

Determinazione automatica di trigliceridi, colesterolo, glucosio, acido urico: prospettive d'impiego in screening di medicina preventiva

GINO MORISI (a), TEODORA MACCHIA (a), FRANCESCO ANGELICO (b),
FABRIZIO PACIONI (b) e ALBERTO ZUCCA (b)

(a) *Laboratorio di Tecnologie Biomediche, Istituto Superiore di Sanità*

(b) *Centro per la Lotta alle Malattie Dismetaboliche e all'Arteriosclerosi dell'Università di Roma*

Riassunto. — Vengono riportati i risultati di prove di linearità, precisione, stabilità nel tempo, accuratezza, e confronto con altri metodi, eseguite su un analizzatore centrifugo veloce, per la determinazione di trigliceridi, colesterolo, glucosio ed acido urico.

I risultati ottenuti indicano che i metodi automatici messi a punto sono forniti dei requisiti fondamentali di affidabilità e praticabilità richiesti nel corso di *screening* di medicina preventiva.

L'analizzatore centrifugo veloce sembra particolarmente indicato per l'applicazione nelle indagini di prevenzione primaria della cardiopatia coronarica, dove studi di *follow up* richiedono esami di laboratorio ripetuti frequentemente.

Summary (*Automatic determination of triglyceride, cholesterol, glucose and serum uric acid in the screening for preventive medicine*). — A centrifuge speed analyzer, used for triglyceride, cholesterol, glucose and serum uric acid determinations, was tested as to linearity, precision, steadiness and accuracy requirements. The results were compared to those obtained by other techniques.

Automatic techniques were proved to comply with reliability and practicability requirements, necessary during the screenings for preventive medicine.

The centrifuge speed analyzer seems to be particularly fit for the primary prevention trials of coronary heart disease, since the follow-up studies require repeated laboratory examinations.

INTRODUZIONE

Numerosi studi epidemiologici hanno messo in evidenza una più elevata incidenza di cardiopatia coronarica in popolazioni con elevati livelli di lipidi plasmatici. Una iperlipemia è di frequente riscontrata in pazienti affetti da manifestazioni cliniche di arteriosclerosi. Vi sono inoltre alcune forme di dislipidemia primitiva, caratterizzata da valori lipemici particolarmente elevati, che predispongono ad una più grave e più precoce arteriosclerosi [1].

Nel passato l'attenzione è stata rivolta per lo più alla valutazione dei valori colesterolemici. È stato ampiamente documentato come l'incidenza di nuovi eventi coronarici aumenti in modo proporzionale con l'elevarsi dei livelli di colesterolo e non sia quindi possibile stabilire dei limiti al di sotto dei quali non vi è il rischio di ammalare [2, 3].

Più recentemente sono stati sviluppati ed introdotti nella routine diagnostica metodi semplici per la determinazione dei trigliceridi, ed è apparso presto evidente come sia comune riscontrare vari tipi di dislipidemia caratterizzati appunto dall'elevazione della trigliceridemia, associata o meno con una ipercolesterolemia. Secondo alcuni AA. la incidenza della cardiopatia coronarica aumenterebbe in modo proporzionale con i livelli della trigliceridemia [4]. In altre ricerche tale correlazione è stata viceversa negata [5, 6].

L'ipertrigliceridemia è associata spesso ad una alterata tolleranza glucidica o ad un diabete clinicamente manifesto, malattia che di per sé comporta un maggiore rischio di complicanze di tipo vascolare. Risulta quindi evidente anche l'importanza della disponibilità dei valori della glicemia per una migliore valutazione del rischio cardiovascolare.

Meno chiaro è il ruolo delle alterazioni del ricambio purinico nell'insorgenza delle malattie vascolari: la determinazione della uricemia appare comunque opportuna per una completa definizione del profilo metabolico.

Dalle considerazioni esposte è chiara l'opportunità di condurre *screenings* al fine di identificare precocemente gli individui al più elevato livello di rischio cardiovascolare e di intervenire in tempo con adatte misure di medicina preventiva. Nell'ambito di tali *screenings*, oltre ad una approfondita valutazione clinica, sono richieste le determinazioni di parametri biochimici, quali colesterolo, trigliceridi, glucosio ed acido urico nel siero.

È proprio dai risultati di tali determinazioni che nascono le indicazioni per il trattamento preventivo, rivolto principalmente alla correzione delle alterazioni del metabolismo. Successivamente occorre intraprendere un *follow up* continuo, nel corso del quale ripetere frequentemente gli esami di laboratorio, di cui si sia provata l'affidabilità, in modo da poter confrontare i risultati nel tempo.

A tale scopo è necessario disporre di metodiche che rispondano ad alcuni requisiti fondamentali, quali: notevole velocità di analisi, buone caratteri-

stiche di precisione e di accuratezza, limitazione del numero di operatori tecnici e dei loro interventi al fine di ridurre gli errori, richiesta di minime quantità di materiali, soddisfacente praticabilità.

In questa ottica, metodiche automatizzate rappresentano l'unica possibilità concreta.

Particolare cura è necessaria nella scelta della apparecchiatura. La nostra preferenza è stata data ad un analizzatore centrifugo veloce, il cui principio di funzionamento e le cui caratteristiche tecniche possono assicurare ad opportune metodiche i requisiti fondamentali sopra indicati. La scelta trova anche motivazione nella possibilità di eseguire, parallelamente, tutti gli esami di laboratorio richiesti con lo stesso apparecchio.

Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare i risultati ottenuti nella determinazione dei trigliceridi, del colesterolo, del glucosio e dell'acido urico nel siero con metodiche completamente enzimatiche ed adattate all'analizzatore centrifugo veloce GEMSAEC.

Le procedure utilizzate sono state impostate alla luce dei criteri di controllo di qualità adottati dal nostro laboratorio, i cui principi generali sono stati descritti in un precedente articolo [7].

MATERIALI

Sieri umani freschi: di soggetti adulti, maschi, di età compresa fra 44 e 65 anni, sottoposti ad esame nell'ambito del Progetto Romano di Prevenzione della Cardiopatia Coronaria (PPCC) [8].

Pool di sieri umani (sopra indicati), preparato in laboratorio.

Sieri per controllo di qualità commerciali:

Precilip (n. di codice 125067) Boehringer-Biochemia;

Normal Lipid Control Serum (n. di codice 80620), Smith Kline & French;

Target Control Serum Normal (n. di codice 83001), Smith Kline Instruments Inc.

Target Control Serum Abnormal (n. di codice 83201), Smith Kline Instruments Inc.;

Q-Pak I (n. di codice FD 045-135), Hyland Division Travenol Laboratories S.A.;

Q-Pak II (n. di codice FD 045-119), Hyland Division Travenol Laboratories S.A.

Soluzione madre di glicerolo: preparata sciogliendo 2 g di glicerolo (prodotto C. Erba, RPE) in 1 l di acqua bidistillata.

Preciset Cholesterol, 50, 100, 150, 200, 300, 400 mg/100ml, (n. di codice 125 512), Boehringer Mannheim GmbH.

Soluzione madre di acido urico: preparata sciogliendo 100 mg di acido urico (prodotto C. Erba, RPE) e 100 mg di carbonato di litio in 30 ml di H₂O bidistillata a 50 °C, diluendo poi a 100 ml con H₂O bidistillata.

I reattivi usati e gli standard saranno indicati nella esposizione dei singoli metodi.

APPARECCHIATURE

Analizzatore centrifugo ENI-GEMSAEC, Electro Nucleonics Inc.

Campionatore Rotoloader IV, Micromedic System.

Computer PDP11 V03, Digital.

Stampante Decwriter II, Digital.

Beckman Glucose Analyzer 2, Beckman Instruments Inc.

Micro-sample spectrophotometer N-300, Gilford.

Data Lister 4009, Gilford.

Termostato a secco Bioterm 37, Julabo.

METODI

A) Trigliceridi.

Metodo automatico. — Il metodo automatico per la determinazione dei trigliceridi è fondamentalmente basato sui principi del metodo di Bucolo e David [9].

Reattivi. — I reattivi usati sono costituiti da *Eskalab Trigliceride Reagent Bulk*, (n. di codice 89804) (fiale di prodotto liofilizzato da ricostituire con 20 ml di acqua bidistillata) e da *Glycerokinase* (n. di codice 89802) (fiale di prodotto liofilizzato da ricostituire con 0,5 ml di acqua bidistillata), Smith Kline Instruments Inc.

Lo standard, preparato dalla soluzione madre per diluizione (v. materiali e metodi) corrisponde a 193 mg/100 ml di trigliceridi (espresso come trioleina).

Procedimento. — Sono stati messi a punto due procedimenti analitici, indicati rispettivamente come: metodo *bicromatico* e metodo *early-reading*.

Le istruzioni, per i moduli del sistema GEMSAEC, che definiscono i procedimenti analitici, e le modalità di calcolo, sono schematicamente indicate nelle Tab. 1 e 2. Per quanto riguarda il metodo *bicromatico*, effettuata l'operazione di distribuzione dei campioni e del reattivo, il disco di trasferimento, per il tempo di incubazione (15' a 37 °C), può venire posto nel modulo analitico o in un apposito termostato. Il cambio di lunghezza d'onda da 340 a 380 nm deve essere effettuato manualmente con rapidità, esattamente 90" dopo il segnale che indica il passaggio della miscela di reazione dal disco di trasferimento alle cellette del rotore analitico. Per il metodo *early-reading*

TABELLA I

**Trigliceridi. Procedimento analitico per il
metodo bicromatico su GEMSAEC**

ISTRUZIONI al campionatore	ISTRUZIONI al modulo analitico e di controllo	ISTRUZIONI al computer
Campione 10 μ l	Temperatura 37 °C	IR 60
Lavaggio 80 μ l	Lunghezza d'onda . . . 340/380 nm	RI 60
Reagente 500 μ l		NR 2
Blank switch water	<i>Modalità di reazione e di corsa:</i>	SC 193
Sample C	Auto-Rate	KT 1000
	IR 60	TF 1
	RI 60	TC 3
	NR 2	AD 4
		CD 2
		HI 1000
		LO 0
		SA 0,400
		RM 2
		XX 1
		DI 1
		DA 0
		ER 0
<i>Preparazione del piatto porta-campioni:</i>		
cuvetta n. 1 . . H ₂ O		
cuvetta n. 2 . . H ₂ O		
cuvetta n. 3 . . Standard		
cuvetta nn. 4-16 Campioni		

Modalità per il calcolo:

$$\Delta \text{ ABS (stampati e riferiti alla cuvetta: 3 (bianco), 3 (standard), 4-16 (campioni));}$$

$$\Delta \text{ ABS (2)} - \Delta \text{ ABS (3)} = A \text{ standard;}$$

$$\Delta \text{ ABS (2)} - \Delta \text{ ABS (4-16)} = A \text{ campione;}$$

$$\frac{\text{Concentrazione dello standard}}{A \text{ standard}} \times A \text{ campione} = \text{Concentrazione del campione.}$$

occorre abilitare il modulo di controllo ad una lettura preliminare della assorbanza (che avviene a circa 5'' dall'introduzione della miscela di reazione nelle cellette del rotore) tramite un apposito interruttore posto sul retro del modulo di controllo stesso.

Metodo di confronto. — Il metodo di confronto, manuale, applicato per la determinazione dei trigliceridi, si basa fondamentalmente sul metodo enzimatico di Wahlefeld [10].

Reattivi. — I reattivi usati sono quelli del *Kit « Test-Combination »* trigliceridi completamente enzimatici (grassi neutri) (n. di codice 126039), Boehringer Mannheim GmbH.

B) Colesterolo.

Metodo automatico. — Il metodo automatico per la determinazione del colesterolo si basa fondamentalmente sui principi del metodo di Allain [11].

**Trigliceridi. Procedimento analitico per il
metodo early-reading su GEMSAEC**

ISTRUZIONI al campionatore	ISTRUZIONI al modulo analitico e di controllo	ISTRUZIONI al computer
Campione 10 μ l	Temperatura 37 °C	IR 900
Lavaggio 80 μ l	Lunghezza d onda . . . 340 nm	RI 60
Reagente 500 μ l		NR 1
Blank switch water	<i>Modalità di reazione e di corsa:</i>	SC 193
Sample C	Auto-end point	KT 1000
	IR 900	TF 1
	RI 60	TC 5
	NR 1	AD 4
		CD 2
		HI 1000
		LO 0
		SA 0,400
		RM 2
		XX 1
		DI 1
		DA 0
		ER 1
<i>Preparazione del piatto porta-campioni:</i>		
cuvetta n. 1 . . H ₂ O		
cuvetta n. 2 . . H ₂ O		
cuvetta n. 3 . . Standard		
cuyeta nn. 4-16 Campioni		

Modalità per il calcolo:

Δ ABS, stampati e riferiti alla cuvetta: 2 (bianco), 3 (standard), 4-16 (campioni);

Δ ABS (2) — Δ ABS (3) = A standard;

Δ ABS (2) — Δ ABS (4-16) = A campione;

$\frac{\text{Concentrazione dello standard}}{A \text{ standard}} \times A \text{ campione} = \text{Concentrazione del campione.}$

Il reattivo usato è costituito dallo «SpinChem Reagent for the determination of Cholesterol», (n. di codice 89607), Smith Kline Instruments Inc. (fiale di prodotto liofilizzato da ricostituire con 20 ml di acqua bidistillata).

Le istruzioni per i moduli del sistema GEMSAEC sono schematizzate nella Tab. 3.

Metodo di confronto. — Il metodo, manuale, usato per la determinazione del colesterolo è una modificazione del metodo di Abell e Coll. [12].

Reattivi. — I reattivi necessari alla esecuzione delle analisi sono: etere di petrolio 40°-70°; potassa alcalica (6 ml di KOH al 33% + 94 ml di etanolo); reattivo di Liebermann-Burchard: 100 volumi di anidride acetica + 5,4 volumi di acido solforico; dopo raffreddamento si aggiungono 50 volumi di acido acetico glaciale.

Procedimento. — A 0,25 ml di campione si aggiungono 2,5 ml di potassa alcolica. Alla miscela, dopo essere stata lasciata in termostato a 40 °C

per 30', si aggiungono 5 ml di etere di petrolio e 2,5 ml di H₂O distillata, agitando ciascuna provetta per 5' su vortex. Si prelevano 2 ml della fase eterica e si portano a secco in corrente di azoto. Si aggiungono 3 ml del reattivo di Liebermann-Burchard e si pone in termostato a 37 °C per 15'. Si legge l'assorbanza a 620 nm.

C) Glucosio.

Metodo automatico. — Il metodo usato per la determinazione automatica del glucosio è una modifica del metodo descritto da Barthelmai e Czok [13].

Il reattivo usato è costituito dallo « SpinChem test for Glucose » (n. di codice 89017), Smith Kline Instruments Inc.

Lo standard è costituito da una soluzione acquosa di glucosio (Standard Reference Material 917, National Bureau of Standard), 100 mg/100 ml.

Procedimento. — Sono state sperimentate due tecniche analitiche automatiche: la prima viene indicata come metodo *end-point*, la seconda come metodo *bicromatico*. Le istruzioni per i moduli del sistema GEMSAEC sono schematizzate nelle Tabb. 4 e 5.

Metodo di confronto. — Il metodo di confronto per la determinazione del glucosio è rappresentato da un procedimento analitico automatico basato sul metodo originariamente descritto da Kadish [14], in cui la concentrazione del glucosio viene determinata misurando il consumo dell'ossigeno in una soluzione di glucosio-ossidasi (saturata di ossigeno) [15].

L'apparecchiatura usata è costituita da un Beckman Glucose Analyzer 2.

Reattivi. — Reattivi e standard fanno parte del « Glucose Reagent » (n. di codice 671640), Beckman Instruments Inc.

D) Acido urico.

Metodo automatico. — Il metodo automatizzato per la determinazione dell'acido urico si basa fundamentalmente sui principi del metodo di Haeckel [16].

I reattivi usati sono quelli dello « SpinChem test uric acid » (n. di codice 89517), Smith Kline Instruments Inc. Il contenuto di una fiala di reattivo (prodotto liofilizzato) viene ricostituito con 16 ml di diluente. Il contenuto di una fiala di uricasi (prodotto liofilizzato) viene ricostituito con 0,6 ml di acqua bidistillata. Ad ogni fiala di reattivo vengono aggiunti 250 µl di uricasi.

Lo standard è costituito da una soluzione di acido urico 5 mg/100 ml, preparata per diluizione con acqua bidistillata dalla soluzione madre (v. Materiali).

TABELLA 3

Colesterolo. Procedimento analitico su GEMSAEC

ISTRUZIONI al campionatore	ISTRUZIONI al modulo analitico e di controllo	ISTRUZIONI al computer
Campione 10 μ l	Temperatura 37 °C	IR 400
Lavaggio 80 μ l	Lunghezza d'onda . . . 500 nm	RI 60
Reattivo 500 μ l		NR 1
Blank switch reagent	<i>Modalità di reazione e di corsa:</i>	SC 200
Sample B	Auto-end point	KT 0
	IR 400	TF 1
	RI 60	TC 1
	NR 1	AD 4
		CD 2
		HI 275
		LO 150
<i>Preparazione del piatto porta-</i>		SA 1,700
<i>campioni:</i>		RM 2
cuvetta n. 1 . . . H ₂ O		XX 0
cuvetta n. 2 . . . Standard		DI 1
cuvetta nn. 3-16 Campioni		DA 0
		ER 0

TABELLA 4

Glucosio. Procedimento analitico per il metodo end-point su GEMSAEC

ISTRUZIONI al campionatore	ISTRUZIONI al modulo analitico e di controllo	ISTRUZIONI al computer
Campione 5 μ l	Temperatura 30 °C	IR 180
Lavaggio 40 μ l	Lunghezza d'onda . . . 340 nm	RI 5
Reattivo 600 μ l		NR 1
Blank switch reagent	<i>Modalità di reazione e di corsa:</i>	SC 100
Sample B	Auto-end point	KT 1000
	IR 180	TF 1
	RI 5	TC 1
	NR 1	AD 4
		CD 2
		HI 110
		LO 65
<i>Preparazione del piatto porta-</i>		SA 10000
<i>campioni:</i>		RM 2
cuvetta n. 1 . . . H ₂ O		XX 0
cuvetta n. 2 . . . Standard		DI 1
cuvetta nn. 3-16 Campioni		DA 0
		ER 0

TABELLA 5

Glucosio. Procedimento analitico per il metodo bicromatico su GEMSAEC

ISTRUZIONI al campionatore	ISTRUZIONI al modulo analitico e di controllo	ISTRUZIONI al computer
Campione 5 μ l	Temperatura 30 °C	IR 180
Lavaggio 40 μ l	Lunghezza d'onda 340/360 nm	RI 60
Reattivo 600 μ l		NR 2
Blank switch water	<i>Modalità di reazione e di corsa:</i>	SC 100
Sample B	Auto-Rate	KT 1000
	IR 180	TF 1
	RI 60	TC 3
	NR 2	AD 4
		CD 2
		HI 110
		LO 65
		SA 10000
		RM 2
		XX 0
		DI 1
		DA 0
		ER 0
<i>Preparazione del piatto porta-campioni:</i>		
cuvetta n. 1 . . . H ₂ O		
cuvetta n. 2 . . . Standard		
cuvetta nn. 3-16 Campioni		

TABELLA 6

Acido urico. Procedimento analitico su GEMSAEC

ISTRUZIONI al campionatore	ISTRUZIONI al modulo analitico e di controllo	ISTRUZIONI al computer
Campione 50 μ l	Temperatura 37 °C	IR 240
Lavaggio 100 μ l	Lunghezza d'onda 340 nm	RI 5
Reattivo 400 μ l		NR 1
Blank switch water	<i>Modalità di reazione e di corsa:</i>	SC 5
Sample B	Auto-Rate	KT 1000
	IR 240	TF 1
	RI 5	TC 5
	NR 1	AD 3
		CD 2
		HI 7
		LO 3
		SA 0,4000
		RM 2
		XX 0
		DI 1
		DA 0
		ER 1
<i>Preparazione del piatto porta-campioni:</i>		
cuvetta n. 1 . . . H ₂ O		
cuvetta n. 2 . . . Standard		
cuvetta nn. 3-16 Campioni		

Le istruzioni per i moduli del sistema GEMSAEC (predisposto per l'operazione *early-reading*) sono indicate schematicamente nella Tab. 6.

Metodo di confronto. — Il metodo di confronto, manuale, applicato per la determinazione dell'acido urico, si basa sui principi del metodo di Kageyama [17].

Reattivi. — I reattivi sono costituiti dal « Test-Combination Urica-Quant » (n. di codice 124761), Boehringer Mannheim GbmH.

E) Programmazione ed elaborazione.

La programmazione degli esperimenti e l'elaborazione dei dati ottenuti sono state condotte utilizzando il protocollo ed il programma di elaborazione elettronica (COMET/1) descritti in un precedente articolo [7].

RISULTATI

A) Trigliceridi.

Per la determinazione delle caratteristiche di precisione dei procedimenti analitici automatici su GEMSAEC sono state eseguite determinazioni in doppio su campioni di siero. Parallelamente, sugli stessi campioni sono state eseguite determinazioni, in doppio, con il metodo di confronto manuale. I risultati delle valutazioni statistiche effettuate sui valori ottenuti sono riassunti nella Tab. 7 e nelle Figg. 1, 2, 3.

Le precisioni relative ai 3 metodi, analizzate per le varianze col test di Box, si rivelano diverse ($p \leq 0,01$), e precisamente: il metodo *early-reading* risulta meno preciso di un fattore 1,2 rispetto al metodo bicromico ed al metodo di confronto manuale, che presentano una precisione non distinguibile ($p \leq 0,267$).

È bene ricordare come, nella caratterizzazione di un metodo dal punto di vista della precisione, sia utile esaminare l'andamento delle SD (devia-

TABELLA 7

Trigliceridi. Caratteristiche dei metodi

METODO	N. dati	SD pooled	CV mediano %
<i>Bicromatico</i>	160	5,14	3,2
<i>Early-reading</i>	50	6,50	4,7
Manuale	110	5,42	3,6

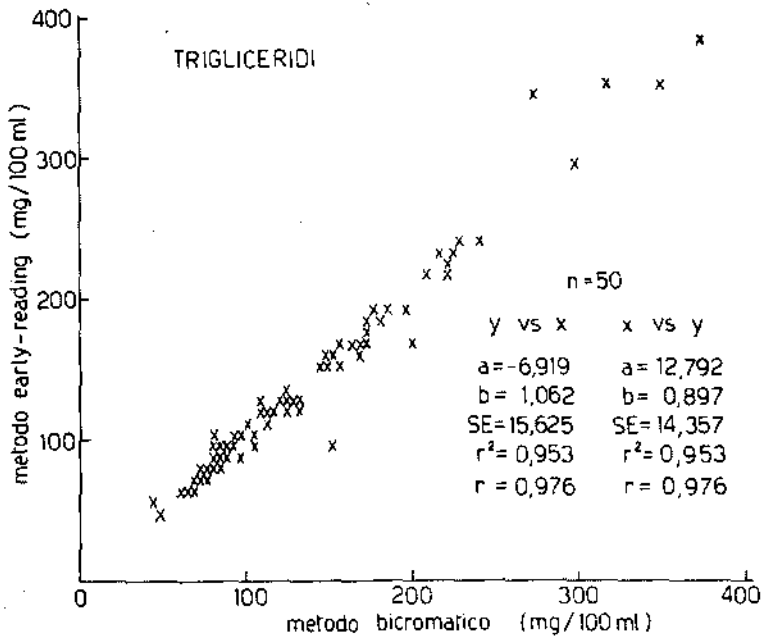


Fig. 1. — Trigliceridi. Correlazione e regressioni metodo *early-reading*/metodo *bicromatico* (alcuni punti del grafico rappresentano valori multipli).

