead smelter workers. *Am. J. Epidemiol.* **122**: 673-683.
80. COOPER, W.C., WONG, O. & KHEIFETS, L. 1985. Mortality among employees of lead battery plants and lead-producing plants 1947-1980. *Scand. J. Work Environ. Health* **11**: 331-345.
81. ADES, A.E. & KAZANTZIS, G. 1988. Lung cancer in a non ferrous smelter. The role of cadmium. *Br. J. Ind. Med.* **45**: 435-422.
82. GOYER, R.A. 1992. Nephrotoxicity and carcinogenicity of lead. *Fundam. Appl. Toxicol.* **18**: 1-16.
83. LANCRANJAN, I., POPESCU, H.I., GAVANESCU, O., KLEOSCH, I. & SERBANESCU, M. 1975. Reproductive ability of workers occupationally exposed to lead. *Arch. Environ. Health* **30**: 396-401.
84. WILDT, K., ELIASSON, R. & BERLIN, M. 1983. Effects of occupational exposure to lead on sperm and semen. In: *Reproductive and developmental toxicology of metals*. T.W. Clarkson, G.F. Nordberg & P.R. Sager (Eds). Plenum Press, Rochester, New York. p. 270-300.
85. FISCHER-FISCHBEIN, J., FISCHBEIN, A., MELNIK, H.D. & BARDIN W. 1983. Correlation between biochemical indicators of lead exposure and semen quality in a lead poisoned firearms instructor. *JAMA* **257**: 803-805.
86. CULLEN, M.R., KAYNE, M.D. & ROBINS, J.M. 1984. Endocrine and reproductive dysfunction in men associated with occupational inorganic lead intoxication. *Arch. Environ. Health* **39**: 431-440.
87. TUOHIMAA, P. & WICHMANN, L. 1985. Sperm production of men working under heavy metal or organic solvent exposure. In: *Occupational hazard and reproduction*. K. Hemminki, M. Sorsa & H. Vainio (Eds). Hemisphere, New York. p. 73-79.
88. WHORTON, D. 1985. Lead and fertility. In: *Lead environmental health the current issues*. L. Goldwater, L. Wysocki & R. Volpe (Eds). Durham, Duke University. p. 175-179.
89. NEEDLEMANN, H.L., RABINOWITZ, M., LEVITON, A., LINN, S. & SHOENBAUM, S. 1984. The relationship between prenatal exposure to lead and congenital anomalies. *JAMA* **251**: 2956-2959.
90. McMICHAEL, A.J., VIMPIANI, G.V., ROBERTSON, E.F., BAGHURST, P.A. & CLARK, P.D. 1986. The Port Pirie cohort study: maternal blood lead and pregnancy outcome. *J. Epidemiol. Comm. Health* **40**: 18-25.
91. BAGHURST, P.A., McMICHAEL, A.J., VIMPANI, G.V., ROBERTSON, E.F., CLARK, P.D. & WIGG, N.R. 1987. Determinants of blood lead concentrations of pregnant women living in Port Pirie and surrounding areas. *Med. J. Aust.* **146**: 69-73.
92. NORDSTROM, S., BECKMAN, L. & NORDENSON, I. 1979. Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. V. Spontaneous abortion among female employees and decreased birth weight in their offspring. *Hereditas* **90**: 291-296.
93. NORDSTROM, S., BECKMAN, L. & NORDENSON, I. 1987. Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. III. Frequencies of spontaneous abortion. *Hereditas* **88**: 51-54.
94. GENNART, J.P., BERNARD, A. & LAUWERYS, R. 1992. Assessment of thyroid, testes, kidney and autonomic nervous system function in lead exposed workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **64**: 49-57.
95. ITALIA. Decreto Legislativo n. 277, 15 agosto 1991. Attuazione delle direttive n. 08/1107/CEE, n. 82/605/CEE, n. 83/477/CEE, n. 86/188/CEE e n. 88/642/CEE, in materia di protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da esposizione ad agenti chimici, fisici e biologici durante il lavoro, a norma dell'art. 7 della legge 30 luglio 1990, n. 212. *GU* n. 200, 27 agosto 1991. p. 1-24.