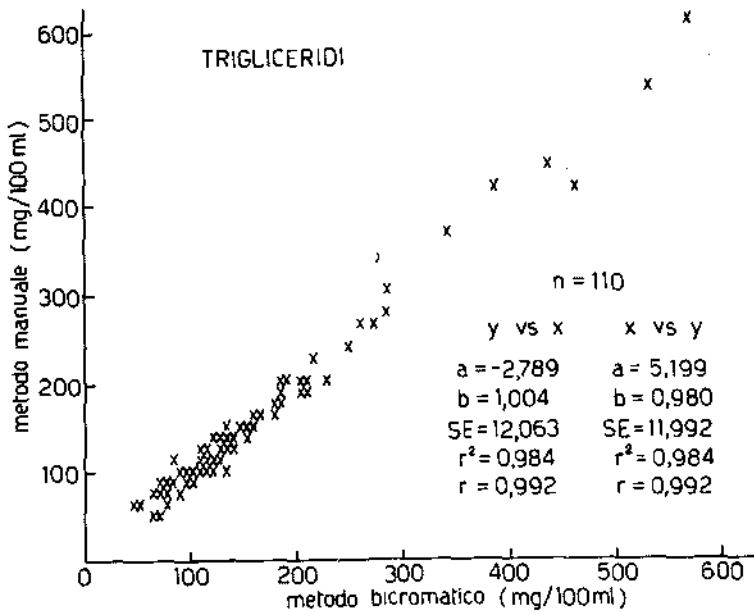


Fig. 2. — Trigliceridi. Correlazione e regressioni metodo *manuale*/metodo *bicromatico* (alcuni punti rappresentano valori multipli).

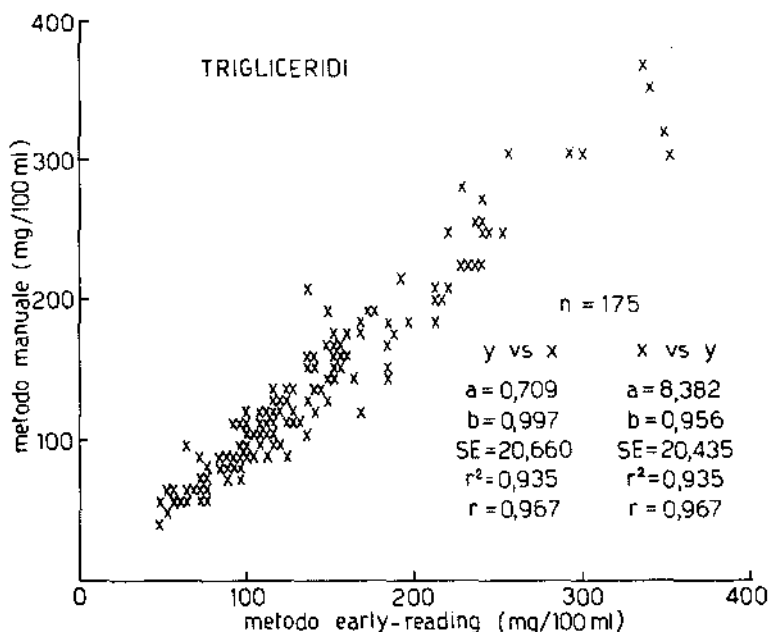


Fig. 3. — Trigliceridi. Correlazione e regressioni metodo manuale/metodo *early reading* (alcuni punti del grafico rappresentano valori multipli).

zione standard) dei replicati in tutto il campo di concentrazioni considerate, come anche dei CV (coefficiente di variazione) verso la concentrazione media. Nel nostro caso le distribuzioni delle SD e dei CV, relativi ai 3 metodi verso la concentrazione, non rivelano all'esame particolari andamenti.

Interessanti si presentano le regressioni effettuate sui metodi messi a confronto: nella regressione metodo *early-reading* verso *bicromatico* (Fig. 1) ($y = -6,919 + 1,062x$; $r = 0,976$), l'andamento risulta lineare, la pendenza e l'intercetta non sono rispettivamente significativamente diverse da 1 e da 0, e le misure concordano entro ± 30 unità (SE = 15,6). Il risultato nella regressione migliora se si escludono dall'insieme dei dati quelli relativi ai sieri torbidi ($y = 4,382 + 1,002x$; $r = 0,997$).

Nel caso del metodo manuale verso il metodo *bicromatico* (Fig. 2), pendenza e intercetta risultano rispettivamente indistinguibili da 1 e da 0, r^2 indica una buona correlazione spiegando il 98,4% di variabilità e l'andamento appare fortemente lineare.

Dal confronto del metodo manuale verso il metodo *early reading* (Fig. 3), a e b non sono distinguibili rispettivamente da 0 e da 1 e la correlazione è caratterizzata da un $r^2 = 0,935$.

È stato anche osservato che il metodo *early reading*, mentre ha dato ottimi risultati in riferimento a campioni di sieri non torbidi, nel caso par-

icolare di sieri torbidi (molti dei sieri di controllo commerciali presentano questa caratteristica) rivela una accentuata tendenza ad una sovrastima rispetto agli altri metodi di determinazione. Si è cercato di spiegare il fenomeno analizzando le cinetiche di reazione relative a sieri torbidi e non torbidi, sul GEMSAEC (Fig. 4). Per i primi si osserva, nei 30" iniziali della reazione, un decremento dell'assorbanza più accentuata rispetto ai secondi. Questo fenomeno può essere addebitato alla scomparsa della torbidità che si verifica durante l'idrolisi, e potrebbe essere responsabile della sovrastima osservata.

È stata data pertanto la preferenza al metodo *bicromatico*, di applicazione più generale, in quanto l'impostazione caratteristica di questa tecnica analitica prevede la correzione della interferenza data dalla torbidità del campione.

La linearità del metodo bicromatico è stata verificata su standard nel campo di concentrazione compreso fra 20 e 800 mg/100 ml, con un recupero

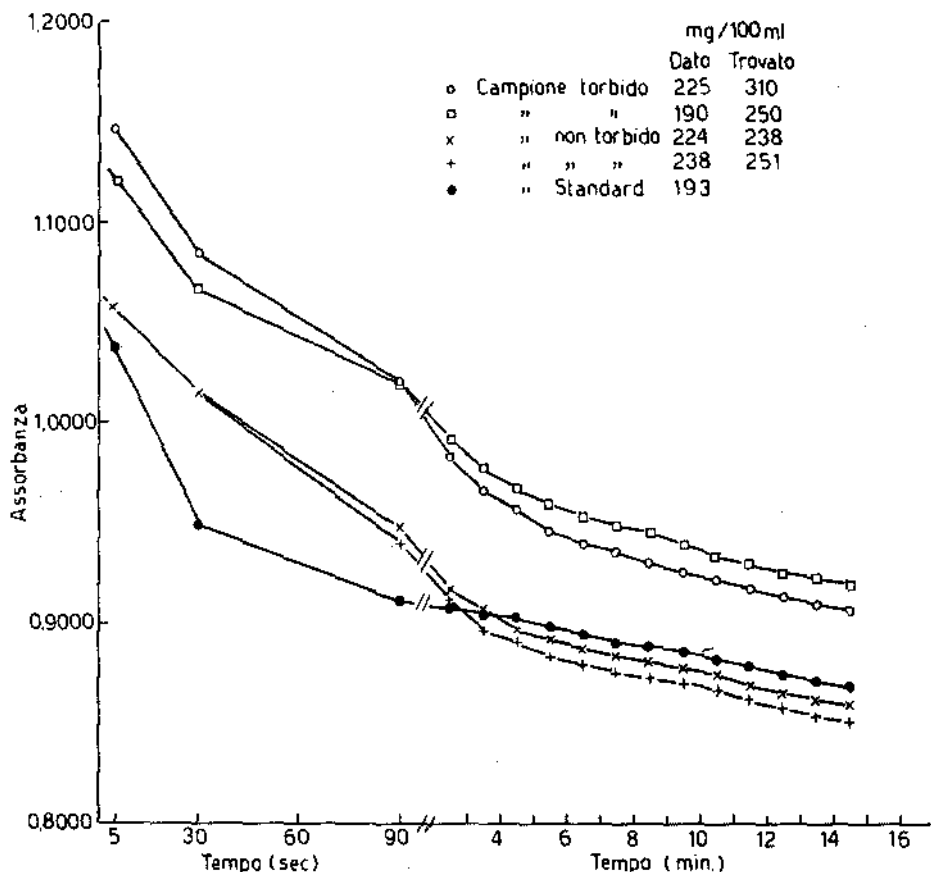


Fig. 4. — Cinetiche delle reazioni enzimatiche per la determinazione dei trigliceridi in sieri torbidi, non torbidi e standard di glicerolo.

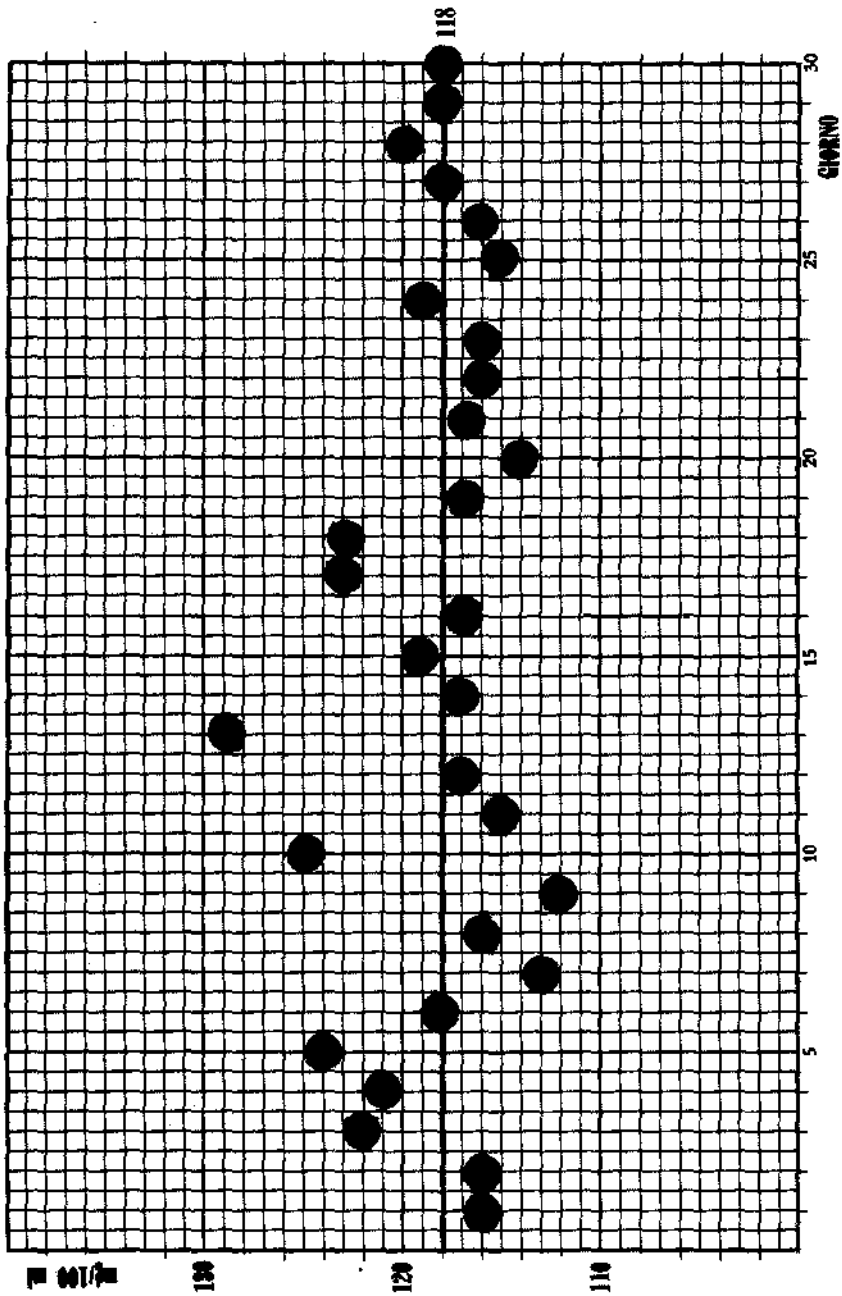


Fig. 5. — Trigliceridi. Carta di controllo di qualità. Siero di controllo commerciale con valore dichiarato 118 ± 20 mg/100 ml. Media trovata: 118,09; SD = 3,60; CV = 3,05 %.

medio del 99,98% e nella regressione effettuata (a e b indistinguibile da 0 e da 1), con un $r^2 = 0,9997$.

La precisione intra-corsa è stata valutata, relativamente a 5 sieri (a concentrazione compresa fra 60 e 350 mg/100 ml), ripetendo 9 volte, nella stessa corsa, la determinazione per ciascun campione. La precisione tra corse è stata valutata ripetendo le stesse prove per 8 giorni diversi. L'esame statistico dei risultati ha evidenziato una SD *pooled* intra-corsa di 3,0 ed una SD *pooled* (*) tra corse di 4,75, con un CVM (coefficiente di variazione medio) = 1,26%. L'analisi della variabilità delle misure nell'arco di tempo considerato non ha mostrato particolari andamenti.

L'accuratezza del metodo è stata valutata attraverso prove di recupero effettuate su 2 sieri. L'esame delle regressioni per il recupero ha mostrato una ottima linearità tra valore atteso e valore trovato: a e b rispettivamente non significativamente diverse da 0 e da 1; $r^2 = 0,999$. Il recupero è stato calcolato intorno al 99-100%.

La stabilità del metodo è stata provata su 2 sieri di controllo di accuratezza nell'arco di un mese (Fig. 5): si è notata una soddisfacente stabilità

TABELLA 8

Trigliceridi. Controllo di qualità (programma WHO Regional Lipid Reference Centre - Praga), effettuato col metodo bicromatico, su GEMSAEC

SERIE	Medio valori trovati (M) mg/100 ml	SD mg/100 ml	CV %	M - Valore atteso %
I	111,6	1,86	1,7	- 10,5
	278,8	6,43	2,3	- 4,8
	320,9	7,00	2,2	- 12,1
II	79,6	1,61	2,0 (9)	- 5,0 (± 18)
	287,6	5,42	1,9 (5)	- 8,0 (± 10)
III	163,7	2,69	1,6 (6)	+ 8,2 (± 13)
	291,2	7,05	2,4 (5)	- 2,5 (± 10)

In parentesi sono indicati i limiti massimali consentiti in base ai criteri informativi del WHO.

(*) La SD *pooled* è una migliore stima della dispersione del metodo, essendo la risultante, ove possibile, di tutte le SD dei replicati.

e una fluttuazione intorno al valore dichiarato dal produttore con un $CV = 3,1\%$ concordante con il CV osservato per il metodo in esame. Infine il metodo *bicromatico* è stato applicato in un programma di controllo di qualità organizzato dal *WHO Regional Lipid Reference Centre* di Praga, su 3 serie di campioni: la I serie costituita da 20 campioni (6 di un *pool* a bassa concentrazione, 7 di un *pool* a concentrazione media, 7 di un *pool* a concentrazione alta); la II costituita da 16 campioni (8 di un *pool* a bassa concentrazione, 8 di un *pool* a concentrazione alta); la III da 20 campioni (10 di un *pool* a bassa concentrazione, 10 di un *pool* a concentrazione alta). I risultati ottenuti dalla determinazione in duplicato di ciascun campione, analizzando 2 campioni al giorno, 2 giorni per settimana, sono riassunti nella Tab. 8.

B) Colesterolo.

La linearità del metodo è stata verificata su soluzioni standard nel campo di concentrazioni comprese fra 50 e 400 mg/100 ml, con un recupero medio del 98 % e, nella regressione effettuata, a e b sono indistinguibili rispettivamente da 0 e da 1 e $r^2 = 0,922$.

Per una valutazione complessiva del metodo sono state effettuate determinazioni in doppio su 103 sieri. La *SD pooled* è risultata = 3,425 e

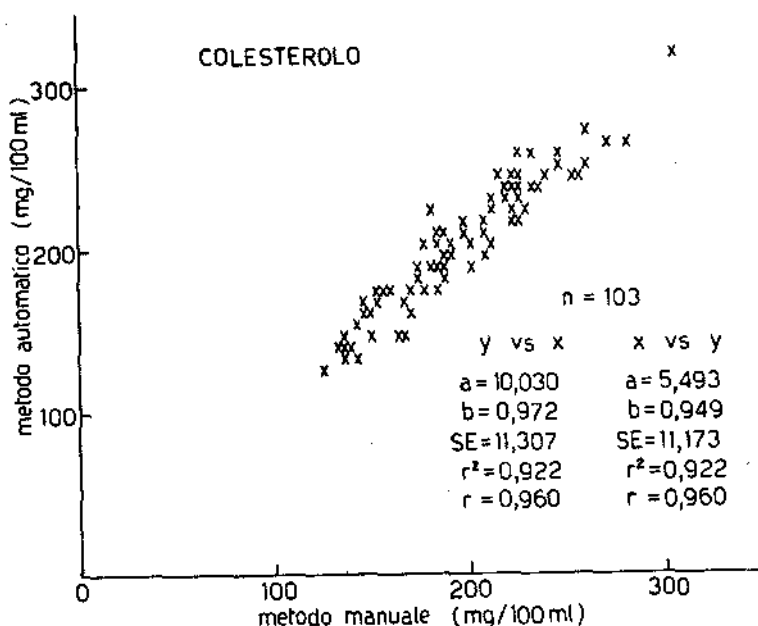


Fig. 6. — Colesterolo. Correlazione e regressioni metodo manuale/metodo automatico (alcuni punti del grafico rappresentano valori multipli).

il CVM = 1,7%. Parallelamente gli stessi campioni sono stati analizzati col metodo di confronto manuale. La regressione effettuata nel confronto tra i due metodi (Fig. 6) rivela, accanto ad una intercetta considerevole, ma statisticamente non diversa da 0, una pendenza nella regressione forzata di 1,022, significativamente diversa da 1: si può quindi affermare che il metodo automatico sovrastima rispetto al metodo manuale di circa il 2%. I due metodi peraltro concordano entro circa ± 22 unità.

La precisione intra-corsa è stata valutata relativamente a 4 campioni (2 sieri freschi e 2 sieri di controllo di qualità) a concentrazioni comprese fra 145 e 325 mg/100 ml, ripetendo 8 volte nella stessa corsa la misura per ciascun campione. La precisione tra corse è stata valutata ripetendo le stesse misure per 8 giorni consecutivi. All'interno di ogni corsa la SD *pooled* è risultata = 3,158 e la variabilità tra corse è caratterizzata da una SD *pooled* = 5,88 e da un CVM = 1,44%. Le stesse misure di precisione intra-corsa ed inter-corsa sono state effettuate su 2 sieri di controllo per l'accuratezza nell'arco di circa un mese. Per i due campioni si osserva una SD *pooled* intra-corsa rispettivamente di 1,99 e 3,77; una SD *pooled* tra corse di 6,97, con un CV del 2,6% e 2,9% rispettivamente.

Per quanto riguarda l'accuratezza del metodo, prove di recupero effettuate su standard, su sieri e su sieri di controllo commerciali, hanno dato

TABELLA 9

Colesterolo. Controllo di qualità (programma WHO Regional Lipid Reference Centre - Praga), effettuato col metodo automatico, su GEMSAEC

SERIE	Medie valori trovati (M) mg/100 ml	SD mg/100 ml	CV %	M - Valore atteso %
I	182,6	5,67	3,1	- 5,4
	248,9	6,28	2,5	- 7,8
	347,6	6,35	1,8	- 11,8
II	128,4	2,56	2,0 (5)	+ 1,2 (± 10)
	319,4	3,08	1,0 (3)	- 4,0 (± 10)
III	129,9	1,93	1,5 (5)	- 9,5 (± 10)
	257,9	3,96	1,3 (3)	- 2,1 (± 10)

In parentesi sono indicati i limiti massimi consentiti in base ai criteri informativi del WHO.

valori di recupero compresi fra il 98 e il 100%, con un coefficiente di correlazione, nelle regressioni effettuate (nelle quali a e b non erano distinguibili da 0 e da 1) intorno al 99%.

Infine il metodo automatico è stato applicato nell'ambito del programma per il controllo di qualità del *WHO Regional Lipid Reference Centre* di Praga, nelle stesse 3 serie di campioni prima indicate per i trigliceridi. I risultati, ottenuti dalla determinazione in duplicato di ciascun campione, analizzando 2 campioni al giorno, 2 giorni per settimana, sono riassunti nella Tab. 9.

C) Glucosio.

Per la caratterizzazione dei metodi automatici per la determinazione del glucosio su GEMSAEC, sono state effettuate determinazioni in doppio su 118 campioni di siero col metodo *end-point* e col metodo di confronto parallelamente, e determinazioni in doppio su 64 campioni di siero col metodo *bicromatico* e col metodo *end-point*. Nella Tab. 10 sono sintetizzate le caratteristiche emerse dalla valutazione statistica dei risultati.

TABELLA 10

Glucosio. Caratteristiche dei metodi

METODO	N. dati	SD pooled	CV mediano %
<i>End-point</i>	64	1,39	1,3
<i>Bicromatico</i>	64	1,42	1,4
Di confronto	118	2,07	1,7
<i>End-point</i>	118	1,02	0,9

Il confronto delle precisioni osservate relative ai 3 metodi, effettuate mediante il test di Bartlett e il test di Box, mostra delle differenze significative. In particolare, la precisione del metodo di confronto è inferiore di un fattore 1,5 rispetto al metodo *end-point*.

La correlazione metodo *end-point*/metodo di confronto (Fig. 7) mette in evidenza una sottostima sistematica puramente proporzionale del primo, di circa il 3-4 %. Le misure effettuate con i due metodi concordano entro un intervallo di ± 10 unità.

Nel caso del metodo *bicromatico*/metodo *end-point* (Fig. 8), l'analisi della regressione non rivela fonti di variazioni sistematiche proporzionali, mentre mette in evidenza un errore sistematico costante di circa 5 unità.

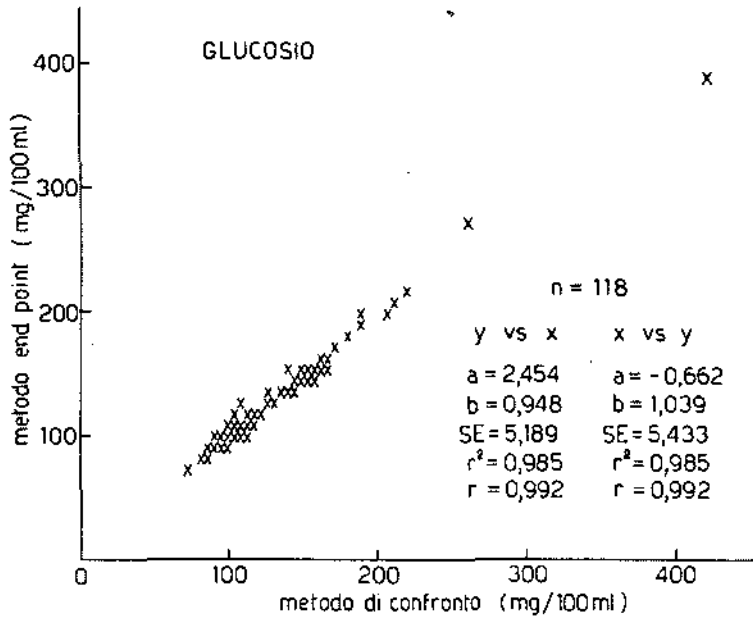


Fig. 7. — Glucosio. Correlazione e regressioni metodo *end-point*/metodo di confronto (alcuni punti del grafico rappresentano valori multipli).

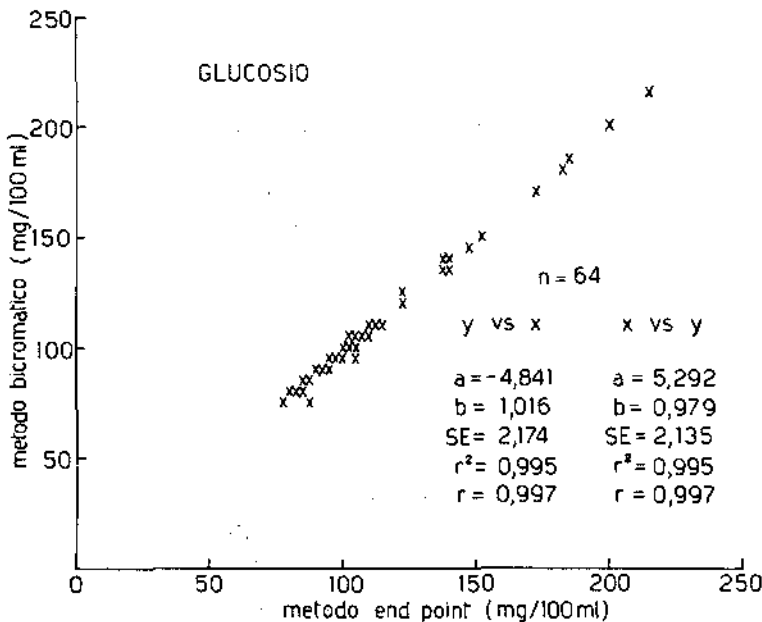


Fig. 8. — Glucosio. Correlazione e regressioni metodo *bicromatico*/metodo *end-point* (alcuni punti del grafico rappresentano valori multipli).

D) *Acido urico*.

La linearità del metodo automatico è stata verificata su standard nel campo di concentrazione compreso fra 2 e 20 mg/100 ml. La valutazione della regressione relativa alla correlazione valori trovati/valori attesi ($y = 0,125 + 0,997x$) ha mostrato l'intercetta indistinguibile da 0, la pendenza indistinguibile da 1, $r^2 = 0,9996$.

La valutazione dei risultati ottenuti dalle determinazioni effettuate in doppio, su oltre 81 campioni di sieri, sia col metodo automatico che col metodo di confronto manuale, è riassunta nella Tab. 11 e nella Fig. 8. Considerazioni sulle caratteristiche dei metodi confrontati hanno messo in evidenza che il metodo automatico è più preciso del metodo manuale di circa un fattore 1,7.

TABELLA 11

Acido urico. Caratteristiche dei metodi

METODO	N. dati	SD	CV mediano %
Automatico	81	0,15	2,7
Manuale	81	0,25	4,5

Dall'analisi della regressione (Fig. 9) possiamo dire che il metodo automatico fornisce mediamente valori superiori di circa il 2% rispetto al manuale.

L'intercetta, sempre indistinguibile da 0, non evidenzia errori sistematici costanti. I dati ottenuti con i 2 metodi concordano entro circa $\pm 0,7$ unità.

La precisione intra corsa è stata valutata relativamente a 3 sieri di controllo a concentrazioni comprese fra 4 e 10 mg/100 ml, ripetendo 9 volte nella stessa corsa la determinazione per ciascun campione. La precisione tra corse è stata valutata ripetendo le stesse prove 6 giorni diversi. La SD *pooled* intra corsa è risultata = 0,72.

La variabilità fra saggi è caratterizzata da una SD *pooled* di 0,095 e da CVM = 1,3, 1,1, 0,7 rispettivamente per bassa, media ed alta concentrazione.

Per quanto riguarda l'accuratezza del metodo automatico, prove di recupero effettuate su un siero fresco ed un siero di controllo hanno portato alla conclusione che il recupero è compreso fra il 93 e il 98%, al 95% di probabilità. Le correlazioni effettuate per la valutazione del recupero, mostravano pendenza ed intercetta non significativamente diverse da 1 e da 0. Il coefficiente di correlazione era in ogni caso 0,969.

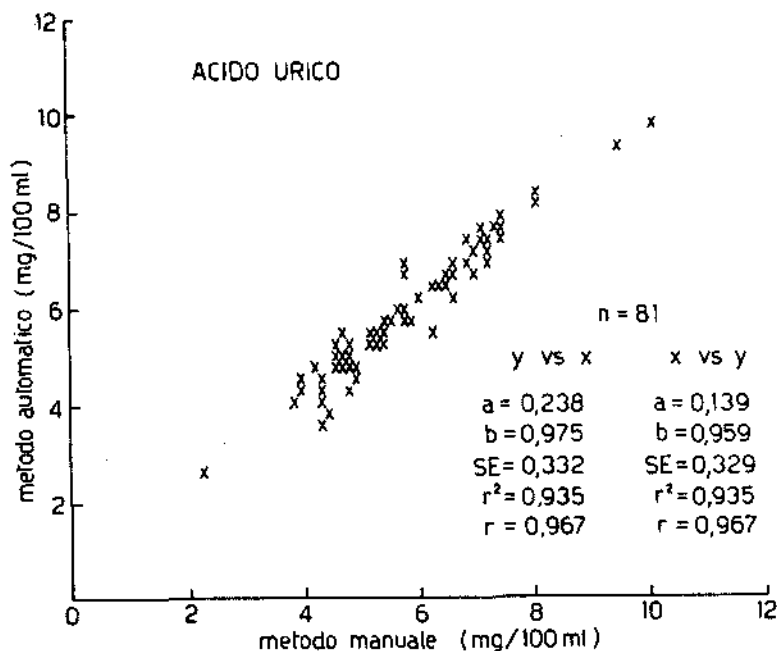


Fig. 9. — Acido urico. Correlazione e regressioni metodo automatico/metodo manuale (alcuni punti del grafico rappresentano valori multipli).

CONCLUSIONI

Nel complesso le tecniche automatiche messe a punto sull'analizzatore centrifugo veloce GEMSAEC, ad una valutazione statistica delle misure effettuate, sono caratterizzate da:

- una buona linearità;
- una buona precisione, stabile nel tempo, con fluttuazioni, ampiamente comprese nel CV proprio della tecnica, che non dimostrano aumenti particolari nel tempo. A questo riguardo, probabilmente, anche il tipo di reattivo enzimatico usato (allo stato di liofilo) ha contribuito a determinare condizioni favorevoli;
- una buona accuratezza, verificata attraverso prove di recupero. In particolare la precisione e l'accuratezza nella determinazione dei trigliceridi e del colesterolo sono state valutate anche alla luce dei risultati di un controllo di qualità inter-laboratori. La precisione mediamente è risultata migliore di circa un fattore 3 rispetto ai limiti consentiti in base ai criteri informativi per la standardizzazione dei lipidi del WHO. L'accuratezza invece, è risultata entro i limiti massimi consentiti, in base agli stessi criteri, solo per i campioni della II e III serie, esaminati ad uno stadio più avanzato della messa a punto delle tecniche automatiche.

Riguardo alla praticabilità delle tecniche descritte, si può affermare che sono caratterizzate da notevole velocità di analisi:

- 210 campioni/h, per il glucosio;
- 160 campioni/h, per i trigliceridi;
- 150 campioni/h, per l'acido urico;
- 100 campioni/h, per il colesterolo.

È necessaria la disponibilità di un solo operatore.

Il costo di esercizio per i reattivi è contenuto:

- lire 70/analisi, per il glucosio; lire 130/analisi, per i trigliceridi; lire 180/analisi, per il colesterolo; lire 250/analisi, per l'acido urico.

Sono richieste quantità molto piccole di campione: al limite 100 μ l di siero sono sufficienti per la determinazione parallela dei 4 parametri considerati.

Il passaggio dalla determinazione di un parametro all'altro è estremamente semplice.

Gli AA. desiderano ringraziare vivamente il dott. Mario Terzino, ospite del Laboratorio di Tecnologie Biomediche (reparto Metodi e Strumenti in Chimica Clinica), per il valido contributo prestato nella esecuzione delle analisi per la caratterizzazione dei metodi descritti.

Ricevuto il 30 marzo 1979.

Accettato il 2 aprile 1979

BIBLIOGRAFIA

1. FREDRICKSON, D. S., LEVY, R. I. & LEES, R. S. 1967. Fat transport in lipoproteins. An integrated approach to mechanisms and disorders. *N. Engl. J. Med.* **276**: 33-44; 94-103; 148-156; 215-225; 273-281.
2. KEYS, A. (Ed.). 1970. Coronary heart disease in seven countries. *Circulation*. **41** (Suppl. 1): 1-198.
3. STAMLER, J. 1978. Population studies. In: *Nutrition, Lipids and Coronary Heart Disease*, Levy, R. I., Rifkind B., Dennis B & Ernst N. (Eds.), Raven Press, New York, pp. 25-88.
4. CARLSON, L. A. & BOTTINGER, L. E. 1972. Ischaemic heart disease in relation to fasting values of plasma triglycerides and cholesterol. *Lancet*. **i**: 865-868.
5. The Coronary Drug Project Research Group: The Coronary Drug Project. 1972. *J.A.M.A.* **220**: 996-1008.
6. RHODES, G. G., GULBRANDSEN, C. L. & KAGAN, A. 1976. Serum lipoproteins and coronary heart disease in a population study of Hawaii Japanese men. *N. Engl. J. Med.* **294**: 293-300.

7. MACCHIA, T. & MORISI, G. 1979. Alcune considerazioni sulla caratterizzazione di un metodo di analisi e sul confronto tra metodiche per la messa a punto di una procedura per l'elaborazione elettronica dei dati. *Ann. Ist. Super. Sanità.* 15: 219-238.
8. Presentazione del Progetto di Prevenzione della Cardiopatia Coronarica. 1976. *Ann. Ist. Super. Sanità.* 12: 303-315.
9. BUCOLO, G. & DAVID, H. 1973. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin. Chem.* 19: 476-482.
10. WAHLEFELD, A. W. 1974. Triglycerides determination after enzymatic hydrolysis. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer H. U. (Ed.), Vol. IV, Verlag.
11. ALLAIN, C. C., POON, L. S., CHAN, C. S. G., RICHMOND, W. & FU, P. C. 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 20: 470-475.
12. ABELL, L. B., LEVY, B., BRODIE, B. & KENDALL, F. 1952. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and the demonstration of its specificity. *J. Biol. Chem.* 195: 357-366.
13. BARTHELMAI, W. & CZOK, R. 1962. Enzymatic determination of glucose in the blood, cerebrospinal fluid and urine. *Klin. Wochr.* 40: 585-589.
14. KADISH, A. H. & HALL, D. A. 1965. A new method for the continuous monitoring of blood glucose by measurement of dissolved oxygen. *Clin. Chem.* 11: 869-875.
15. Beckman Glucose Analyzer 2. Operation manual (Beckman Instructions 015-083648) 1977. Beckman Instruments, Inc. Clinical Instruments Division, Fullerton, California.
16. HAECKEL, R. 1976. The use of aldehyde dehydrogenase to determine H_2O_2 -producing reactions. *J. Clin. Chem. Biochem.* 14: 101-107.
17. KAGEYAMA, N. 1971. A direct colorimetric determination of uric acid in serum and urine with uricase-catalase system. *Clin. Chim. Acta.* 31: 421-426.

Valutazione obiettiva dell'assunzione di fumo tramite la determinazione del tiocianato sierico

GINO MORISI, PAOLA FARINA e TEODORA MACCHIA

Laboratorio di Tecnologie Biomediche, Istituto Superiore di Sanità

Riassunto. — Il metodo di Butts e Coll. per la determinazione del tiocianato sierico, parametro correlato con l'assunzione di fumo, sostanzialmente modificato al fine di migliorarne la sensibilità, è stato caratterizzato per la precisione e la accuratezza.

Si è successivamente utilizzato il metodo per la determinazione del tiocianato sierico su 493 soggetti, nel corso di uno *screening* per la prevenzione della cardiopatia coronarica, trovando una marcata correlazione lineare ($r = 0,918$) tra livello del tiocianato e numero di sigarette fumate. Assumendo come valore discriminante fra non fumatori e fumatori $40 \mu\text{mol/l}$ si riscontra il 2,8% di falsi positivi e il 5% di falsi negativi.

Summary (*Evaluation of smoke assumption by the determination of serum thiocyanate*). — The method of Butts and Coll. for determination of serum thiocyanate — parameter correlated to smoke assumption — has been modified in order to improve sensibility and has been characterized as regards precision and accuracy.

The improved method has been successively utilized for determination of serum thiocyanate of 493 subjects during a screening for prevention from coronaric heart disease. A linear correlation ($r = 0,916$) between the number of smoked cigarettes and serum thiocyanate has been found. Assuming $40 \mu\text{mol/l}$ as a cut-off point to distinguish cigarette smokers and non smokers, 1,8% false positive and 5% false negative resulted.

INTRODUZIONE

La concentrazione di tiocianato nei liquidi biologici è determinata dalla assunzione da parte dell'organismo di ioni SCN^- e relativi esteri, e di composti precursori come cianuri, nitrili, isotiocianati [1].

La trasformazione dei cianuri in tiocianati, che comporta una riduzione di tossicità di circa 200 volte, è un meccanismo di detossicazione che avviene

tramite il trasferimento enzimatico (operato dalla tiosolfo transferasi) di un atomo di zolfo da una molecola di tiosolfato.

L'organismo può assumere cianuri in determinati ambienti di lavoro industriale; con alcuni alimenti, per lo più di origine vegetale, quali mandorle, aglio, brassicacee, rafani, ravanelli, mostarda, ma anche col latte e la birra [2, 3]; soprattutto, infine, dal fumo di tabacco (il fumo di una sigaretta contiene circa 0,2-0,3 mg di HCN) [4, 5].

La conoscenza del livello plasmatico di tiocianato assume un certo valore in biochimica clinica in quanto concentrazioni particolarmente basse di tiocianato si rilevano in alcune forme patologiche, quali ad esempio: l'amblipia da tabacco, dovuta ad una ridotta capacità di detossicare il cianuro ed associata ad una deficienza di vitamina B₁₂ [6-9]; l'atrofia ottica ereditaria di Leber, dovuta ad una alterazione del meccanismo biochimico, non correlata ad una deficienza di vitamina B₁₂ [8]; il carcinoma gastrico, dove però l'alterazione della concentrazione di SCN⁻ è ritenuta un fattore secondario [2, 4].

Concentrazioni molto alte di SCN⁻ correlate ad altri fattori si sono riscontrate in alcune forme di neuropatie tropicali [10].

Va inoltre ricordata l'importanza della determinazione del tiocianato sia per il controllo dell'attività tiroidea (in quanto l'SCN⁻ inibendo il trasporto dello iodio deprime l'attività della tiroide) [11], sia per l'esatta determinazione del volume di acqua contenuto nelle cellule, nel plasma e nel liquido interstiziale (volume che è necessario conoscere nei casi di shock traumatico) [12].

La determinazione del tiocianato plasmatico può assumere però maggiore importanza quale misura obiettiva dell'assunzione di fumo, in considerazione del fatto che il fumo è ritenuto uno dei principali fattori di rischio per i tumori dell'apparato respiratorio e per l'arteriosclerosi [9].

Alcuni AA. hanno prospettato la possibilità di una tale applicazione, tenendo anche conto della vita media della molecola nel sangue, che è di circa 14 gg. contro le 4 ore di quella della carbossemoglobina (parametro che in alternativa può essere utilizzato allo stesso scopo [13, 14]: Butts e Coll., ad esempio, su 197 campioni esaminati, con una tecnica di determinazione automatica, hanno trovato tra concentrazione di SCN⁻ e numero di sigarette fumate un coefficiente di correlazione $r = 0,46$; in base ai risultati ottenuti hanno indicato come punto di *cut off*, per discriminare fumatori da non fumatori, la concentrazione di 85 $\mu\text{mol/l}$ di SCN⁻ [13]; Vogt e Coll. su 139 soggetti hanno ottenuto un coefficiente di correlazione $r = 0,479$, indicando come punto di *cut off* la concentrazione di 100 $\mu\text{mol/l}$ [14].

Prendendo come base il metodo analitico automatico proposto da Butts [13], apportandovi opportune modifiche allo scopo di migliorarne la affidabilità e di ridurre la quantità di campione necessaria all'analisi, abbiamo

esaminato le caratteristiche del metodo modificato, alla luce dei criteri di controllo di qualità adottati nel nostro laboratorio [15], ed abbiamo verificato la correlazione tiocianato-numero di sigarette fumate per un numero maggiore di soggetti rispetto agli AA. citati. Ciò allo scopo di accertare la validità dell'utilizzazione del metodo stesso nel corso di uno *screening* per un programma di prevenzione dell'arteriosclerosi [16].

MATERIALI

Soluzione madre di SCN^- : 1000 $\mu\text{mol/l}$ (97,2 mg di tiocianato di potassio in 11 di H_2O bidistillata).

Soluzione standard di lavoro di SCN^- : 20, 50, 100, 200, 250 $\mu\text{mol/l}$.

Soluzione di nitrato ferrico: 10 g di $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ /l di una soluzione di HNO_3 1,5 M. Si filtra e si conserva in bottiglia scura.

Soluzione di sodio perclorato 0,1 M. A 11 della soluzione si aggiunge 1 ml di soluzione « Brij-35 » (30 g/dl) e si conserva in bottiglia scura.

Soluzione per dialisi: H_2O bidistillata contenente 1 ml di soluzione « Brij-35 » (30 g/dl)/l.

Sieri freschi di soggetti di sesso maschile di età compresa tra 44 e 65 anni, esaminati nel corso di un programma di prevenzione delle cardiopatie coronariche [16].

APPARECCHIATURE

Campionatore: Technicon AutoAnalyzer Sampler IV.

Pompa: Technicon Proportioning Pump III.

Dializzatore: Dialyzer Plate Technicon AutoAnalyzer I con membrane Cuprophan (part. No. 105-1058).

Colorimetro: Technicon AutoAnalyzer II Single Channel Colorimeter.

Registratore: Technicon AutoAnalyzer II Recorder.

Stampante: Technicon Modular Digital Printer.

PROCEDIMENTO

Le componenti del sistema analizzatore Technicon ed il procedimento analitico adottato sono schematicamente rappresentati in Fig. 1.

Condizioni predisposte sulla stampante:

Sampling rate/h:	40
Wash time:	12 sec.
Mode:	normal
Range:	200

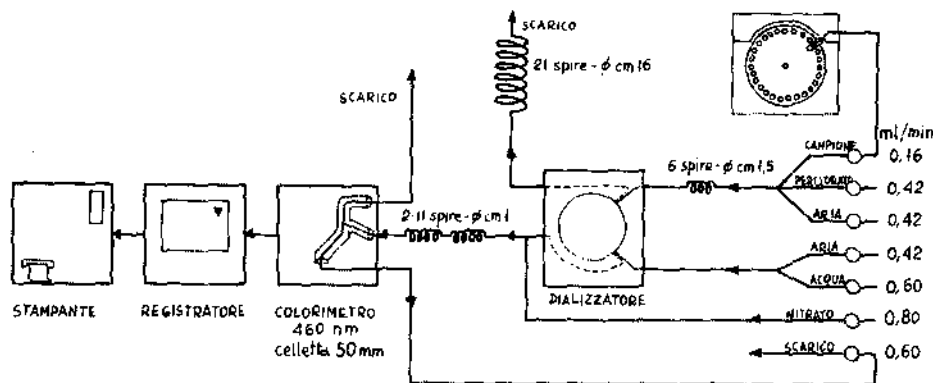


Fig. 1. — Schema del sistema analizzatore e del procedimento analitico adottato.

RISULTATI

Per la caratterizzazione del metodo ora descritto sono state eseguite prove di linearità su 5 standard nel campo di concentrazione compreso tra 20 e 250 $\mu\text{mol/l}$. Ogni misura è stata eseguita in triplicato.

I risultati ottenuti sono mostrati in Fig. 2.

Come si osserva dai coefficienti della retta di regressione fra valori attesi e valori misurati, ed in particolare dal quadrato del coefficiente di correlazione, la *linearità* è molto soddisfacente.

L'*accuratezza* del metodo è stata verificata con prove di recupero su due campioni di siero fresco a cui sono state addizionate aliquote differenti di una soluzione di SCN^- . I valori attesi per i due campioni così predisposti sono rispettivamente di 87,6 e 128,2 $\mu\text{mol/l}$.

L'analisi statistica dei risultati ha evidenziato per i due campioni un recupero del 100% e del 102%. I risultati non mettono dunque in evidenza variazioni di resa nell'arco di concentrazioni considerate.

Le prove di precisione nella serie sono state verificate su una serie analitica comprendente 30 replicati di un *pool* di sieri a concentrazione bassa di tiocianato e 30 replicati di un *pool* a concentrazione alta.

I risultati dell'analisi statistica sui dati raccolti sono riportati in Tab. 1.

Il test di Fisher sulle varianze relative alle due serie non mostra differenze significative. Non ci sono pertanto elementi per affermare che la precisione vari con la concentrazione di SCN^- nel campione misurato. Questo risultato è confermato dall'esame delle variabilità all'interno della corsa nei campioni utilizzati per lo studio della variabilità fra corse (v. seguito). Da tale sperimentazione sono state ricavate 16 deviazioni standard. La SD mediana di questi 16 valori (max 1,41, min. 0,32) è pari a 0,92 unità, in

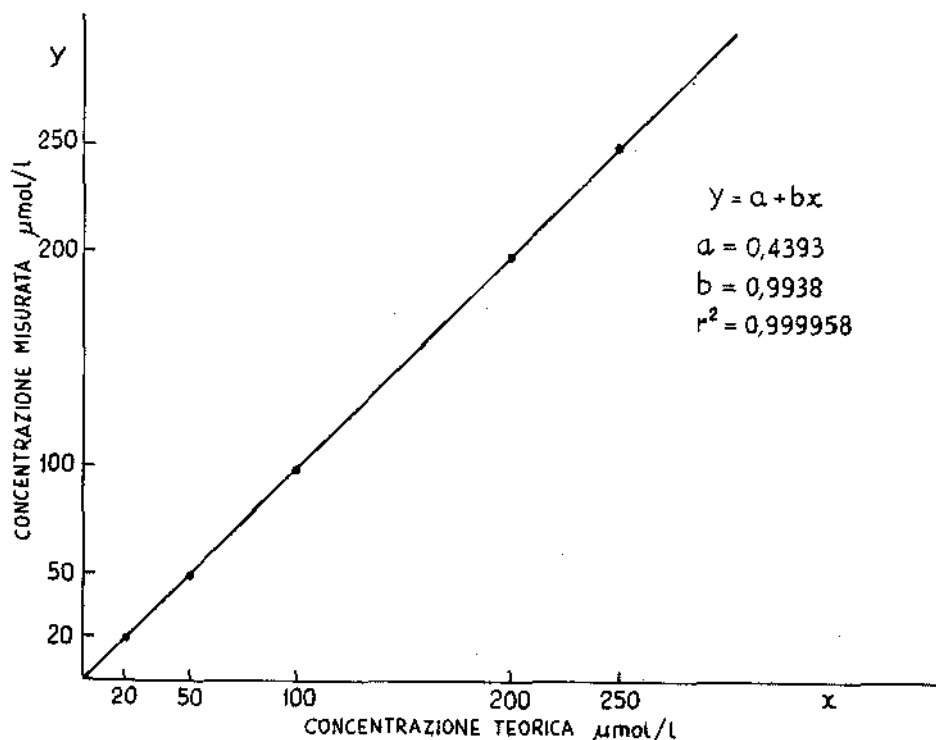


Fig. 2. — Risultati delle prove di linearità.

TABELLA I

Risultati dell'analisi statistica per le prove di precisione intra-serie

n	μmol/l					CV %
	MEDIA	SD	SE	max	min	
30	45,1	0,88	0,16	48,0	44,0	2,0
30	146,5	0,82	0,15	148,0	144,0	0,6

accordo con quanto precedentemente osservato nei due campioni utilizzati per le prove specifiche di precisione all'interno della corsa.

Le prove di precisione tra serie sono state predisposte su tre campioni (rispettivamente a bassa, media e alta concentrazione di SCN^-), ciascuno analizzato in 10 replicati per 6 giorni diversi.

I risultati ottenuti sono sintetizzati in Tab. 2.

TABELLA 2

**Risultati delle prove effettuate per la valutazione della
precisione fra serie**

GIORNO	$\mu\text{mol/l}$		
	C_1	C_2	C_3
1°	33,0	72,9	175,3
2°	28,9	68,4	173,9
3°	30,0	69,0	174,6
4°	32,6	70,5	172,4
5°	34,0	76,1	178,4
6°	32,7	71,4	175,1
<i>Media</i>	31,9	71,4	175,0
<i>SD</i>	1,97	2,83	1,99
<i>CV %</i>	6,2	3,9	1,1

Lo studio della media giornaliera non rivela andamenti particolari nell'arco di tempo considerato (test t sulla pendenza della retta di regressione non significativo).

Il test di Bartlett sulle tre varianze relative alle dispersioni delle medie giornaliere considerate è largamente non significativo ($\chi^2 = 0,8267$, $p < 0,34$). Non ci sono dunque elementi per considerare statisticamente diverse le dispersioni delle medie giornaliere dei tre campioni utilizzati. Essendo tali medie rappresentative dell'intervallo di concentrazioni di interesse, ne deriva che non ci sono elementi per affermare che la precisione varia al variare delle concentrazioni.

Appare quindi ragionevole utilizzare le dispersioni stimate nella serie in esame per derivarne una *SD pooled* che sintetizzi la variabilità in studio. Il valore della grandezza così calcolata è pari a 2,3 unità.

La *correlazione* tra SCN^- e numero di sigarette fumate, per lo studio della quale sono stati analizzati 493 campioni di sieri freschi, risulta notevolmente marcata, come mostra la Fig. 3.

Tale correlazione è lineare, ad eccezione della zona dei fumatori di un numero più elevato di sigarette.

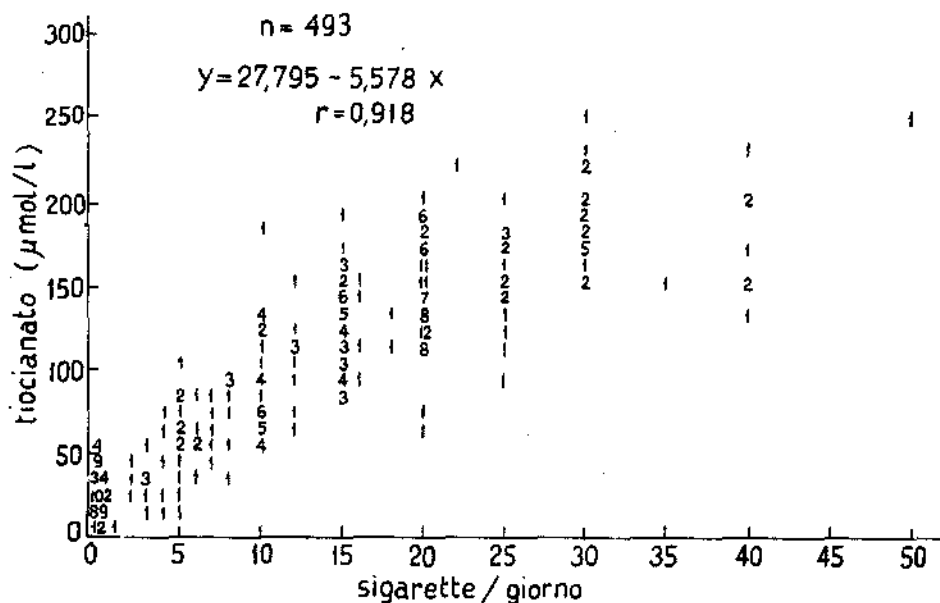


Fig. 3. — Correlazione tra SCN^- e numero di sigarette fumate.

I risultati ottenuti ci permettono anche di indicare, relativamente ai casi esaminati, un punto di *cut off*, discriminante tra fumatori e non fumatori, intorno a $40 \mu\text{mol/l}$, in base al quale si riscontra il 2,8% di falsi positivi e il 5% di falsi negativi.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nelle prove effettuate per la caratterizzazione del metodo, mettono in evidenza soddisfacente linearità, precisione ed accuratezza.

L'applicazione del metodo per la determinazione del tiocianato in 493 campioni di siero mettono in evidenza:

- una più marcata correlazione fra livello di tiocianato e numero di sigarette fumate ($r = 0,918$), rispetto a quella trovata da Butts ($r = 0,46$) e da Vogt ($r = 0,479$);

- la linearità di tale correlazione, ad eccezione della zona corrispondente ai forti fumatori (ulteriori indagini sono necessarie per una corretta interpretazione del fenomeno);

- la possibilità di scelta di un punto di *cut off* notevolmente più basso rispetto a quello indicato da Butts e da Vogt.

Queste caratteristiche, aggiunte a quelle della verificata praticabilità del metodo (velocità di analisi: 40 campioni/h; quantità di campione necessario per l'analisi: 0,25 ml; basso costo di esercizio; facilità di esecuzione dell'analisi), ci permettono di considerare il metodo stesso idoneo per una valutazione obiettiva, precisa, dell'assunzione di fumo ed appropriata la sua applicazione in programmi di medicina preventiva che si prefiggano la riduzione del consumo di tabacco.

Tale metodo risulta di particolare utilità in quanto abitualmente per le valutazioni del consumo di tabacco si ricorre all'uso di questionari che possono risentire e di giudizi soggettivi, e di possibili risposte volutamente false.

Ricevuto il 30 marzo 1979

Accettato il 2 aprile 1979

BIBLIOGRAFIA

1. DE BRABANDER, H. F. & VERBEKE, R. 1977. Determination of thiocyanate in tissues and body fluids of animals by gas chromatography with electron-capture detection. *J. Chrom.* 138: 131-142.
2. LAUGMAN, M. J. S., DOLL, R. & WILSON, J. 1966. Plasma and salivary thiocyanate in gastric cancer. *Gut*. 7: 549-552.
3. DEUSEN, P. M., DAVIDOW, B. & BASS, H. E. 1967. A chemical test for smoking exposure. *Arch. Environ. Health*. 14: 865-874.
4. BOYLAND, E. & WALKER, S. A. 1974. Thiocyanate catalysis of nitrosamine formation and some dietary implications. In: *N-Nitroso Compounds in the Environment*. Bogovk. P. & Walker E. A. (Eds.) WHO, IARC Scientific Publications, vol. 9, pp. 132-136.
5. DASTUR, D. K., QUADRAS, E. V., WADIA, N. H., DESAI, M. M. & BHARUCHA, E. P. 1972. Effect of vegetarianism and smoking on vitamin B₁₂, thiocyanate, and folate levels in the blood of normal subjects. *Brit. Med. J.* 3: 260-263.
6. FOULDS, W. S., BRONTE-STEWART, J. M. & CHISHOLM, I. A. 1968. Serum thiocyanate concentrations in tobacco amblyopia. *Nature*. 218: 586.
7. DARBY, P. W. & WILSON, J. 1967. Cyanide, smoking and tobacco amblyopia. Observations on the cyanide content of tobacco smoke. *Brit. J. Ophthalmol.* 51: 336-338.
8. PETTIGREW, A. R. & FELL, G. S. 1972. Simplified colorimetric determination of thiocyanate in biological fluids, and its application to investigation of the toxic amblyopias. *Clin. Chem.* 18: 996-1000.
9. PETTIGREW, A. R. & FELL, G. S. 1973. Microdiffusion method for estimation of cyanide in whole blood and its application to the study of conversion of cyanide to thiocyanate. *Clin. Chem.* 19: 466-471.
10. OSUNTOKUN, B. O., MONKOSHO, G. L. & WILSON, J. 1969. Relationship of a degenerative tropical neuropathy to diet report of field survey. *Brit. Med. J.* 1: 547-550.

11. MALISZEWSKI, T. F. & BASS, D. E. 1955. « True » and « Apparent » thiocyanate in body fluids of smokers and nonsmokers. *J. Appl. Physiol.* 8: 289-291.
12. BOWLER, R. G. 1944. The determination of thiocyanate in blood serum. *Biochem. J.* 38: 385-388.
13. BUTTS, W. C., KUEHNEMAN, M. & WIDDOWSON, G. M. 1974. Automated method for determining serum thiocyanate, to distinguish smokers from nonsmokers. *Clin. Chem.* 20: 1344-1348.
14. VOGT, T. M., SELVIN, S., WIDDOWSON, G. & HULLEY, S. B. 1977. Expired air carbon monoxide and serum thiocyanate as objective measures of cigarette exposure. *A.J.P.H.* 67: 545-549.
15. MACCHIA, T. 1979. Alcune considerazioni sulla caratterizzazione di un metodo di analisi e sul confronto tra metodiche per la messa a punto di una procedura per l'elaborazione elettronica dei dati. *Ann. Ist. Super. Sanità.*
16. Gruppo Collaborativo Europeo dell'OMS. 1976. Esperimento controllato internazionale di prevenzione multifattoriale della cardiopatia coronarica. *Ann. Ist. Super. Sanità.* 12: 303-315.

**Sostanze capaci di provocare polineuropatia, impiegate nella
industria calzaturiera (triarilfosfati, idrocarburi alifatici C5-C7)**

NORA FRONTALI, ANNA MARIA GUARCINI (*),
AMEDEO SPAGNOLO (*), MARIA CARLA AMANTINI

Laboratorio di Igiene del Lavoro, Istituto Superiore di Sanità

INDICE

1. - INTRODUZIONE	Pag. 273
2. - TRICRESILFOSFATO	» 278
2.1. - Terminologia, caratteristiche chimico-fisiche e usi industriali	» 278
2.2. - Vie di introduzione, distribuzione, escrezione, accumulo	» 279
2.3. - Tossicità	» 281
2.4. - Metabolismo e meccanismo d'azione neurotossica dei triarilfosfati	» 286
2.5. - Controlli sull'ambiente di lavoro e sui lavoratori esposti; normativa	» 289
3. - IDROCARBURI ALIFATICI C5-C7	» 291
3.1. - Terminologia, caratteristiche chimico-fisiche	» 291
3.2. - Vie di introduzione e successivo destino nell'organismo; interazione con altre sostanze	» 292
3.3. - Tossicità	» 299
3.4. - Controlli sull'ambiente di lavoro e sui lavoratori esposti; normativa	» 308

1. - INTRODUZIONE

Fra i tossici industriali che danneggiano il sistema nervoso, la maggior parte attacca il neurone, altri (non presi in esame nella presente rassegna) le cellule di sostegno. La particolare vulnerabilità del neurone, come è stato fatto notare da vari autori, è probabilmente dovuta fra l'altro a problemi connessi con il mantenimento trofico di una fibra nervosa, le cui dimensioni sono enormi relativamente al corpo cellulare che la mantiene [1, 2]. Dato

(*) Borsista presso il Laboratorio di Igiene del Lavoro.

questo punto debole, che ne rappresenta il bersaglio comune, non stupisce che sostanze anche molto diverse chimicamente (come esteri fosforici, arsenico, solfuro di carbonio, idrocarburi alifatici e derivati, vari farmaci ecc.) possano convergere a dare, nelle persone esposte, quadri clinici e anatomo-patologici molto simili tra loro, aventi in comune ciò che Cavanagh [3, 4] e altri autori chiamano il processo di «dying back» (degenerazione retrograda) e che più recentemente Spencer e Schaumburg [5], per motivi che vedremo più avanti, propongono di chiamare invece «assonopatia distale centrale-periferica», o, più semplicemente, «assonopatia distale». Si tratta di polineuropatie sensoriali e motorie, a sviluppo rapido o lento, caratterizzate da una degenerazione assonale simmetrica, che ha inizio distalmente in assoni lunghi del sistema nervoso periferico e centrale, estendendosi quindi in zone via via più prossimali dell'assone, ma senza arrivare a coinvolgere il corpo cellulare. Durante il corso stesso della malattia si assiste a fenomeni di rigenerazione ad opera del corpo cellulare stesso, che va incontro infatti a modificazioni reattive (cromatolisi, visibile anche al microscopio ottico in animali da esperimento). La relativa prevalenza di sintomi periferici motori, sensoriali o del sistema neurovegetativo varia a seconda della singola sostanza tossica in questione e della entità della esposizione. Il coinvolgimento della mielina, a differenza di quanto erroneamente ritenuto dai primi osservatori della malattia [6], è soltanto secondario e consiste in una demielinizzazione in rapporto con la degenerazione assonale, e in successivi fenomeni di rimielinizzazione. A carico del sistema nervoso centrale (SNC) la degenerazione coinvolge in misura variabile le colonne dorsali (specialmente il fascio gracile), i tratti spinocerebellari, i corticospinali e, nei casi più gravi, anche alcuni tratti più brevi. La rigenerazione consente un ripristino della funzione nel sistema nervoso periferico (SNP); non così nel SNC: ciò conduce, nei casi in cui esso è coinvolto, ad alterazioni permanenti, come spasticità e atassia. Per diversi di questi tossici industriali (esteri fosforici, solfuro di carbonio, acrilamide, idrocarburi alifatici e derivati) e farmaci è stato dimostrato anche un comune quadro morfologico, molto simile a quello di una malattia ritenuta congenita, descritta per la prima volta nel 1972 da Asbury e Coll. [7] e denominata «neuropatia gigante-assonale»; per altri (ad esempio per l'arsenico), uno studio accurato non è stato ancora fatto.

La storia delle nostre conoscenze su questo tipo di polineuropatia ha inizio del 1930, in seguito a un episodio di intossicazione di massa da tricresilfosfato (TCP) avvenuto negli Stati Uniti [8, 9]. Successivamente sono state riconosciute, anche sulla base delle somiglianze morfologiche dei quadri biotipici umani e delle lesioni osservate sperimentalmente in animali, le affinità di queste forme neurologiche con altre già note da vecchia data determinate da arsenico [10], tallio [11] e da solfuro di carbonio [12], mentre nuovi agenti causali di polineuropatie dello stesso tipo sono stati riconosciuti nella

acrilamide [13], nel dietil-ditiocarbammato [14], nel normal-esano [15], nel metil-butil-chetone [16] e nei tetraclorobifenili [17]. Questo elenco riguarda esclusivamente tossici industriali (e i riferimenti bibliografici si limitano alle prime osservazioni sull'argomento), ma della lista fanno parte anche numerosi farmaci come la bromofenilacetilurea, l'isoniazide, il tetraetiltiuram disolfuro o antabuse, i nitrofurani, la talidomide (per tutti questi farmaci, come per i tossici industriali sopra citati, vedansi le importanti rassegne di Cavanagh [3, 4] e di Spencer e Schaumburg [5]), e le idrossichinoline cloridrate (migliaia di casi di una polineuropatia denominata « subacute myeloptico-neuropathy » o SMON dovuti a queste ultime sono stati rilevati in Giappone [18]).

Polineuropatie caratterizzate da un quadro clinico che rientra perfettamente in quello sopra delineato sono state segnalate nell'industria calzaturiera e affine (specialmente italiana, ma anche di altri paesi, vedansi ad esempio [19, 20]) fin dal 1957 [21], cioè negli anni successivi alla introduzione nelle fabbriche di scarpe e di pelletterie (e nelle afferenti lavorazioni a domicilio) di nuove tecnologie fondate sull'uso di mastici e colle a rapida presa. Non è possibile qui passare in rassegna le innumerevoli pubblicazioni di autori italiani su questo argomento, a cui sono stati anche dedicati appositi convegni scientifici (*); si rimanda per questo alle ottime rassegne di Mazzella di Bosco e Fonzi [22], Abbritti e Coll. [23, 24] e di Carnevale e D'Andrea [25]. Il numero di casi clinici pubblicati è di parecchie centinaia, come risulta dalla Tab. 1, nella quale sono riportati solamente i casi di malattia conclamata; ricerche epidemiologiche [52, 55, 61, 64, 67, 68, 70], eseguite con metodologia del tipo di quella indicata a pag. 309, hanno permesso di mettere in evidenza in determinati ambienti di lavoro calzaturiero anche forme lievi e subcliniche. Si tratta in prevalenza di giovani donne, probabilmente in rapporto con la circostanza, citata dai suddetti lavori epidemiologici, che esse rappresentano la manodopera largamente prevalente in questo tipo di attività produttiva.

In sintesi, il quadro clinico che emerge da questo complesso di pubblicazioni è il seguente. La malattia ha un periodo prodromico caratterizzato da sintomi generali come malessere, disappetenza, nausea, vertigini, dimagramento, cefalea, sonnolenza, insonnia, facile stancabilità. L'intensità di questi disturbi varia a seconda dei casi; spesso essi vengono sottovalutati dal paziente stesso. Compaiono poi parestesie sotto forma di formicolii ai piedi e alle mani, crampi muscolari notturni, specie ai polpacci, dolori muscolari, debolezza agli arti. Quest'ultimo sintomo si intensifica fino a rendere difficile la deambulazione per la comparsa di vere e proprie paralisi. Queste

(*) Ad esempio: Napoli, 1973; Bari, 1976; Padova, 1976.

TABELLA I

Casi di polineuropatia nel settore calzaturiero e affine riportati da autori italiani (a). Sono esclusi i casi subclinici

Riferimenti bibliografici	Anno di pubblicazione	N. casi	Località di		Periodo a cui si riferiscono le osservazioni
			Provenienza	Ricovero	
[21, 26]	1957, 1958	12	Vigevano	Pavia	1956-57
[27]	1959	8	—	Milano	—
[28]	1962	6	—	Pisa	—
[29]	1962	5	—	Bologna	1960
[30]	1962	14	Piacenza	—	1961
[31]	1963	13	—	Bologna	1961
[32]	1963	2	Venezia	—	—
[33]	1964	8	Firenze	—	1961-62
[34]	1964	1	—	Pavia	1963
[35]	1965	15	Piacenza	—	1961
[36]	1966	8	—	Lucca	—
[37]	1967	2	—	Pavia	1963
[38]	1967	5	Marche	—	—
[39]	1967	72	Lombardia, Veneto, Emilia, Toscana, Marche	—	1962-66
[40]	1967	5	—	Imola	—
[41]	1968	5	Pesaro	—	1966
[43, 47]	1968	42	—	Milano	1960-67
[44]	1968	12	—	Pavia	—
[45]	1968	15	Pavia	—	1957-68
[46]	1968	5	Verona	—	1963-64
[48]	1968	8	Vercelli	—	—
[49]	1969	30	—	—	1965-66
[42, 50]	1968, 1969	56	—	Padova, Verona	1963-68
[51]	1971	8	Macerata	—	1968-70
[52, 66]	1971, 1978	16	—	Pavia	1970
[53]	1972	50	Marche	—	—
[54]	1973	2	Trento	—	1972
[57, 58]	1973	48	—	Napoli	1969-73
[59]	1973	8	Arezzo	—	1973
[60]	1973	31	—	Verona	1969-73
[22]	1974	30	Napoli	—	1973
[62]	1974	6	—	Napoli	1972-73
[55, 56]	1976, 1979	22	Siena	Siena	1973-78
[61, 63]	1973, 1976	79	Marche, Umbria, Toscana	—	1971-74
[76]	1976	4	—	Verona	—
[64]	1977	44	—	Verona	—
[65]	1977	32	Marche	—	1970-73
[70]	1977	1	Camaiore	—	—

(a) È compresa la confezione di pelletterie e di impermeabili, non invece la produzione di tela o carta adessiva, la ricostruzione di pneumatici, la tappezzeria di automobili.

(b) V. nota a pag. 310; la referenza [29] contiene un ulteriore apporto di casi.

interessano dapprima i movimenti delle dita del piede, poi quelli del piede, della gamba, e via via progrediscono in senso prossimale fino ad arrivare a una paralisi degli arti inferiori più o meno completa, con impossibilità di mantenere la stazione eretta e di camminare; lo stesso si verifica frequentemente anche a carico degli arti superiori. La paralisi è flaccida, con perdita dei riflessi osteotendinei, ed è accompagnata da atrofie muscolari. Vi è anche disturbo della sensibilità con formicolii e diminuzione della sensibilità tattile, termica e dolorifica « a calza » e « a guanto ». Questa condizione dura di solito 1-2 mesi; l'evoluzione successiva comporta una progressiva ricomparsa della motilità e riduzione dei disturbi sensoriali fino ad arrivare dopo parecchi mesi ad un recupero, che nelle forme meno gravi è completo o quasi. In altri casi, la malattia lascia invece esiti permanenti: alla paralisi flaccida, con riduzione dei riflessi osteotendinei, si sostituisce allora una certa spasticità con aumento degli stessi riflessi; permangono deficit motorio, disturbi della sensibilità e alterazioni riscontrabili all'esame elettromiografico (per le osservazioni sui postumi vedansi ad esempio le referenze [41, 49, 51, 52, 63, 64, 69, 71]).

In alcuni casi sono stati descritti anche disturbi riscontrabili a un esame otofunzionale [50, 60, 69]. In un certo numero di casi compaiono inoltre disturbi psichici [39, 49, 73] e alterazioni dell'elettroencefalogramma [31, 58, 69, 72, 74, 75]. Uno studio al microscopio ottico ed elettronico, compiuto da Rizzuto e Coll. [76] su frammenti di nervi superficiali prelevati per biopsia, ha mostrato un quadro del tutto sovrapponibile alla degenerazione giganto-asonale sopra citata.

Come accennato sopra, la malattia può presentarsi anche in forme lievi e subcliniche, caratterizzate soltanto dalla presenza di sintomi soggettivi (crampi muscolari, debolezza agli arti inferiori, dolori diffusi agli arti, parestesie soprattutto alle mani) e di segni dimostrabili con l'esame elettrodiagnostico [63, 67, 68].

Inizialmente la polineuropatia dei calzaturieri venne attribuita esclusivamente al tricresilfosfato (TCP) di cui era noto l'impiego come plastificante sia nelle pelli, specialmente artificiali, sia nei collanti e in particolare al suo isomero *orto* (TOCP). A quel tempo infatti non era ancora nota la polineuropatia da idrocarburi alifatici, sostanze che sono, ed erano già allora, impiegate come solventi dei collanti in uso nell'industria calzaturiera (va anche considerato che la dimostrazione di tale nesso etiologico era inizialmente contenuta solo in pubblicazioni giapponesi di difficile reperimento in campo internazionale). Come meglio illustrato più avanti, il TCP è scarsamente volatile (quindi è poco probabile che venga assunto per via inalatoria), ma per contatto penetra facilmente attraverso la pelle. Ove esso sia presente nei materiali impiegati, questo potente veleno, che come vedremo ha anche la proprietà di accumularsi nell'organismo, può essere causa di polineuropatia ove venga assorbito in quantità superiori a determinati limiti. Tuttavia

sempre più frequentemente sono stati descritti episodi di polineuropatia fra gli addetti a lavorazioni che non contemplavano uso di materiali contenenti TCP, e che invece erano esposti alla inalazione di idrocarburi alifatici fra cui n-esano.

Viene successivamente passata in rassegna la letteratura scientifica sulla tossicità di questi due gruppi di sostanze, con particolare riguardo a quegli aspetti che vengono ritenuti utili ai fini della valutazione della loro nocività nell'ambiente di lavoro.

2. - TRICRESILFOSFATO

2.1. - Terminologia, caratteristiche chimico-fisiche e usi industriali

Il tricresilfosfato (TCP, o tritolilfosfato; nomi commerciali: Celluflex, Kronitex, Lindol) è l'estere tris-metilfenilico dell'acido fosforico; si tratta di una miscela di isomeri (gli isomeri possibili sono dieci, vedi Tab. 2).

TABELLA 2

Nomenclatura (a) dei 10 isomeri del tricresilfosfato

tri- <i>o</i> -cresilfosfato (TOCP)
tri- <i>m</i> -cresilfosfato (TMCP)
tri- <i>p</i> -cresilfosfato (TPCP)
<i>o-m-p</i> -cresilfosfato
<i>o</i> -cresil, di- <i>m</i> -cresilfosfato
<i>o</i> -cresil, di- <i>p</i> -cresilfosfato
<i>m</i> -cresil, di- <i>o</i> -cresilfosfato
<i>m</i> -cresil, di- <i>p</i> -cresilfosfato
<i>p</i> -cresil, di- <i>o</i> -cresilfosfato
<i>p</i> -cresil, di- <i>m</i> -cresilfosfato

(a) Con altre nomenclature il radicale « cresil » viene indicato come « toliil », e le posizioni *orto*, *meta* e *para* vengono denominate 2, 3 e 4.

Il TCP si ottiene industrialmente dalla reazione dell'ossicloruro di fosforo (POCl_3) con la frazione cresolica dei catrami (di cokeria o di petrolio). Questa ultima è costituita dai vari isomeri del cresolo (*orto*, *meta* e *para* abbreviati *o*, *m*, e *p*, ovvero, secondo un'altra nomenclatura, 2-, 3-, e 4-), ma può contenere come impurezze anche altri alchilfenoli. La composizione varia a seconda della fonte (carbone o petrolio) e della lavorazione.

Quando, come vedremo più avanti, fu messa in evidenza la capacità del tri-*o*-cresilfosfato (TOCP) di provocare polineuropatia, negli USA e in Germania furono introdotte normative che limitavano al 3% i gruppi *o*-cresilici reperibili nel TCP commerciale. Preparazioni di TCP così rettificata si ottengono rettificando in partenza la frazione cresolica dei catrami; si può giungere anche a miscele con meno dell'1,5% di gruppi *o*-cresilici (vedasi più avanti per le analisi fatte da vari autori sulla efficacia di questi provvedimenti).

Bondy e Coll. [77] riportano la composizione di una frazione cresolica rettificata: oltre ai tre isomeri del cresolo, che ne rappresentavano complessivamente il 75%, erano presenti anche il 3% di *orto*-etilfenolo e il 22% di xilenoli. Capellini e Coll. [43] rilevano che le combinazioni possibili sotto forma di triarilfosfati salgono così a 84.

Le caratteristiche chimico-fisiche dei tre esteri simmetrici trisostituiti tri-*orto*-cresilfosfato (TOCP), tri-*meta*-cresilfosfato (TMCP) e tri-*para*-cresilfosfato (TPCP) sono riportate nella Tab. 3.

Per le sue peculiari caratteristiche chimico-fisiche, il TCP ha trovato varie applicazioni tecnologiche, e fin dai primi decenni del secolo viene prodotto industrialmente su larga scala. Esso è impiegato fra l'altro come fluido idraulico in circuiti di macchine, olio lubrificante per motori di jet (volatilità poco pur alle altissime temperature ivi raggiunte), lubrificante in varie produzioni (anche di calzature), ritardante di fiamma, plastificante. Questo ultimo impiego riguarda varie plastiche, smalti e vernici, vinilpelle e altre pelli artificiali, cuoio sintetico e rigenerato, gomme sintetiche, lavorazioni speciali della gomma naturale, polistirolo espanso (tutti questi materiali possono contenere TCP fino a percentuali dell'ordine del 35% [25, 43]), collanti (1-2% per ottenere l'effetto plastificante, fino al 4% per recuperare partite di collante invecchiate [25]).

2.2. - *Vie di introduzione, distribuzione, escrezione, accumulo*

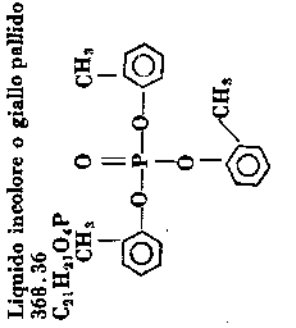
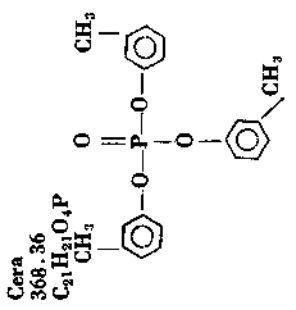
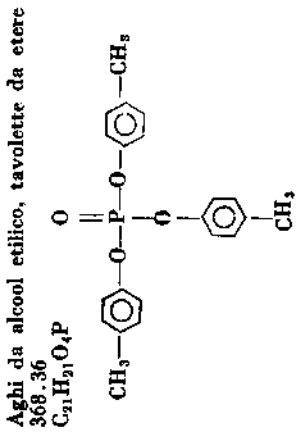
In accordo con la scarsissima volatilità del TCP e con le sue caratteristiche di solubilità, le vie principali di introduzione nell'organismo sono la cutanea e quella per ingestione (nell'ambiente di lavoro calzaturiero questa ultima può realizzarsi per contaminazione delle mani portate alla bocca, specialmente se il pranzo viene consumato nella stessa stanza dove si lavora). In particolari ambienti di lavoro è da considerare anche la via aerea, per la possibilità della formazione di aerosoli [78].

La straordinaria rapidità ed efficienza con cui il TOCP viene assorbito per via percutanea nell'uomo è stata dimostrata nel 1943 da autori americani [79] i quali hanno fatto applicare con massaggio sulle palme delle mani di due persone ben 0,1 e rispettivamente 0,2 g di questa sostanza, marcata

TABELLA 3

Caratteristiche chimico-fisiche del TOCP, TMCP e TPCP

	Tri- <i>o</i> -cresilfosfato	Tri- <i>m</i> -cresilfosfato	Tri- <i>p</i> -cresilfosfato
Forma cristallina			
Peso molecolare			
Formula grezza			
Formula di struttura			
Densità	1,183 ²⁵	1,150 ²⁵	1,247 ²⁵
Temperatura di fusione (°C)	11	25-26	77-78
Temperatura di ebollizione (°C) ai mm di Hg indicati	410760 (con scarsa decomposiz.) 263-265 ²⁰	258-263 ⁴	2443.5
Tensione di vapore (mm Hg)	10 (198°C)	—	—
Temperatura di infiammabilità (°C)	225	—	—
Solubilità in:			
acqua	Leggermente solubile	Insolubile	Solubile
alcol etilico	Solubile	Leggermente solubile	Solubile
acido acetico	Solubile	Solubile	Molto solubile
etere	Solubile	Solubile	Solubile
benzene	Solubile	—	Solubile
cloroformio	—	—	Solubile



con fosforo radioattivo (*). Già dopo un'ora la radioattività si ritrovava nel sangue in quantità corrispondenti a 4 e rispettivamente 13 μg di TOCP/100 ml; diminuiva quindi nelle 24 ore successive fino a valori non determinabili. L'escrezione urinaria, che continuava per alcuni giorni, risultò ammontare complessivamente allo 0,1-0,4 % della dose applicata. Nella zona di applicazione non si ebbe alcuna reazione locale. Con lo stesso prodotto radioattivo questi autori hanno anche studiato (oltre all'assorbimento e l'escrezione), anche la distribuzione in vari tessuti di un cane, dopo assorbimento cutaneo, dimostrando un accumulo preferenziale di TOCP nel fegato, ma una sua presenza anche nel muscolo, cervello, tessuto osseo. Esperimenti sull'assorbimento, la distribuzione e l'escrezione di TOCP, TMCP e TPCP puri, introdotti nell'organismo per diverse vie, sono stati compiuti su vari animali da Gross e Grosse [80].

La capacità di accumulo del TOCP nell'organismo risulta anche dalla possibilità di ottenere paralisi in animali somministrando ripetutamente, a distanza di giorni, piccole dosi, di per sé inefficaci [9, 81].

2.3. - Tossicità

I sintomi a breve scadenza della assunzione di TCP nell'uomo sono stati descritti in occasione di episodi di intossicazione alimentare [8, 9, 81, 82, 84-88], industriale [89] (per altre indicazioni bibliografiche vedasi [90]), da farmaci [83] (per una rassegna vedasi [91]), o da contatto con materiali plastici [92, 93]. La scoperta della neurotossicità del TCP avvenne proprio in rapporto con l'ormai famoso episodio della *ginger-jake paralysis*, avvenuto durante tutto l'anno 1930 negli Stati Uniti, nel quale più di 16.000 persone furono colpite da paralisi per aver consumato liquori allo zenzero adulterati. La causa di questa catastrofe nazionale fu trovata da Smith e Coll. [8, 9, 81], i quali misero in evidenza che i campioni di liquori incriminati contenevano TOCP. Si ricostruì allora che estratti di zenzero erano stati addizionati con TCP, forse per aumentarne la parte non evaporabile e quindi il valore commerciale. Da allora ebbero luogo molti altri episodi di contaminazione alimentare fraudolenta o accidentale con TCP, favoriti anche dal fatto che esso si presenta come un liquido incolore, inodoro e insaporo, privo di proprietà irritanti locali. I sintomi descritti dai vari autori sono sostanzialmente gli stessi, e cioè quelli descritti nell'introduzione della presente rassegna (assonopatia distale). Con una latenza, che nel caso della assunzione unica dell'agente tossico è di 8-14 giorni, si hanno: parestesie (formicolio o bruciore

(*) Gli autori della presente rassegna esprimono le più ampie riserve sulla liceità etica e deontologica di questo esperimento.

specialmente ai piedi) seguite da diminuzione della sensibilità termica e dolorifica « a calza » e « a guanto »; debolezza motoria inizialmente ai piedi, poi alle gambe e alle mani; caduta del piede che provoca andatura a passo di gallo; vi è anche un certo grado di incoordinazione. I sintomi progrediscono per circa due settimane fino a paralisi degli arti inferiori o dei quattro arti; poi rimangono stazionari per parecchie settimane prima di cominciare a regredire in ordine inverso a quello della loro comparsa. Nei casi lievi il recupero può essere completo o quasi; i casi più gravi sviluppano spasticità e atassia, mentre permane diminuzione della sensibilità alle mani e ai piedi [4]. In caso di forte assunzione alimentare singola, sono descritti sintomi iniziali rappresentati da dolori addominali, nausea e diarrea [82]. Si sono avuti anche casi mortali: si è calcolato che queste persone potevano aver ingerito intorno a 0,1 g/kg di TCP [94].

I sintomi acuti della intossicazione da TOCP in animali da esperimento, che inizialmente comprendono anche diarrea, eventualmente con sangue, poi sintomi a carico del sistema nervoso centrale e periferico, in alcune specie con convulsioni, seguite a volte da coma e morte, sono descritte da autori americani e tedeschi degli anni '30 (8, 9, 80), che osservarono anche la bassa tossicità del TPCP [9, 80] e del TMCP [80]. Per il TOCP puro vengono citate le seguenti dosi minime letali: 0,1 g/kg per via orale nel coniglio [9, 80], 0,1 g/kg per via sottocutanea o intraperitoneale nel cane [80], 0,5-1 g/kg per via sottocutanea in *Macacus rhesus* [9], 0,3-0,5 g/kg per via sottocutanea in gatti e cavie [80], > 1 g/kg per via orale nel pollo [9], e le seguenti DL_{50} : 0,33 g/kg per via intraperitoneale nel topo [79] e 12 g/kg per via orale nel ratto [95].

Per alcune specie animali (conigli, cani, *Macacus rhesus*) la dose paralizzante non è molto minore della dose minima mortale; per questo Smith e Coll. inizialmente trovarono difficoltà a riprodurre i quadri clinici umani in animali da laboratorio, finché questo non riuscì loro, dapprima in alcuni vitelli, poi nei polli [9]. Altri animali che sviluppano una polineuropatia assai simile a quella umana sono il gatto, la pecora, l'anatra, il fagiano [4]. In genere i bambini e i piccoli degli animali sono meno sensibili degli adulti [4, 96]. Le minime dosi, necessarie per la comparsa di questi sintomi nel pollo adulto, secondo vari autori [94-99] si collocano fra 0,05 e 0,25 g di TOCP/kg; si considera generalmente che dosi simili valgano anche per l'uomo.

La scoperta di Smith e collaboratori della presenza di TOCP nei liquori incriminati [8], la riproduzione della malattia nel pollo trattato con TOCP puro [9] e la inefficacia di una serie di altri triarilfosfati [9, 80] avevano fatto pensare che il TOCP fosse l'unico componente del TCP responsabile della polineuropatia. Per questo si è diffusa l'abitudine di indicare indifferentemente il TCP o il TOCP come agente eziologico di polineuropatie dovute al

prodotto commerciale (TCP). Su questa base, e alla ricerca di processi produttivi che dessero luogo a preparazioni meno nocive, si cominciò a saggiare, sul modello sperimentale rappresentato dalla polineuropatia nel pollo, tutta una serie di preparazioni commerciali di TCP, contenenti percentuali note di gruppi *o*-cresilici. Si scoprì così che quest'ultimo parametro non andava affatto di pari passo con la neurotossicità. Henschler [90, 100] dimostrò infatti che preparati di TCP contenenti intorno al 30% di gruppi *o*-cresilici potevano risultare anche 10 volte più neurotossici del TOCP puro, e che questo era dovuto alla presenza in notevoli concentrazioni di isomeri misti mono-*orto* sostituiti. Bastavano infatti 10-20 mg/kg dei trifenilfosfati metilati in posizione *orto-para-para* e *orto-para-meta* per provocare paralisi nel pollo, contro i 100-200 mg/kg di TOCP. Secondo l'autore, questi isomeri misti mono-*orto* sostituiti si formano preferenzialmente quando la concentrazione di *o*-cresolo nella miscela da fosforilare non è molto alta. Risultati analoghi, per somministrazione cutanea anziché orale nel pollo, sono stati ottenuti da Glee e White [101], con un massimo di neurotossicità per le preparazioni di TCP con una percentuale di *o*-cresolo del 26,7. Ritornando ai lavori di Henschler, i composti metilati in posizione *orto-orto-meta* e *orto-orto-para* avevano invece sul pollo una neurotossicità circa 5 volte maggiore del TOCP puro. Preparati di TCP rettificato, contenenti il 3% di gruppi cresilici, risultarono solo 3 volte meno neurotossici del TOCP puro. Nel 1959 Carpenter e Coll. [102], saggiando su varie specie di animali da esperimento la neurotossicità di una preparazione di TCP rettificata a meno dell'1,5% di gruppi *o*-cresilici, la trovarono solo 5 volte meno neurotossica del TOCP puro. L'anno successivo Bondy e Coll. [77], in uno studio commissionato da due importanti industrie chimiche produttrici di TCP, alla ricerca di triarilfosfati non neurotossici di possibile impiego alternativo come plastificanti, trovarono che anche eliminando totalmente l'*orto*-cresolo dalla miscela cresolica, il prodotto fosforilato risultava pur sempre neurotossico. Dimostrarono anche che ciò era dovuto alla formazione di altri triarilfosfati altamente neurotossici (v. più avanti) a partire da alcune impurezze presenti nella miscela (ad esempio l'etilfenolo). Un plastificante privo di neurotossicità si poteva invece ottenere fosforilando una miscela sintetica di *meta*-cresolo, *para*-cresolo, 2,4-dimetilfenolo e 2,5-dimetilfenolo.

La presenza nel TCP commerciale di una pluralità di composti neurotossici spiega come mai si siano avute indicazioni non univoche quanto alla dose minima capace di provocare polineuropatia nell'uomo. Per il TCP non rettificato i valori si collocano fra i 15 e i 150 mg/kg, cioè fra 0,1 e 1 g/persona [90, 94]. Ciò significa quindi, sulla base dei dati sopra riportati [90, 100, 101], che per il TCP rettificato al 3% di gruppi *o*-cresilici, la dose capace di provocare polineuropatia nell'uomo dovrebbe collocarsi intorno ai 450 (150 × 3) mg/kg, cioè ai 3 g/persona.

Se si considera la facile penetrazione per via cutanea, la capacità di accumulo nell'organismo, la possibilità di un contatto giornaliero di parecchie ore con materiali che possono cedere questi composti, ci si rende conto che non è impossibile che in determinate circostanze fra i calzaturieri italiani si siano potute raggiungere dosi di TCP capaci di provocare polineuropatia, e che l'esposizione a questo composto continua a essere un rischio da considerare. Quanto all'effettivo ritrovamento di TCP in materiali usati in ambienti di lavoro calzaturiero italiano dove si sono verificati casi di assonopatia distale, vedasi la Tab. 4. Sono stati descritti casi di polineuropatia insorta in operai calzaturieri che non erano stati esposti a collanti ma a contatto con pelli artificiali [60].

TABELLA 4

Notizie sul ritrovamento di TCP nei materiali impiegati in ambienti di lavoro calzaturiero italiano, dove si erano verificate polineuropatie

AUTORI	Riferimento bibliografico	Materiale	Osservazioni	Contenuto % in TCP
Capellini e Coll. . . .	[43]	Vari	Presente in 15 campioni su 78 Presente in 3 campioni su 44	— —
Crepet e Coll.	[42]	{ Collanti Pelli sintetiche	Talvolta presente	0,1-0,2
Graev e Coll.	[51]	{ Celloresina Celloresina Pelle trattata con celloresina	— — —	1 3,4 —
Lanzarini e Coll. . .	[30]	{ Collanti Pelli	— —	— —
Rossi e Coll.	[62]	Collante	—	0,4
Bartolucci e Coll. . .	[220]	Vari	Presente nel 47% dei campioni	1,1-10,7

Una volta passati in rassegna gli aspetti relativi alle dosi di TCP capaci di provocare polineuropatia, possiamo agli studi istopatologici, che sono stati compiuti su animali da esperimento o su persone (reperiti biotici) affetti da polineuropatia da TCP. Tuttavia, per spiegare la terminologia che è stata impiegata dalla maggior parte degli autori in questo campo a partire dagli anni '50 (da quando cioè fu scoperto che anche fra i trialfosforati vi erano composti capaci di provocare polineuropatia [103]), occorre fare una piccola digressione, che allarga la visuale anche ad altri esteri dell'acido fosforico.

Due sono infatti le categorie di esteri fosforici, prodotte industrialmente su larga scala, che contengono agenti potentemente capaci di provocare questo tipo di polineuropatia: gli alchil (o arilalchil) fosfati, impiegati come insetticidi per le loro proprietà di inibitori della acetil-colinesterasi (AChE), e i triarilfosfati. Storicamente questi ultimi sono stati più spesso responsabili di episodi di polineuropatia proprio a causa della loro minore tossicità acuta e quindi della minore attenzione con cui sono stati manipolati. Tuttavia anche alcuni fra gli alchil- e gli arilalchilfosfati (ad esempio il di-isopropilfosfato o DFP, il mipafox, il leptofos) provocano assonopatia distale una volta superati i sintomi acuti da inibizione della AChE: questa forma morbosa è stata perciò chiamata anche « neuropatia ritardata » (*). Alcuni di questi composti rivelano la loro capacità di provocare la neuropatia ritardata in animali sperimentali se i sintomi acuti da inibizione della AChE sono efficacemente combattuti con atropina e con ossime, in modo da farli sopravvivere a dosi altrimenti mortali [105].

Qualunque sia il composto organofosforico che ha dato origine alla neuropatia ritardata, il quadro istopatologico è lo stesso, e cioè in tutti gli animali studiati, compreso l'uomo, nel sistema nervoso centrale e periferico compaiono focolai sparsi di degenerazione di fibre nervose. Sono colpite prevalentemente fibre (motrici e sensoriali) componenti dei nervi lunghi degli arti e fibre lunghe spinali; sono colpite dapprima le regioni della fibra più distali rispetto al corpo cellulare, poi quelle più prossimali. Questo fenomeno, che va in parallelo con l'evoluzione dei sintomi in senso prossimale, è quello che ha ispirato l'espressione sopra riportata di processo di « dying back » o degenerazione retrograda. Sono specialmente colpiti gli assoni di diametro maggiore. Parallelamente ai sintomi, questa degenerazione delle fibre nervose si aggrava per due settimane; poi cominciano a comparire fenomeni di rigenerazione con le usuali, tipiche alterazioni reattive dei corpi cellulari. È ormai chiaro [97, 106, 107, 222 (**)] che il fenomeno primario non è la demielinizzazione, come era stato originariamente ipotizzato da Smith e Coll. [6], bensì un rigonfiamento localizzato degli assoni; secondariamente, nel punto rigonfiato la mielina si assottiglia. Successivamente, a valle del rigonfiamento, l'assone va incontro a frammentazione e degenerazione insieme con la mielina, come se nel punto del rigonfiamento esso fosse stato tagliato (degenerazione walleriana). Al microscopio elettronico [108, 109, 223 (**)], negli assoni rigonfiati, sono visibili vacuoli e accumuli di reticolo endoplasmico liscio.

(*) Sperimentalmente è stata descritta anche una forma di neuropatia con tempo di insorgenza intermedio da DFP [104].

(**) V. nota a pag. 310.

Ritornando ora a parlare più specificamente del TCP e dei suoi componenti, dopo l'osservazione fatta da Bloch nel 1941 [110] che il TOCP provocava una certa inibizione della colinesterasi del siero di cavallo *in vitro*, vari autori hanno cominciato a studiare più estesamente l'effetto dei triarilfosfati e in particolare del TOCP sulle diverse colinesterasi, non solo *in vitro*, ma anche *in vivo*. Risultò allora che, mentre *in vitro* il TOCP (con buon grado di purezza) era inattivo sulla AChE degli eritrociti umani e praticamente anche sulla butirril-colinesterasi (BuChE) del plasma umano e di pollo [98, 111], *in vivo* l'effetto inibitorio era nettissimo sulla BuChE plasmatica del pollo [98, 112], e presente, seppure in grado assai minore, anche sulla BuChE e AChE del loro SNC [98, 112]. La ragione di questa discrepanza divenne chiara quando fu dimostrato [113, 114] che non il TOCP in sé, ma un suo metabolita era attivo come inibitore delle colinesterasi (v. più avanti). I livelli di BuChE sierica negli animali trattati ritornano alla norma in una diecina di giorni [112, 115].

Nell'uomo le determinazioni della BuChE plasmatica e della AChE eritrocitaria sono state eseguite in diversi casi di sicura intossicazione da TCP, registrando valori che talvolta sono stati giudicati inferiori al normale (ad es. del 20-25 %), senza tuttavia una convincente dimostrazione della significatività delle differenze fra le medie [87, 116] (vedasi anche pag. 290 per una discussione su questo punto). Vora e Coll. [88] hanno studiato il comportamento di questi due enzimi su nove pazienti ricoverati durante l'episodio di intossicazione collettiva avvenuto a Bombay nel 1960, la causa del quale era stata rintracciata nella contaminazione con TCP di un olio di senape per alimentazione e per massaggi. La BuChE plasmatica risultò aumentata per la durata di alcune settimane a partire da un mese dopo il ricovero, la AChE eritrocitaria risultò invece diminuita di circa il 50% in occasione delle prime determinazioni dopo il ricovero; dopo circa tre mesi tutti e due questi parametri erano tornati nei limiti della normalità. (*)

Quanto a studi di cancerogenesi, mutagenesi e teratogenesi, non risulta che ne siano stati intrapresi per il TOCP o per gli altri isomeri del tricresilfosfato.

2.4. - *Metabolismo e meccanismo d'azione neurotossica dei triarilfosfati*

L'allargamento di questo capitolo all'intera categoria dei triarilfosfati è giustificato da due motivi: a) altri triarilfosfati oltre ai tricresilfosfati possono far parte delle impurezze presenti nel TCP commerciale (e di alcuni di questi è stata dimostrata la capacità di provocare neuropatia ritardata [77]); b) altri triarilfosfati oltre a quelli presenti nel TCP commerciale possono essere

(*) V. nota a pag. 310. Informazioni riguardanti induzione sperimentale di enzimi microsomiali epatici da parte di TCP sono reperibili alla referenza [228].

impiegati come plastificanti o comunque come componenti di collanti (v. ad esempio il caso citato da Buscaino e Coll. [58]).

Non è nota l'intera sequenza metabolica del TCP e dei triarilfosfati in generale, tuttavia sono noti alcuni passaggi, che toccano da vicino il meccanismo dell'azione tossica di questi composti. Una spinta a indagare su queste trasformazioni metaboliche venne dalla osservazione sopra riferita della discrepanza fra effetto anticolinesterasico *in vivo* e *in vitro* e dalla sua spiegazione in termini di attivazione metabolica. Esperimenti volti a paragonare la capacità dei vari triarilfosfati, da una parte di inibire le colinesterasi e le esterasi totali *in vivo*, e dall'altra di provocare neuropatia ritardata, mostrò che non vi era alcun parallelismo fra i due fenomeni [98, 117]. Tale parallelismo era attivamente ricercato perché esso avrebbe potuto rappresentare una chiave per prevedere la capacità di un triarilfosfato di provocare neuropatia ritardata. Per molto tempo i tentativi in questo senso rimasero infruttuosi, e solo recentemente Johnson, sulla base di precedenti ricerche in collaborazione con Aldridge e altri [118], è riuscito ad identificare alcune di queste regole previsionali [99, 119-121].

Egli è partito dall'ipotesi che, fra le tante esterasi inibite, ve ne sia una in particolare connessa con la neurotossicità (« esterasi neurotossica ») [118]; perché si produca la neurotossicità occorre non solo che questa esterasi sia inibita, ma anche che dopo l'inibizione essa vada incontro a una reazione secondaria. Messo a punto un particolare test biochimico *in vivo* e *in vitro* per la misura dell'attività della « esterasi neurotossica », Johnson ha proceduto a saggiare se vi sia corrispondenza fra i composti che la inibiscono e quelli che provocano la neuropatia ritardata. Avendo saggiato alcune centinaia di composti organofosforici, egli ha potuto concludere che la corrispondenza era perfetta, salvo alcune eccezioni che in seguito si sono rivelate soltanto apparenti [99], ed ha inoltre potuto ricavare una serie di regole che sono qui sotto riportate per quel che riguarda i triarilfosfati. Nessuno di questi composti inibisce la « esterasi neurotossica » *in vitro*: tutti quelli che provocano neurotossicità ritardata la inibiscono solo in seguito ad attivazione metabolica, cioè solo se somministrati *in vivo*. Il processo di attivazione per i composti *orto* è quello che Casida e Coll. [114] già nel 1961 avevano dimostrato per il TOCP. Essi infatti, somministrando TOCP marcato, avevano identificato il principale metabolita neurotossico (nel senso della neuropatia ritardata) che si forma *in vivo* nel ratto: si tratta del 2-metil-saligeninfosfato, che risulta dalla perdita di un radicale fenilico sostituito e la ciclizzazione del rimanente. Di questo composto bastavano 8 mg/kg per provocare nel pollo paralisi della stessa gravità di quelle prodotte da 500 mg/kg di TOCP. Anche per i composti *para* il processo di attivazione è stato chiarito [122]. Il prestarsi o meno delle molecole al processo di attivazione spiega in parte le differenze di tossicità (v. Tab. 5).

Triarilfosfati positivi al test di Johnson per la neurotossicità ritardata [99]

	Sostituenti sugli anelli fenolici			Dose che ha provocato neuropatia ritardata nel pollo (a) mg/Kg
	1°	2°	3°	
1	2 metil	—	—	60
2	2 metil	2 metil	2 metil	100-250
3	2 metil	2 metil	3 metil	100
4	2 metil	2 metil	4 metil	100
5	2 metil	3 metil	3 metil	50
6	2 metil	4 metil	4 metil	50-100
7	2 metil	3 metil	4 metil	50
8	2 metil	3,5 dimetil	3,5 dimetil	1000
9	3 metil	3 metil	3 metil	25 × 250
10	2 etil	2 etil	2 etil	4 × 1200
11	2 etil	2 etil	4 metil	1000
12	2 etil	4 metil	4 metil	50
13	2 etil	3 etil	3 etil	50
14	4 etil	4 etil	4 etil	200-300
15	4 etil	4 etil	4 α idrossietil	50-200 im 50 iv
16	4 etil	4 etil	4 acetil	100
17	4 etil	4 α idrossietil	4 idrossietil	50 im
18	4 etil	4 acetil	4 acetil	25-100 im
19	4 etil	4 etil	2 n-propil	100
20	2 etil	3,5 dimetil	3,5 dimetil	500-1000
21	2 n propil	4 etil	4 etil	100
22	2 isopropil	—	—	1200
23	2,3 dimetil	2,3 dimetil	2,3 dimetil	40 × 1000
24	2,4 dimetil	2,4 dimetil	2,4 dimetil	8 × 2500
25	2,6 dimetil	3,5 dimetil	3,5 dimetil	30 × 900
26	2,4 dimetil	2,4 dimetil	3,5 dimetil	13 × 900
27	2,6 dimetil	2,6 dimetil	3,5 dimetil	50 × 900

(a) orale se non indicato altrimenti (im = intramuscolare; iv = endovena).

Per gli esteri aventi uno o più anelli fenolici con sostituenti in posizione *orto* le regole sono le seguenti: 1) quando il gruppo alchilico in *orto* ha almeno un atomo di idrogeno sul 1° atomo di carbonio, si possono ottenere saligenine; queste sono fortemente neurotossiche, quindi basta che se ne formi una piccola quantità perché l'estere di origine sia da considerarsi neurotossico; 2) ulteriori sostituzioni nell'anello contenente il sostituente *orto* riducono marcatamente la neurotossicità, ma ulteriori sostituzioni negli altri anelli la riducono di poco; 3) la neurotossicità è più alta negli isomeri aventi un solo sostituente *orto* in confronto con i tri-*orto* sostituiti (come il TOCP); 4) la neurotossicità decresce con l'aumento della lunghezza della catena del sostituente e con l'aumento delle sue ramificazioni. Per gli esteri senza *orto*-sostituenti: 1) una catena sostituente in posizione *para* deve avere almeno 2 atomi di idrogeno sul primo atomo di carbonio per poter produrre un metabolita neurotossico; 2) sostituenti in posizione *meta* non danno metaboliti neurotossici. Abbiamo qui riportato le regole elaborate da Johnson (recentemente confermate anche da Johannsen e Coll. [123], perché questo dovrebbe permettere di prevedere le proprietà neurotossiche di triarilfosfati, diversi dal TCP, che dovessero venir proposti come plastificanti; un esempio è stato del resto già segnalato [58]. Per brevità non vengono invece riportati la spiegazione del test biochimico di Johnson, che è stato dall'autore recentemente semplificato [125], la sua teoria dell'invecchiamento della « esterasi neurotossica », la sua ipotesi sulla funzione fisiologica della stessa (per questo vedansi le citate rassegne di questo autore [99, 119-121] e altri recentissimi contributi su questi temi [124, 225-227 (*)]. Pur risultando il fenomeno studiato da Johnson (l'inibizione di una particolare esterasi) un indice assai ben correlato con la capacità degli esteri fosforici di provocare neurotossicità ritardata, non vi sono prove che esso costituisca il meccanismo patogenetico di tale lesione.

2.5. - Controlli sull'ambiente di lavoro e sui lavoratori esposti; normativa

Fra i metodi proposti per evidenziare nei vari materiali i triarilfosfati usati come plastificanti, i più attendibili, più rapidi e meno indaginosi sono oggi quelli gas-cromatografici [126, 127]. È stato anche proposto un metodo fondato su una supposta notevole attività inibitrice del TOCP (estratto da collanti o da pelli) sulla colinesterasi del siero umano *in vitro* [128]. Come già riferito a pag. 286, tale attività è stata dimostrata minima o nulla da vari autori [98, 111] per TOCP con buon grado di purezza. Il lavoro citato non indica il grado di purezza del TOCP impiegato, e comunque rileva effetti inibitori solo alla concentrazione (altissima per un composto organofosforico) dello 0,1 %.

(*) V. nota a pag. 310.

Va assolutamente evitato il contatto cutaneo con materiali che possano cedere TCP, anche eventualmente con l'intermediario di solventi. Ove questi materiali si debbano impiegare, occorre far uso di guanti e osservare una scrupolosa igiene personale; ciò comporta la disponibilità di servizi adeguati.

Il TCP rientra fra le sostanze che sono considerate potenziali cause di malattie professionali (voce 3, « fosforo e composti », della tabella allegata al decreto 482 del 9 giugno 1975). Quanto alle prescritte visite preventive e periodiche, esse dovrebbero mirare soprattutto alla individuazione di sintomi soggettivi anche lievi del tipo di quelli indicati nell'introduzione, che possono essere di gran valore nel porre una diagnosi precoce e prendere quindi provvedimenti ambientali o di protezione individuale.

Altre analisi da prendere in considerazione sono l'esame elettrodiagnostico (v. capitolo sugli alcani) e la misura dell'attività della BuChE plasmatica e della AChE eritrocitaria. Come si è già accennato sopra, i vari triarilfosfati non sono di per sé inibitori delle colinesterasi, ma un composto attivo in questo senso si forma metabolicamente da alcuni di essi ed è stato messo in evidenza *in vivo* [114]. Dei numerosissimi casi di intossicazione umana da TCP, solo alcuni sono stati studiati da questo punto di vista e solo raramente si è potuto mettere in evidenza un consistente abbassamento della attività di questi enzimi (vedasi ad esempio [88]). Probabilmente, quando questi casi vengono alla osservazione clinica, il periodo di inibizione delle colinesterasi è già trascorso. Quanto ai metodi consigliabili per la determinazione della AChE eritrocitaria e della BuChE plasmatica, in alternativa ad altri metodi più indaginosi, vedasi Bellino e Coll. [129]. Occorre considerare che l'ampia variabilità individuale, nella specie umana, dei livelli ematici di questi due enzimi fa sì che solo spostamenti notevoli dalla norma possano essere significativamente messi in rilievo; a questo scopo è anche necessaria una scelta accurata del campione di controllo, nel senso di una sua omogeneità con il campione in esame. Da notare inoltre che anche in episodi di polineuropatia chiaramente imputabili ad esano è stato notato un certo abbassamento dei livelli di BuChE plasmatica o di AChE eritrocitaria [177, 183]. Data questa situazione, non meraviglia che la determinazione di queste attività enzimatiche nei casi di polineuropatia dei calzaturieri (trovate talvolta abbassate [26, 52, 66] talvolta invece nei limiti della normalità [27, 44, 50]) non abbia certo contribuito a chiarirne l'etiologia, ma sia stata piuttosto fonte di confusione. Quanto alla proposta di Caudarella e Coll. [130] di eseguire la biopsia epatica nei casi di polineuropatia da sospetta esposizione al TOCP, essa non appare in alcun modo giustificata dalla documentazione fornita dagli autori: il quadro istologico descritto nelle sei operaie esaminate (*) non presenta caratteristiche di specificità; inoltre,

(*) V. nota alla pag. 281.

non essendo riportati dati ambientali né valori quantitativi sulla composizione dei materiali impiegati, non è chiaro a quale agente eziologico sia da attribuirsi la polineuropatia riscontrata.

Quanto alle normative sulle massime concentrazioni ammissibili nell'aria degli ambienti di lavoro, negli USA viene preso in considerazione il TOCP, con TLV («threshold limit value» o valore limite ponderato) di $0,1 \text{ mg/m}^3$ e possibilità di escursioni per brevi periodi (TLV-STEL) fino a $0,3 \text{ mg/m}^3$; in URSS viene preso in considerazione separatamente il TCP con più o con meno del 3% di gruppi *o*-cresilici: nel primo caso il MAC (massimo da non superare in nessun momento) è di $0,1 \text{ mg/m}^3$, nel secondo è di $0,5 \text{ mg/m}^3$.

Gli autori di questa rassegna ritengono che le normative che prescrivono, nel TCP commerciale impiegato nell'industria, un contenuto in TOCP inferiore al 3% siano superate da quando è stato dimostrato che altri possibili componenti del TCP commerciale sono altrettanto o ancor più tossici del TOCP (v. pag. 283 e Tab. 5). Data la pericolosità di questa miscela di sostanze, dovuta anche alla facile penetrazione per via cutanea dei composti neurotossici in essa contenuti, sembra invece da prendere in considerazione l'opportunità di escludere il TCP dall'uso nell'industria calzaturiera, anche in considerazione della possibilità di sostituirlo con altri plastificanti e lubrificanti.

3. - IDROCARBURI ALIFATICI C5 - C7

3.1. - Terminologia; caratteristiche chimico-fisiche

Verrà qui passata in rassegna la letteratura scientifica riguardante la tossicologia di quegli idrocarburi alifatici dei quali si ha notizia (vedansi ad esempio le referenze [22, 24, 25, 126] come componenti dei solventi dei collanti usati nell'industria calzaturiera italiana, e cioè: *n*-pentano, *n*-esano, *n*-eptano e loro isomeri a catena ramificata o aliciclici (in particolare isopentano, ciclopentano, 2-metilpentano, 3-metilpentano, cicloesano, metilciclopentano). Si tratta di un gruppo di alcani e cicloalcani a 5-7 atomi di carbonio, che distillano nell'intervallo fra 40 e 90 °C. Queste miscele di idrocarburi a basso punto di ebollizione hanno una composizione diversa a seconda del procedimento con cui vengono ottenute dal petrolio («cracking» catalitico, termico, «reforming» catalitico ecc.); i singoli componenti, in forma più o meno purificata a seconda delle esigenze, vengono poi ottenuti mediante distillazione frazionata. Con il termine «esano» ci si riferisce di solito all'esano commerciale, cioè a una miscela di isomeri a 6 atomi di carbonio che bolle fra 60 e 70 °C; analogamente con i termini «pentano» ed «eptano» si intende il complesso degli isomeri (questa terminologia è adot-

tata nella presente rassegna); invece come « esano tecnico » può venire indicata una miscela nella cui composizione entrano anche alcani con 5 e 7 atomi di carbonio.

A temperatura ambiente si tratta di liquidi infiammabili, che a determinate concentrazioni (v. Tab. 6) formano con l'aria miscele esplodenti. I composti puri sono incolori, con leggero odore di petrolio. Sono molto volatili (in misura decrescente da C5 a C7), come risulta dalla Tab. 6, che riporta anche altre caratteristiche fisico-chimiche. Sono tutti solubili nei comuni solventi organici; quanto alla solubilità in acqua, indicata di solito nei manuali come « praticamente » nulla, Lazarew [131] trova per l'esano 0,003 e per il cicloesano 0,015 % in volume a 20-23 °C.

3.2. - *Vie di introduzione e successivo destino nell'organismo; interazione con altre sostanze*



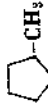
Le vie di introduzione che hanno rilevanza dal punto di vista della esposizione professionale sono la via inalatoria e la via cutanea. Ambedue i meccanismi di assunzione sono strettamente legati alle caratteristiche chimico-fisiche dei composti (volatilità, solubilità) delle quali si è detto sopra. Quanto alla via respiratoria, esperimenti sulla ritenzione polmonare dell'esano sono stati condotti su volontari umani da vari autori (per la definizione di questo parametro v. [132]). Per l'n-esano Nomiyama e Nomiyama [133] indicano all'equilibrio un valore del 5,6%, Brugnone e Coll. [134] del 15%; autori tedeschi [135] indicano invece per l'esano il 34%. Quest'ultimo valore, più alto dei precedenti, si spiega probabilmente, oltre che con la presenza dei vari isomeri, con il tempo molto più breve che intercorre fra l'inizio dell'esposizione e la raccolta dei campioni di aria espirata. Questi ultimi autori forniscono il corrispondente dato anche per il pentano (30%) e per l'eptano (25%).

È noto che per i gas e i vapori la ritenzione per via respiratoria è correlata al coefficiente di ripartizione aria/acqua [132]. La solubilità in acqua estremamente bassa degli alcani C5-C7 spiega come mai essi presentino una ritenzione polmonare assai minore rispetto ad altri solventi organici (ad esempio il benzene, che ha un coefficiente di ripartizione aria/acqua di 0,1 e una ritenzione polmonare del 50-75% [132]).

L'assorbimento cutaneo è invece favorito da un coefficiente di distribuzione fra grassi e acqua non troppo elevato [132], quindi esso non dovrebbe essere molto alto nel caso di questi composti. Nomiyama e Nomiyama [136] hanno fatto immergere a volontari le mani fino al polso in n-esano (al 95%) per un minuto; a intervalli di tempo dopo l'esposizione non hanno tuttavia potuto ritrovare n-esano nell'aria espirata, nel sangue e nelle urine (il limite analitico del loro metodo era di 1 ppm per l'aria e di 3,5 ppm per il sangue).

TABELLA 6

Caratteristiche chimico-fisiche degli idrocarburi alifatici C5-C7 dei quali si ha notizia come componenti dei solventi dei collanti usati nell'industria calzaturiera italiana

	P.M.	Formula di struttura	Densità del liquido fra 4 e 30 °C	Temperatura di fusione	Temperatura di ebollizione	Tensione di vapore (mm Hg) a temperatura in °C	Temperatura di infiammabilità in °C	Limiti di infiammabilità %
n-pentano	72,15	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	0,6262	-129,72	36,07	500 a 25	-49	1,42-7,8
isopentano	72,15	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$	0,6201	-159,89	27,85	595 a 21,1	-57	1,4-7,6
ciclopentano	70,08		0,7450	-93,70	49,30	400 a 31	-37	—
n-esano	86,18	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	0,6603	-95,00	68,95	150 a 25	-26	1,18-7,43
2-metilpentano	86,18	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	0,6532	-153,67	60,27	400 a 41,6	-23	1,2-7,0
3-metilpentano	86,18	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$	0,6645	-118,00	63,28	100 a 10,5	-7	—
cicloesano	84,6		0,7738	6,55	80,74	103,6 a 26,3	-17	1,33-8,35
metilciclopentano	84,16		0,7500	-142,50	71,80	100 a 17,9	-7	—
n-eptano	100,21	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	0,6837	-90,61	98,42	47,7 a 25	-4	1,10-6,7
isoeptano	100,21	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	0,6872	-173,00	92,00	40 a 14,9	-4	1,1-6,0
2,4-dimetilpentano	100,21	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$	0,6727	-119,24	80,50	8,2 a 21	-12	—

Quanto alla distribuzione di questi solventi una volta penetrati nell'organismo, e al loro eventuale accumulo nei diversi tessuti, non si hanno dati per l'uomo, ma sono disponibili dati ottenuti sperimentalmente su animali. Bohlen e Coll. [137] hanno trattato ratti con alte concentrazioni di esano (circa 50.000 ppm) per esposizioni di 2-10 ore. Si è poi determinata la concentrazione di esano in sangue, fegato, cervello, surreni, reni, milza con metodo gas-cromatografico, arrivando alla conclusione che ogni tessuto ha un valore specifico di saturazione, raggiunto dopo 4-5 ore di esposizione, che è direttamente proporzionale alla quantità di lipidi contenuta nel tessuto stesso. Questo valore, espresso in funzione del contenuto in lipidi, è uguale a 4 mg di esano per g di lipidi. Due eccezioni sono rappresentate dal fegato e dal sangue. Infatti la concentrazione di solvente nel fegato continua ad aumentare ancora dopo 10 ore di esposizione, parallelamente ad un aumento del contenuto in lipidi del fegato dovuto ad accumulo di trigliceridi indotto dal solvente stesso. Invece il sangue, pur raggiungendo la saturazione nello stesso tempo degli altri tessuti, tuttavia presenta un valore specifico di saturazione molto maggiore, pari a 25 mg/g lipidi. Ciò sarebbe dovuto alla capacità delle proteine plasmatiche, in particolare le albumine (come dimostrato anche da studi *in vitro* [138]) di legare notevoli quantità di alcani.

Per quanto riguarda il metabolismo, gli idrocarburi alifatici vengono ossidati nel fegato di diverse specie (ratto, topo, coniglio, cavia ed altre) dal sistema monossigenasico microsomiale formato dal citocromo P₄₅₀ e da una riduttasi NADPH dipendente [139-144]. L'attività, che è quasi la stessa per tutti i substrati, porta alla formazione di alcoli isomeri [141, 142]. Esperimenti di induzione e di inibizione [140, 143-145] hanno evidenziato che esistono più tipi di citocromo P₄₅₀ responsabili delle diverse forme di idrossilazione.

Frommer e Coll. [143] hanno dimostrato *in vitro* che, normalmente, i prodotti di idrossilazione dell'n-eptano sono tutti gli alcoli isomeri con prevalenza del 2-eptanolo. Il pretrattamento con fenobarbital fa aumentare quattro volte la formazione di 2-eptanolo, 3-eptanolo e 4-eptanolo, ma influisce poco sulla formazione di 1-eptanolo, mentre il pretrattamento con 3,4-benzopirene provoca la formazione di un diverso spettro di isomeri. Inoltre certi inibitori influiscono in modo differente sulla idrossilazione in posizione ω ed $\omega-1$. Risultati simili sono stati ottenuti da Krämer e Coll. [144] anche per quanto riguarda l'idrossilazione dell'n-esano; si è visto infatti che il pretrattamento con fenobarbital fa aumentare l'idrossilazione in posizione $\omega-1$, mentre il 3,4 benzopirene quella in posizione 3. Un altro esperimento [145] ha infine dimostrato che nell'idrossilazione degli idrocarburi alifatici, e in particolare dell'n-esano, sono implicate tre forme di citocromo P₄₅₀. Una, che viene indotta dal fenobarbital, catalizza l'idros-

silazione in $\omega-1$, un'altra, sensibile al 7,8-benzoflavone, è responsabile dell'idrossilazione in posizione 3, la terza, insensibile all'azione degli stessi inibitori ed induttori, catalizza l' ω -idrossilazione.

In un recente esperimento, condotto da un gruppo di ricercatori dell'Università dell'Ohio [153], il 2-esanolo è stato trovato nelle urine di cavie dopo la somministrazione intraperitoneale di n-esano. Poiché, come già dimostrato dallo stesso gruppo [146], anche il metil-n-butilchetone (MnBK) dà luogo alla formazione di 2-esanolo, oltre che di 2,5-esandione, viene avanzata l'ipotesi che la neurotossicità di questi due solventi sia dovuta al formarsi nell'organismo dello stesso metabolita. Questa ipotesi viene confermata dagli esperimenti seguenti.

L'intera sequenza metabolica dell'MnBK è stata ricostruita nella cavia da Di Vincenzo e Coll. [147]. Dopo trattamento intraperitoneale con questo composto sono stati ritrovati nel siero i seguenti metaboliti: 5-idrossi-2-esanone, 2,5-esandiolo, 2,5-esandione, 2-esanolo, MnBK. I risultati fanno pensare che l'MnBK possa essere metabolizzato attraverso due vie: la prima che comporta la riduzione del gruppo carbonilico con formazione di 2-esanolo, l'altra che consiste nella formazione di 5-idrossi-2-esanone per idrossilazione nella posizione $\omega-1$. Il 5-idrossi-2-esanone a sua volta può essere ulteriormente ossidato a 2,5-esandione o ridotto a 2,5-esandiolo. Nella stessa serie di esperimenti il 5-idrossi-2-esanone e il 2,5-esandione sono stati ritrovati nel siero di cavia anche dopo trattamento intraperitoneale con n-esano.

Poiché è stata provata sperimentalmente la neurotossicità del 2,5-esandione [148], si deve concludere che tutti questi metaboliti sono potenzialmente neurotossici essendo in grado di formare il 2,5-esandione. Con il 2-esanolo infatti è stata riprodotta sperimentalmente la tipica neuropatia [149] già indotta da n-esano [150], MnBK [16, 151] e 2,5-esandione [148].

In un successivo studio di Di Vincenzo e Coll. [152] è stato ulteriormente chiarito il metabolismo dell'MnBK. La somministrazione orale di 200 mg/kg di MnBK marcato a ratti è stata seguita dall'escrezione di radioattività nell'aria espirata (pari al 44% della dose somministrata), nelle urine (pari al 39,9%) e nelle feci (minore dell'1,5%). La radioattività nell'aria espirata è risultata esser dovuta all'escrezione di MnBK e di CO₂. Nelle urine sono stati individuati come responsabili della radioattività i seguenti metaboliti: 2-esanolo (22% della radioattività totale delle urine), 5-idrossi-2-esanone (21%), 2,5-esandione (14%), 2,5-dimetilfurano (6%), γ -valerolattone (5%), aminoacidi (10% di cui il 5% dovuto alla norleucina o acido 2-ammino-esanoico e il rimanente 5% ad un aminoacido non identificato), urea (4%). La formazione di CO₂ può essere spiegata con l' α -ossidazione dell'MnBK (v. Fig. 1) ad acido 2-cheto-esanoico; attraverso la decarbossilazione si otterrebbe poi l'acido pentanoico che potrebbe entrare nel meta-

bolismo intermedio. Dall'acido 2-chetoesanoico si può ipotizzare anche la formazione di aminoacidi (norleucina o acido 2-aminoesanoico) per transaminazione.

Il 2-esanolo, il 5-idrossi-2-esanone, il 2,5-esandione erano già stati ritrovati nelle urine di animali trattati con MnBK, come prodotti di riduzione del gruppo carbonilico e di ω -1 ossidazione [146, 147]. Anche la formazione dei nuovi metaboliti individuati (2,5-dimetilfurano, γ -valerolattone ed urea) si può ricondurre all' ω -1 ossidazione. Infatti dal 5-idrossi-2-esanone, per enolizzazione e successiva ciclizzazione, si potrebbe arrivare a 2,5-dimetil-2,3-diidrofurano e, da questo, per ossidazione, a 2,5-dimetilfurano. Ancora, per α -ossidazione del 5-idrossi-2-esanone, si avrebbe la formazione di acido 2-cheto-5-idrossiesanoico dal quale, per decarbossilazione ed ossidazione, si ottiene l'acido 4-idrossipentanoico e, per successiva lattonizzazione, il γ -valerolattone. L'urea marcata che si ritrova nelle urine, può derivare dalla CO_2 prodotta per decarbossilazione dell'acido 2-cheto-5-idrossiesanoico. L'aumento di CO_2 marcata in seguito a pretrattamento con SKF-525A e la contemporanea diminuzione di radioattività nelle urine, indica che la ω -1 ossidazione è mediata dalle ossidasi microsomiali a funzione mista (sistema suscettibile di inibizione da SKF). Gli autori [152] rilevano che le stesse vie metaboliche possono essere ipotizzate anche per l'*n*-esano.

La prova definitiva della interconvertibilità del metabolismo dell'*n*-esano e dell'MnBK è stata fornita da esperimenti *in vitro* eseguiti dal gruppo dell'Ohio [153] nel 1978. Da un omogenato di fegato di cavia si separa il supernatante ottenuto a $9.000 \times g$ e, per ulteriore centrifugazione di questo a $100.000 \times g$, la frazione microsomiale e il citosol. Queste frazioni vengono incubate, nelle opportune condizioni, con MnBK e si ritrovano i seguenti metaboliti: nel supernatante ottenuto a $9.000 \times g$ il 2-esanolo e il 2,5-esandione, nel citosol il 2-esanolo e nella frazione microsomiale il 2,5-esandione. Incubando invece *n*-esano con le stesse frazioni si ottengono 2-esanolo, MnBK e 2,5-esandione sempre nella frazione microsomiale e in quella a $9.000 \times g$, mentre il citosol risulta inattivo. Si può perciò concludere che l'idrossilazione dell'*n*-esano a 2-esanolo, la sua ossidazione a MnBK e successivamente a 2,5-esandione, come pure l'ossidazione dell'MnBK a 2,5-esandione, avvengono nella frazione microsomiale, mentre la riduzione dell'MnBK a 2-esanolo avviene nel citosol.

Infine, molto recentemente, Perbellini e Coll. [154] hanno identificato il 3-esanolo nelle urine di ratti trattati con *n*-esano. Questo dato conferma precedenti esperimenti *in vitro* da cui risultava che l'*n*-esano può essere idrossilato da parte delle ossidasi microsomiali in tutte le posizioni [145]. Gli studi fin qui presentati, relativi al metabolismo negli animali da esperimento dell'MnBK e dell'*n*-esano, vengono riassunti nello schema in Fig. 1.

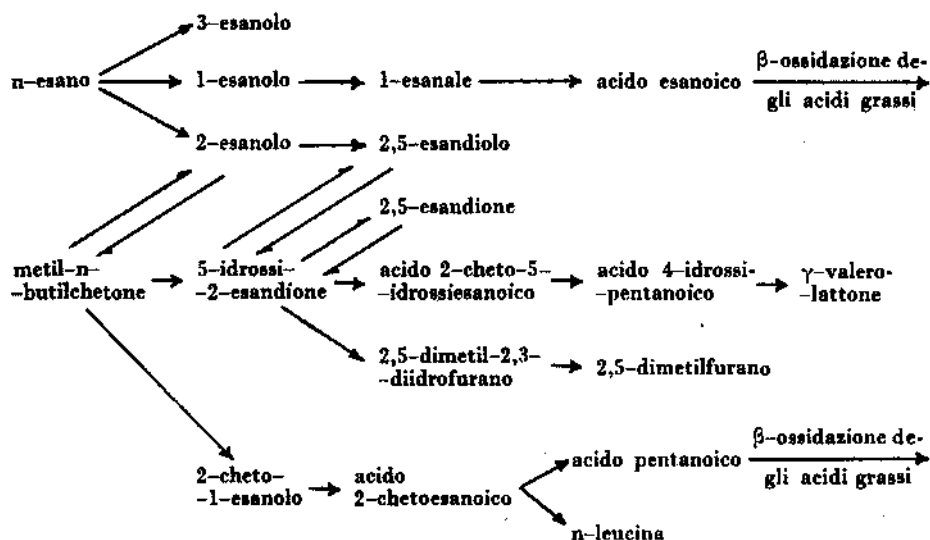


Fig. 1. — Schema riassuntivo del metabolismo dell'n-esano e dell'MnBK.

Poiché, tra i metaboliti dell'n-esano e dell'MnBK, il 2-esanolo ed il 2,5-esandione si sono dimostrati in grado di riprodurre la polineuropatia, si possono fare due considerazioni: 1) la neurotossicità dei due solventi deve essere attribuita alla formazione di questi metaboliti comuni; 2) l' ω -1 ossidazione, che produce il 2-esanolo dall'n-esano e il 5-idrossi-2-esanone dall'MnBK, deve essere considerato meccanismo di attivazione metabolica nel senso della neurotossicità, mentre l' ω -ossidazione dell'n-esano e l' α -ossidazione dell'MnBK potrebbero considerarsi meccanismi di detossificazione in quanto i loro prodotti confluiscono nel metabolismo energetico [152].

Riguardo al metabolismo dell'n-esano e dell'MnBK nell'uomo, sono disponibili alcuni dati. In uno studio su volontari, esposti sperimentalmente per via respiratoria a 100 ppm di MnBK, Di Vincenzo e Coll. [155] hanno ritrovato 2,5-esandione nel siero, mentre la ricerca dei metaboliti urinari dava risultato negativo. D'altra parte nelle urine di operai calzaturieri esposti a collanti contenenti esano, Perbellini e Coll. [158] hanno recentemente rilevato la presenza di una serie di metaboliti di questo composto: il 2-esanolo, il 2,5-esandione e il 2,5-dimetilfurano.

Un'ampia diffusione nei tessuti dei metaboliti dell'n-esano e dell'MnBK può essere ipotizzata, trattandosi di chetoni ed alcoli idrosolubili. Questo è stato confermato nel ratto [152]: in seguito alla somministrazione di MnBK marcato si è riscontrata radioattività nel fegato, nel rene, nel cuore, nel cer-

vello, nel midollo spinale, nel polmone, nel sangue e nella carcassa. L'attività maggiore è stata riscontrata nel fegato e nel sangue.

La persistenza nel siero dei metaboliti dell'MnBK (e quindi anche dell'n-esano) è stata studiata nella cavia da Di Vincenzo e Coll. [147]; i valori riportati per i tempi di *clearance* sono i seguenti: 6 ore per l'MnBK, 6 per il 2-esanolo, 8 per il 5-idrossi-2-esanone, 16 per il 2,5-esandione, 8 per il 2,5-esandiolo. Come si vede, il 2,5-esandione è il metabolita più persistente nel siero. Questi metaboliti si ritrovano nelle urine in parte liberi, in parte come glucuronati o solfati.

Quanto a possibili effetti di alcani C5-C7 sul metabolismo di altre sostanze, è stato dimostrato che l'aggiunta di piccole quantità di n-pentano, n-esano o n-eptano a preparazioni di microsomi di fegato di ratto *in vitro*, provoca una attivazione dei sistemi enzimatici che portano alla coniugazione di xenobiotici con acido glucuronico, parallelamente a una liberazione di fosfolipidi dalle membrane microsomiali; a concentrazioni più basse vi è anche una attivazione dei sistemi ossidativi [161].

Per quanto riguarda la distribuzione dell'organismo, una forte dose unica di n-esano è stata iniettata nel peritoneo di cavie, seguendo poi l'andamento della sua concentrazione nel sangue [153]. Il picco massimo è stato raggiunto al 30° minuto; il tempo di dimezzamento è risultato di 36 minuti.

Le conoscenze sul metabolismo dell'n-esano qui passate in rassegna, gettano luce su un altro aspetto, di grande importanza pratica, che riguarda l'interazione dell'n-esano con altre sostanze capaci di interferire con questi processi metabolici. Ad esempio il pretrattamento di animali con fenobarbital, oltre agli effetti già citati sul metabolismo dell'n-esano *in vitro* [144, 145], provoca *in vivo* una più rapida formazione ed eliminazione dei suoi metaboliti [153]. Di maggior rilievo dal punto di vista della esposizione professionale è l'interazione con altri solventi, in particolare con il metiletilchetone (MEK), che di per sé non è neurotossico [157, 159], ma che è noto potenziare l'effetto dell'MnBK [146, 157]; il meccanismo di questo effetto sinergico è legato alla induzione di enzimi microsomiali epatici da parte del MEK [153, 156]. Anche per l'n-esano è stato dimostrato un sinergismo con il MEK, sia a livello sperimentale [159], che epidemiologico [160], né ciò può sorprendere, poiché, come abbiamo visto, la formazione di MnBK rappresenta un passo nel metabolismo dell'n-esano. Da notare che il MEK è presente nella composizione in solventi di alcuni collanti [69, 70].

Nell'ambiente di lavoro calzaturiero, un potenziamento dell'effetto dell'n-esano dovuto a fenomeni di sinergismo potrebbe aversi, oltre che con il MEK, anche con altre sostanze aventi proprietà di induttori enzimatici a livello dei sistemi microsomiali epatici: altri composti volatili eventualmente presenti nei solventi dei collanti ovvero farmaci.

3.3. - *Tossicità*

Per molti anni gli alcani C 5-7 sono stati considerati composti relativamente poco tossici, pericolosi principalmente come infiammabili ed esplosivi. Patty e Yant [162], con esperimenti su volontari umani eseguiti impiegando prodotti commerciali, avevano infatti mostrato che esposizioni a concentrazioni di pentano nell'aria fino a 5.000 ppm per 10 minuti non provocavano sintomi acuti di intossicazione; lo stesso valeva per l'esano fino a 2.000 ppm, mentre l'esposizione a 5.000 ppm di esano per 10 minuti provocava vertigini. L'eptano provocava leggere vertigini dopo 6 minuti già a 1.000 ppm, mentre a 4 minuti dall'inizio della esposizione a 5.000 ppm si avevano ilarità e vertigini a un grado tale da provocare leggera incoordinazione; a 7 minuti si aveva incoordinazione più marcata. Per le loro proprietà narcotiche tutti e tre gli alcani qui considerati sono stati proposti per l'uso in anestesia [164] ma questa ipotesi è stata ben presto abbandonata per i loro effetti collaterali indesiderati (irritazione respiratoria e inibizione di centri nervosi). Risultati analoghi sono stati ottenuti con esperimenti su animali. Henderson e Smith [163] hanno osservato che per produrre anestesia nel ratto occorreva una concentrazione di esano nell'aria di circa 70.000 ppm, ma a queste concentrazioni alcuni animali andavano incontro ad arresto respiratorio. Diversi ricercatori [131, 164, 165] hanno studiato gli effetti acuti degli alcani C 5-7 su topi, osservando dopo quanti minuti e a quali concentrazioni gli animali giacevano sul fianco, perdevano i riflessi e morivano [164, 131], ovvero registrando i movimenti respiratori durante e dopo un determinato periodo di esposizione [165]. Questi esperimenti si muovono in una gamma di concentrazioni nell'aria che per il pentano va dalle 130.000 ppm (morte in 37 minuti [164]) alle 32.000 ppm (anestesia dopo 5 minuti [165]), per l'esano dalle 64.000 ppm (morte in 5 minuti [165]) alle 32.000-36.000 ppm (anestesia profonda dopo 5 minuti [165]; morte dopo 2 ore [131, 164]) e per l'eptano dalle 64.000 ppm (morte per arresto respiratorio in meno di 4 minuti [165]) alle 18.000 ppm (morte in 2 ore [131]). Sia negli esperimenti su animali che in quelli sull'uomo e a parità di concentrazione, vi è quindi un incremento della gravità dei sintomi andando da C5 a C7. Per l'esano e il cicloesano è stata determinata da Kimura e Coll. [166] la dose letal/50 acuta orale in ratti di diverse età: i ratti di 14 giorni sono risultati più sensibili (rispettivamente 24 e 8 mg/kg) dei giovani adulti (rispettivamente 49 e 39 mg/kg). In esperimenti di tossicità acuta su topi [131] si ha prostrazione con 15.000 ppm di cicloesano e morte con 20.000 ppm. Braier [167] trova granulopenia in conigli nei giorni successivi alla iniezione sottocutanea di cicloesano (1 ml/kg) o di esano (4 ml/kg), e Spagna e Coll. [168] modesta anemia normocromica e leucopenia con neutropenia in cavie trattate per 2 ore al giorno e per 30 giorni per via respiratoria con 42.000 ppm di esano.

Questi ultimi animali non mostravano alterazioni significative delle transaminasi sieriche; a un esame istologico di vari organi e tessuti si rilevava tuttavia uno stato congestizio diffuso con segni di sofferenza parenchimale [169].

Quanto alle conseguenze locali della esposizione cutanea, essa è stata studiata sull'uomo da ricercatori tedeschi nel 1936 [170]: il contatto con gli alcani C 5-7 per la durata di un'ora provocava eritema, iperemia, gonfiore, dolore urente, che si riduceva solo dopo due ore dalla fine dell'esposizione, e pigmentazione. Esposizione per 5 ore provocava formazione di vesciche (*). Anche in questo caso la gravità dei sintomi aumentava progressivamente da C5 a C7. Nei lavori fin qui citati in 3.3., salvo una eccezione [165], gli alcani impiegati erano miscele di isomeri.

Date queste premesse, che indicavano una tossicità degli alcani e cicloalcani C 5-7 solo alle alte concentrazioni, non sorprende l'iniziale incredulità con cui vennero accolte le notizie che documentavano la tossicità a medio termine di concentrazioni assai più basse.

Le prime osservazioni furono pubblicate nel 1964-65 [15, 171, 172] e riguardavano 5 casi di polineuropatia riscontrati fra gli operai di piccoli impianti di grafica su lamine di polietilene. Il solvente usato (esano commerciale, che risultò contenere il 64% di n-esano, il 16% di metilpentani e il 20% di metilciclopentano) vaporizzava largamente nell'aria dell'ambiente di lavoro, realizzando concentrazioni di 1.000-2.500 ppm. In un articolo successivo Yamada [173], oltre a passare in rassegna i casi riscontrati nelle fabbriche grafiche, casi che nel frattempo erano diventati 6, riferisce su un'episodio ancor più significativo per la notevole purezza del solvente usato. In una industria farmaceutica le compresse venivano ripulite da un leggero rivestimento oleoso immergendole in n-esano (al 95%); i cestelli in rete metallica contenenti le compresse venivano immersi nel solvente e quindi essiccati all'aria. La concentrazione di n-esano nell'ambiente era di 1.000 ppm nelle vicinanze della vasca e di 500 ppm al centro della stanza. Undici dei lavoratori addetti si ammalarono. I primi sintomi, notati entro un mese dall'inizio della esposizione, erano stanchezza e anoressia, seguiti, in uno spazio di tempo che andava da 1 a 9 mesi, da parestesie alle estremità degli arti, e da difficoltà (poi impossibilità) alla deambulazione. Una conferma sperimentale alla ipotesi di Yamada che l'n-esano possa essere un agente causale di polineuropatie venne già nel 1967 da ricerche di Miyagachi [174] su topi e di Kurita [175] su ratti. Nel primo caso i topi erano trattati con esano commerciale (contenente il 65-70% di n-esano) per 24 ore al giorno, 6 giorni alla settimana, per un anno, alle concentrazioni di 100,

(*) V. nota alla pag. 281.

250, 500, 1.000 e 2.000 ppm. I topi trattati con 100 ppm non differivano dai controlli per alcun parametro rilevabile, ma dalle 250 ppm in su comparvero in misura crescente segni di degenerazione delle fibre motrici, rilevabili con metodi elettrofisiologici; sopra le 1.000 ppm comparvero anche atrofie muscolari. Kurita [175], come da citazione di Yamamura [177], ha messo in evidenza alterazioni istopatologiche in nervi periferici e muscoli di ratti trattati con n-esano.

Nel 1968 Sobue, Yamamura e Coll. [176] riferirono su una vera e propria epidemia di polineuropatie, dal quadro clinico quasi perfettamente sovrapponibile a quello descritto da Yamada, in operai calzaturieri giapponesi; come Yamamura fa notare nel successivo lavoro *in extenso* [177], si tratta di una polineuropatia dello stesso tipo descritto per il TOCP, la talidomide, il tallio e l'acrilamide, cioè della assonopatia distale definita all'inizio di questa rassegna. Nel 1967 due casi gravissimi, con quadriplegia, erano stati segnalati alla I Clinica Medica della Scuola di Medicina di Nagoya da un medico del distretto periferico di Fukaya, una zona dove è molto diffusa la lavorazione a domicilio di sandali e pantofole in vinilpelle. A seguito di questa segnalazione, a cui se ne aggiunsero ben presto anche altre, e di quanto già noto in Giappone in base alle esperienze sopra citate, fu deciso di procedere a una ricerca epidemiologica in tutto il distretto di Fukaya (3.500 abitanti). Le 1.662 persone coinvolte nella produzione furono sottoposte a un questionario; delle 296 le cui risposte facevano sospettare una polineuropatia, e che vennero quindi sottoposte a visita medica, 93 risultarono affette da questa malattia. Tutte e 93 risultarono avere a che fare con l'incollaggio: questo avveniva per più di 8 ore al giorno in case scarsamente ventilate, dove i vapori dei solventi volatili riempivano le stanze. Il solvente risultò composto per il 70 % da n-esano, con una piccola quantità di toluolo. La concentrazione di n-esano nelle stanze esaminate oscillava fra 500 e 2.500 ppm. Risultarono da escludere possibili cause di neuropatia da fattori non connessi con il lavoro, mentre era evidente la somiglianza con i casi descritti da Yamada e Coll. [173] e riferiti all'esano. L'età dei pazienti oscillava fra i 10 e i 75 anni con una forte prevalenza femminile; la causa di questa disparità venne riconosciuta in una differenza di mansioni, per cui le donne erano più frequentemente addette all'incollaggio. I sintomi dei periodi prodromico, iniziale, conclamato e della loro successiva evoluzione, non si discostano da quelli già descritti nella presente rassegna a proposito dei calzaturieri italiani, se non per l'aggiunta, in alcuni casi, di sintomi riferibili a un coinvolgimento di nervi cranici. I risultati di uno studio elettromiografico dei 93 pazienti sono riferiti con maggior dettaglio da Iida e Coll. [178], mentre Inoue e Coll. [179], sulla base di una estensione delle indagini ambientali, suggeriscono che polineuropatie di grado medio e lieve potrebbero essersi sviluppate anche con concentrazioni di n-esano inferiori a 500 ppm.

Più recentemente in Giappone è stato studiato un episodio di polineuropatia fra i lavoratori di una piccola azienda familiare, addetti alla pulitura di stoffe con « benzina di petrolio ». Il solvente conteneva fra l'altro anche n-esano (il 12,5%) che raggiungeva presso i posti di lavoro concentrazioni di 240 ppm. [180].

Come si è detto, l'informazione sulla imponente documentazione giapponese qui passata brevemente in rassegna ebbe una certa diffusione in campo internazionale solo a distanza di alcuni anni. Ne erano tuttavia a conoscenza Herskowitz, Ishii e Schaumburg [181] nel 1971, quando riferirono a n-esano la polineuropatia da loro osservata in tre operai di una fabbrica di mobili del Bronx (New York). Essi lavoravano in una piccola stanza poco ventilata, in presenza di un grosso bidone contenente esano; il lavoro consisteva nell'immergere stracci nel solvente e con essi ripulire dalle sbavature di colla armadietti finiti. La concentrazione di n-esano nell'aria risultò essere in media di 650 ppm, con punte di 1.300 ppm. Il quadro clinico corrispondeva a quelli riferiti dagli autori giapponesi all'n-esano, e a quelli noti da TOCP e da acrilamide; lo studio al microscopio ottico ed elettronico sui nervi periferici prelevati per biopsia mostrò un quadro molto simile a quello che già a quel tempo era stato messo in evidenza sperimentalmente da Prineas [109, 182] per queste ultime due sostanze. A seguito del lavoro di Herskowitz e Coll. [181] negli Stati Uniti si poterono chiarire anche altri episodi, rimasti fino allora incomprensibili ai medici del lavoro, come quello [183] di una piccola fabbrica dell'Ohio, dove rotoli di carta, prima di venir sottoposti a un procedimento grafico, venivano trattati, sul retro, con un adesivo. La carta veniva spruzzata con l'adesivo sciolto in un solvente, che poi doveva essere fatto rapidamente evaporare. Fin dal 1958 alcuni operai mostrarono periodicamente i sintomi di una polineuropatia, che poi regrediva. Questi sintomi, uniti a un leggero abbassamento dei valori della colinesterasi sierica (*), avevano fatto pensare a una intossicazione da TOCP, ma composti di questa categoria non erano stati trovati fra i materiali usati. Finalmente fu preso in considerazione l'n-esano, che rappresentava il 76% del solvente dell'adesivo, e una analisi ambientale mise in evidenza concentrazioni di questa sostanza superiori al TLV-USA dell'epoca (500 ppm).

In Francia (e, di rimbalzo, in Italia) il 1972 sembra essere l'anno in cui le ricerche giapponesi e americane vengono recepite [184]; nel 1973 fu segnalato il caso di cinque giovani operaie di un laboratorio di cinture della regione parigina [185], colpite dalla tipica forma di polineuropatia riferibile al TOCP, ma TOCP non venne trovato nei materiali impiegati, compresa la colla, il cui solvente, chiamato « benzina C », risultò contenere l'80 %

(*) Osservazione analoga era stata fatta da Yamamura [177].

di pentano, il 14 % di eptano e il 15 % di esano. Si ha notizia da Assouly e Cavigneaux [186] di episodi simili fra calzaturieri della regione di Bordeaux (v. anche [187]) e di Lione. In questa occasione fu ricordato che già dal 1960 erano stati segnalati in Francia episodi di persone colpite da polineuropatie in seguito all'uso di stufe catalitiche a idrocarburi, nelle quali una cattiva combustione lasciava nell'aria residui incombusti (ad esempio 400 ppm calcolati come esano [188]). Tuttavia i citati lavori francesi non contengono indicazioni riguardo alle concentrazioni dei vari solventi presenti nell'ambiente di lavoro degli operai colpiti.

Delle parecchie centinaia di casi di polineuropatia descritti tra i calzaturieri italiani fin dal 1957 si è già detto (v. Tab. 1) così come della loro iniziale attribuzione al TOCP. Quest'ultimo venne anche in diversi casi effettivamente trovato presente nei collanti e/o nelle finte pelli (v. Tab. 4); in moltissimi altri casi invece non vennero trovati né TOCP né altri triarilfosfati. I primi lavori italiani nei quali si comincia a prendere in considerazione l'esano (o gli alcani C 5-7) sono del 1972 (v. ad esempio [53]). Tuttavia già precedentemente l'esano era stato citato fra le sostanze presenti nell'ambiente di lavoro di operai colpiti da polineuropatie. È interessante a questo proposito un lavoro di Capellini e Coll. del 1968 [43], nel quale sono citati vari materiali con cui erano venuti in contatto operai colpiti da polineuropatia, giunti all'osservazione della Clinica del Lavoro di Milano. Essi provenivano non solo da fabbriche di scarpe e pantofole e di pelletterie, ma anche da imprese artigianali di altro tipo (nell'aria delle quali furono costantemente trovati idrocarburi alifatici): confezioni di impermeabili, fabbricazione di rivestimenti adesivi, rigenerazione di pneumatici per auto. Presso questa ultima impresa, che impiegava 15 operai, lavorava un uomo che andò incontro a una forma di polineuropatia gravissima, con esito mortale: egli era addetto alla preparazione di un mastice a base di gomma sciolta in esano (che veniva poi ridotto in fogli per la preparazione di un sottostrato) ed alla applicazione del sottostrato medesimo. La seconda fabbrica, produttrice di « tela » (stoffa, vipla o polietilene) adesiva, appare simile a quella descritta dagli autori americani sopra citati [183]. Non è nota la composizione del solvente dell'adesivo, che veniva spalmato in modo semiautomatico e doveva poi rapidamente evaporare, ma solo che gli operai adoperavano stracci imbevuti di esano per pulirsi le mani. Una analisi gas-cromatografica dei solventi dei collanti impiegati nell'industria calzaturiera nella zona di Vigevano, in un periodo durante il quale le polineuropatie venivano attribuite al TOCP [21, 26, 34, 37, 44, 45], accertò che il 100 % dei campioni analizzati conteneva esano [189].

Purtroppo, degli innumerevoli articoli che sono stati pubblicati sulla imponente casistica italiana, quasi nessuno riporta la concentrazione dei solventi nell'aria degli ambienti dove lavoravano gli operai colpiti dalla

malattia, ovvero tali analisi erano compiute solo a distanza di molto tempo dalla comparsa dei sintomi. Carapella [65] in una indagine su 19 calzaturifici delle Marche (1264 dipendenti) da cui provenivano 32 casi di polineuropatia, trovò in corrispondenza dei posti di lavoro concentrazioni di n-esano che superavano largamente le 500 ppm (tuttavia non vengono forniti ulteriori particolari). De Rosa e Coll. [190] eseguirono una indagine su 20 fabbriche del Veneto nelle quali due anni prima si erano verificate polineuropatie e trovarono valori di esano (il complesso degli isomeri) che in 25 posti di lavoro su 71 superavano le 100 ppm, in 10 le 280 ppm (tuttavia, visto che non si erano verificati nuovi casi, è da presumersi che nel frattempo fossero stati apportati dei miglioramenti ambientali). Carnevale e D'Andrea [25] in calzaturifici del veronese dagli ambienti ampi e forniti di sistemi di aerazione, trovarono, dopo 4 ore dall'inizio del lavoro, 80 ppm di esano nell'aria del reparto masticiatura tomaie e 17-18 ppm di esano nell'aria alveolare (campioni di aria espirata); non viene citata la presenza di polineuropatie.

Numerose invece le analisi della composizione in solventi dei collanti usati (v. pag. 291); alcani C5-C7 e in particolare l'n-esano vi figurano regolarmente in alte percentuali.

Oltre che dall'ambiente di lavoro, esempi importanti e ben studiati di intossicazione umana da alcani C5-C7 e in particolare da esano [160, 191-197] provengono dal campo delle tossicomanie: una ampia letteratura su questo argomento è comparsa dal 1972 in poi (casi precedentemente descritti di polineuropatia in seguito a tossicomania da « benzina » [198] erano probabilmente dovuti alle stesse sostanze). Si tratta di polineuropatie con le stesse caratteristiche cliniche, elettromiografiche e morfologiche, riscontrabili queste ultime ad un esame al microscopio ottico ed elettronico di nervi superficiali prelevati per biopsia, descritte per gli esposti all'esano e molto simili a quelle descritte per gli esposti al TCP e all'acrilamide; a questo elenco di tossici industriali si è nel frattempo venuto ad aggiungere anche l'MnBK [16], né questo può sorprendere data la capacità di provocare assenopia distale del 2,5-esandione, che come abbiamo visto è un metabolita comune dell'n-esano e dell'MnBK.

Si è già accennato sopra agli esperimenti su animali trattati cronicamente con esano, pubblicati già nel 1967 da ricercatori giapponesi in rapporto con i primi studi clinici ed epidemiologici su intossicazioni industriali. Successivamente autori francesi [199] hanno trattato ratti con esano ed eptano commerciali (miscele di isomeri nelle quali l'n-alcano rappresentava circa il 50 %) a concentrazioni intorno alle 2.000 e rispettivamente 1.500 ppm per 5 ore al giorno, 5 giorni alla settimana. Secondo gli autori, misure elettrofisiologiche su nervi isolati, eseguite da 1 a 6 mesi dopo l'inizio del trattamento, indicherebbero alterazioni nella velocità di conduzione e nella durata del periodo refrattario; vi è tuttavia una grande dispersione dei valori ottenuti

per questi parametri e la significatività delle differenze fra le medie non è valutata statisticamente. Da brevi accenni nella discussione del lavoro, sembra che vi sia qualche alterazione istologica. Nel loro complesso questi dati non sembrano sufficientemente dimostrativi.

Per quel che riguarda l'n-esano, la dimostrazione definitiva della sua capacità di determinare assonopatia distale in animali da esperimento è contenuta in un lavoro di Schaumburg e Spencer [150], nel quale ratti furono esposti continuamente per via respiratoria a concentrazioni fra 400 e 600 ppm di n-esano (puro al 99,98 %) per periodi fino a 35 settimane. Dopo 7-10 settimane l'andatura di questi animali cominciò a farsi incerta, oscillante, e più tardi essi presentarono una progressiva, simmetrica debolezza degli arti posteriori con caduta del piede, accompagnata in alcuni casi anche da debolezza degli arti anteriori. Le prime alterazioni istologiche si cominciarono a riscontrare in concomitanza con il primo accenno a sintomi. Esse erano a carico del sistema nervoso centrale (determinate aree del cervelletto, del bulbo e del midollo spinale) e periferico (ad esempio il nervo tibiale e suoi rami) e consistevano in dilatazioni assonali localizzate, a distribuzione sparsa, con assottigliamento della mielina; al microscopio elettronico queste dilatazioni risultavano contenere una enorme quantità di neurofilamenti del diametro di 10 nm e anche altri organelli alterati (*). Ratti trattati per via sottocutanea non andarono incontro a sintomi, ma presentarono lo stesso quadro istopatologico. Gli autori rilevano come queste alterazioni siano del tutto sovrapponibili a quelle che si osservano in ratti trattati con MnBK [151] e con 2,5-esandione [148], in tossicomani da esano e in una rara neuropatia congenita (la « degenerazione gigante-assonale » di cui si è parlato nell'introduzione).

In lavori successivi Spencer e Schaumburg [200, 201] hanno compiuto uno studio morfologico dettagliato del processo di degenerazione assonale retrograda (« dying back ») che si verifica in animali trattati indifferentemente con n-esano, MnBK o 2,5-esandione. Nel sistema nervoso periferico sono colpiti inizialmente assoni particolarmente lunghi, in regioni distali rispetto al corpo cellulare, ma non terminali; più tardi le alterazioni si trovano via via in regioni più prossimali. Il fenomeno della degenerazione retrograda non va quindi inteso come riferito ad una singola fibra ma ad un intero fascio. Anche a parità di lunghezza alcuni nervi (o fasci all'interno di nervi) sono più vulnerabili di altri: si tratta di assoni caratterizzati da un diametro particolarmente ampio. I primi segni di alterazione si situano in corrispondenza dei nodi di Ranvier: a monte del nodo compaiono rigonfiamenti assonali giganti, mentre a valle la fibra appare raggrinzita, dando l'impressione di

(*) V. nota a pag. 310. Informazioni aggiuntive su alterazioni ultrastrutturali nel SNP di animali trattati con 2,5-esandione sono reperibili alla referenza [230].

uno strozzamento in corrispondenza del nodo stesso; là dove l'assone è rigonfiato la mielina è assottigliata e, in corrispondenza dei nodi di Ranvier, non arriva più a ricoprire l'assone. A valle del rigonfiamento la fibra perde la mielina ed eventualmente, a tratti, si rimielinizza ad opera di una proliferazione delle cellule di Schwann; in questo caso non degenera. Altrimenti tutta la fibra a valle degenera, come se dal punto dove finisce il rigonfiamento fosse stata tagliata; dallo stesso punto parte la rigenerazione, anche mentre l'intossicazione è ancora in corso. Già durante il processo di aggravamento della malattia avvengono quindi continui fenomeni di rimielinizzazione e di rigenerazione nel sistema nervoso periferico. Contemporaneamente compaiono rigonfiamenti assonali anche nel sistema nervoso centrale; anche qui, fra le diverse fibre lunghe, ve ne sono alcune particolarmente vulnerabili e sono i fasci spinali ventro-laterale e dorso-laterale, il nucleo gracile e la materia bianca del verme cerebellare; in queste sedi la degenerazione giganto-assonale compare già prima dei sintomi clinici. Gli autori [201] si domandano come mai nelle fasi iniziali della polineuropatia umana da esano e da MnBK non siano evidenti sintomi centrali: probabilmente essi sono mascherati dai sintomi periferici, più imponenti. Tuttavia la rigenerazione delle fibre è molto più efficace nel sistema nervoso periferico che nel centrale; è probabilmente per questo che i sintomi centrali, come atassia, spasticità e riduzione sensoriale permanente, compaiono quando i sintomi periferici sono in gran parte regrediti in seguito alla rigenerazione delle fibre.

Una volta messo a punto il modello sperimentale comune alla intossicazione da n-esano e a quella da MnBK, rappresentato dal trattamento di animali da esperimento (ratti, gatti) con 2,5-esandione, Schaumburg e Spencer in successivi lavori hanno approfondito su questo modello lo studio istopatologico al microscopio ottico ed elettronico, dimostrando ad esempio che in gatti trattati a lungo con 2,5-esandione (0,5 % nell'acqua da bere) la degenerazione giganto-assonale arriva a colpire anche vie e nuclei visivi e i corpi mammillari dell'ipotalamo [202]. Questi reperti vengono messi in relazione con le alterazioni visive [177] e della memoria [197] segnalate in casi gravi di intossicazione umana da esano. Per tutte queste caratteristiche, che risultano simili a quelle di polineuropatie dovute ad altre sostanze, citate nella introduzione a questa rassegna, gli autori propongono di chiamare questa forma morbosa « assonopatia distale centrale-periferica » o più semplicemente « assonopatia distale » [5].

Altri esperimenti degli stessi autori sono rivolti allo studio del meccanismo patogenetico della assonopatia distale da n-esano e derivati: viene studiato l'effetto di metaboliti su colture di tessuto nervoso *in vitro* [203, 204] e sul trasporto assonale [205]. Tali meccanismi vengono ampiamente discussi in una recente rassegna [206] e viene avanzata una ipotesi biochimica fondata sull'interferenza di MnBK e 2,5-esandione con alcuni passi

della glicolisi. Questa ipotesi, che restringerebbe il campo degli alcani impuntati come agenti eziologici di polineuropatia al solo n-esano (a parte ovviamente i fenomeni di sinergismo di cui a pag. 298) comincia a trovare un supporto sperimentale [207].

Anche altri autori hanno studiato gli effetti a medio e a lungo termine dell'n-esano sul sistema nervoso di animali da esperimento. Foà e Coll. [208] hanno trattato piccioni per la durata di 4 mesi con n-esano (puro al 95 %) per via inalatoria alla concentrazione di 3.000 ppm (5 ore al giorno, 5 giorni alla settimana), ovvero anche per applicazione cutanea; gli animali non hanno mostrato sintomi, né alterazioni rilevabili con metodi elettrofisiologici o con esami istologici su nervi. Poiché, come abbiamo visto, l'n-esano non è di per sé capace di provocare assonopatia distale, ma lo è un suo metabolita, i risultati di Foà e Coll. si possono spiegare ipotizzando una prevalenza nel piccione di vie metaboliche diverse da quelle che portano alla formazione del composto attivo (v. Fig. 1). In un'altra pubblicazione gli stessi autori [209] accennano anche a un mancato effetto dello stesso trattamento su ratti. L'apparente contraddizione con i risultati di Schaumburg e Spencer è probabilmente da ricercarsi nei tempi del trattamento: nonostante che la concentrazione di n-esano usata da questi ultimi autori sia più bassa, la continuità del trattamento probabilmente fa sì che questo composto e i suoi metaboliti raggiungano livelli ematici e tissutali più alti che con trattamento intermittente (vedasi anche il già citato lavoro di Bohlen e Coll. [137] sulla linearità dell'accumulo dell'n-esano nel fegato di ratti per almeno 10 ore).

Una situazione intermedia è probabilmente quella di cui hanno esperienza diretta due degli autori di questa rassegna [210]: ratti trattati per via respiratoria con n-esano (puro al 99 %) alla concentrazione di circa 2.000 ppm (10 ore al giorno, 6 giorni alla settimana), non presentavano dopo 40 settimane segni clinici evidenti, tuttavia, a un esame istologico dei rami del nervo tibiale, mostravano i segni tipici della degenerazione giganto-assonale, sia al microscopio ottico nei preparati ottenuti per dilacerazione ovvero per sezione, sia al microscopio elettronico (le tecniche usate erano quelle descritte da Schaumburg e Spencer [200]). In un lavoro successivo [211] risultati analoghi al microscopio ottico venivano ottenuti trattando ratti con n-esano per un periodo più breve (14 settimane) a concentrazioni più alte (circa 5.000 ppm), non invece in seguito a trattamento per 14 settimane a 1.500 ppm ovvero per 30 settimane a 500 ppm. Variabilità fra specie nella relativa prevalenza di determinate vie metaboliche sono probabilmente alla base delle differenze nella sensibilità all'n-esano: già dalle prime esperienze dei ricercatori giapponesi risultava una scarsa sensibilità del ratto [175] rispetto al topo [174], e probabilmente rispetto all'uomo [179].

In ratti trattati per 1-2 mesi 24 ore su 24 con miscele di pentano ed esano in parti uguali a bassissime concentrazioni (da 3 a 26 ppm), autori

sovietici [212] avrebbero messo in evidenza una alterazione della eccitabilità muscolare e segni morfologici a carico della corteccia cerebrale.

Quanto agli altri alcani e cicloalcani, da esperimenti di Spencer e Coll. [213], risultano del tutto inattivi i metaboliti dell'eptano: ciò starebbe per una inattività di questo composto nel provocare assonopatia distale. Nel lavoro citato, condotto presso questo Istituto [211], risultati negativi per quel che riguarda la comparsa di segni istopatologici di polineuropatia erano ottenuti trattando ratti (sempre per via respiratoria) per 30 settimane con n-pentano 99 % (3000 ppm), n-eptano 99 % (1500 ppm), cicloesano 99,5 % (1.500 ppm), ovvero per 14 settimane con 2-metilpentano 98 % (1.500) o 3-metilpentano 99 % (1500 ppm). Osservazioni preliminari di Franchini e Coll. [214,215], su alterazioni istopatologiche di nervi in polli trattati per via sottocutanea con cicloesano e con cicloesanone non appaiono per ora sufficientemente dimostrative.

3.4. - *Controlli sull'ambiente di lavoro e sui lavoratori esposti; normativa*

Oggi esistono due gruppi di metodi per la determinazione degli alcani C5-C7 nell'ambiente: a prelievo continuo con analisi contemporanea, e a prelievo discontinuo e successiva analisi di laboratorio.

Per il prelievo continuo sono disponibili apparecchi tipo « total hydro-carbon analyzer », che danno una indicazione della somma degli idrocarburi presenti; questo metodo è utilizzato soprattutto dove sia necessario tenere sotto controllo sorgenti di inquinamento localizzate e costanti sotto il profilo qualitativo.

Un caso particolare è rappresentato dal metodo proposto da Gazzaniga e Coll. [216] con convogliamento diretto ogni 15 minuti, mediante tubi in acciaio, dell'aria prelevata ai posti di lavoro e analisi con gascromatografo a ionizzazione di fiamma.

Il secondo gruppo di metodi dà invece una valutazione del campione istantaneo o riferito a un periodo definito. Esso può essere prelevato in vario modo: palloni gonfiati, contenitori rigidi sotto vuoto, sistemi di arricchimento su liquidi o su solidi attivati [217]. Al giorno d'oggi vengono usati quasi esclusivamente questi ultimi, in quanto palloni gonfiati e recipienti prevuotati danno luogo a fenomeni di adsorbimento sulle pareti con conseguente poca affidabilità delle analisi [126].

Interessanti metodi di prelievo discontinuo sono stati messi a punto da Cocheo e Coll. [126] e da Berlincioni e Coll. [127]. Il prelievo viene fatto con fiale di carbone attivo e la misura delle concentrazioni dei solventi eluiti è eseguita al gascromatografo. Analoghe metodiche sono descritte anche in altre recenti pubblicazioni [218, 219].

Per quanto riguarda l'analisi dei componenti dei solventi usati nell'industria calzaturiera, anche qui si procede per analisi gascromatografica [220].

Gli alcani e i cicloalcani C5-C7 rientrano fra le sostanze considerate dalla legislazione di vari paesi, compresa l'Italia, come potenziali cause di malattie professionali (voce n. 29 della tabella allegata al decreto n. 482 del 9 giugno 1975). Sono quindi prescritte per i lavoratori esposti visite preventive e periodiche.

Quanto al controllo sull'uomo va tenuto conto che, per quanto oggi è noto, non esistono esami di laboratorio di tipo biochimico o morfologico capaci di svelare la malattia in fase preclinica. L'esame elettrodiagnostico invece dà questa possibilità, tuttavia non è adatto per « screening » di massa. D'altra parte la malattia si manifesta nei casi lievi o iniziali con una sintomatologia soggettiva caratteristica (v. pagg. 275 e 277).

Ci sembra perciò che vadano valutati positivamente gli interventi sanitari [63, 67, 68, 70, 177] articolati nelle tre fasi seguenti: I) indagine a mezzo di questionario individuale e/o di gruppo (quest'ultimo deve essere estremamente dettagliato per mettere in evidenza fini sintomi soggettivi e compilato con l'ausilio di personale appositamente istruito; II) visita medica con esame neurologico accurato per le persone che, in base al questionario, accusano qualche sintomo di polineuropatia; III) indagine elettromiografica per le persone che, in base alle due fasi precedenti, presentano segni di polineuropatia.

I numerosi esami di laboratorio proposti sul sangue, sulle urine e sul liquido cefalorachidiano, contribuiscono poco alla diagnosi anche quando la malattia è in fase conclamata [53, 63].

L'unica indagine strumentale in grado di dare un indice del danno neurale è l'esame elettrodiagnostico. Esso comprende: a) lo studio dell'attività elettrica a riposo e nella contrazione volontaria (questo può mettere in evidenza vari tipi di alterazione della conduzione, come fascicolazioni, fibrillazioni, potenziali di denervazione, riduzione del tracciato di contrazione massima); b) la misura della velocità di conduzione motoria e sensitiva. Essa può essere alterata per fenomeni di demielizzazione e/o per riduzione del numero delle fibre. La metodologia per l'esame elettrodiagnostico è stata ormai standardizzata (vedasi ad esempio [221]).

Per quel che riguarda la normativa sulle concentrazioni massime di alcani C5-C7 considerate ammissibili nell'ambiente di lavoro, vedasi la Tab. 7, da cui risulta chiaro come il TLV-USA per l'n-esano sia stato abbassato di 5 volte in seguito all'acquisizione delle conoscenze qui passate in rassegna sulla capacità di questo composto di provocare polineuropatia. Sulla base di questa imponente documentazione auspichiamo che anche nella tabella dei Valori Limite Ponderati (VLP) italiani venga adottato per il n-esano il valore di 100 ppm in vigore negli USA, Giappone e Repubblica

Federale Tedesca. Nel calcolare i VLP per le miscele occorre inoltre tener conto del sinergismo con altri solventi, in particolare con il MEK e con quanti, come esposto a pag. 298, provocando induzione enzimatica, incrementano la produzione del metabolita neurotossico.

TABELLA 7

Normativa sulle massime concentrazioni di vari alcani ammissibili in vari paesi, nell'aria degli ambienti di lavoro

ALCANI	TLV USA			
	72 73		76 78	
	ppm	mg/m ³	ppm	mg/m ³
n-Esano	500	1.800	100	360 (a)
Cicloesano	300	1.050	300	1.050 (b)
Pentano	500	1.500	600	1.800
n-Eptano	500	2.000	400	1.600

(a) Lo stesso limite vige anche nella Repubblica Federale Tedesca e in Giappone.

(b) In URSS per il cicloesano vige il MAC di 80 mg/m³.

Ricevato il 21 dicembre 1978.

Accettato il 17 maggio 1979.

Nota aggiunta in bozza. In coda alla bibliografia vengono riportati i riferimenti relativi ad alcuni recenti lavori sugli argomenti trattati nella presente rassegna, di cui gli autori sono venuti a conoscenza dopo la presentazione del manoscritto. Essi si riferiscono sia agli esteri fosforici [222-228], sia agli alcani C5-C7 [229, 230]. Un ulteriore aggiornamento riguarda le più recenti proposte di cambiamento dei TLV USA da parte dell'Associazione degli Igienisti Industriali Americani. Esse comportano un abbassamento del TLV per il n-esano a 25 ppm (90 mg/m³) e l'adozione di un TLV anche per il 2-metilpentano e il 3-metilpentano (500 ppm corrispondenti a 1800 mg/m³). I TLV degli altri alcani C5-C7 rimangono invariati [231].

BIBLIOGRAFIA

- BRADLEY, W. G. 1974. *Disorders of Peripheral Nerves*. Blackwell, Oxford.
- DYCK, P. J., THOMAS, P. K. & LAMBERT, E. H. 1975. *Peripheral Neuropathy*. W. B. Saunders Co. Philadelphia.
- CAVANAGH, J. B. 1969. Toxic substances and the nervous system. *Br. Med. Bull.* 25: 268-273.
- CAVANAGH, J. B. 1973. Peripheral neuropathy caused by chemical agents. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 2: 365-417.
- SPENCER, P. S. & SCHAUMBURG, H. H. 1977. Central-peripheral distal axonopathy - the pathology of dying-back polyneuropathies. *Prog. Neuropathol.* 3: 253-295.

6. SMITH, M. I. & LILLIE, R. D. 1931. The histopathology of triorthocresylphosphate poisoning. *Arch. Neurol. Psychiatry*, **26**: 976-992.
7. ASBURY, A. K., GALE, M. K., COX, S. C., BARINGER, J. R. & BERG, B. O. 1972. Giant axonal neuropathy: a unique case with segmental neurofilamentous masses. *Acta Neuropathol.* **20**: 237-247.
8. SMITH, M. I. & ELVOVE, E. 1930. Pharmaceutical and chemical studies of the causes of the so-called ginger Jake paralysis. *Public Health Rep.* **45**: 1073-1716.
9. SMITH, M. I., ELVOVE, E. & FRAZIER, W. H. 1930. The pharmacological action of certain phenol esters, with special reference to the ethiology of so-called ginger paralysis. *Publ. Health Rep.* **45**: 2509-2524.
10. HASSIN, G. B. 1930. Symptomatology of arsenical polyneuritis. *J. Nerv. Ment. Dis.* **72**: 628-636.
11. ALLSOPP, J. I. 1953. Thallium poisoning. *Australas. Ann. Med.* **2**: 144-163.
12. ALPERS, B. J. & LEWEY, F. H. 1940. Changes in the nervous system following carbon disulfide poisoning in animals and in men. *Arch. Neurol. Psychiatry*, **44**: 725-741.
13. KUPERMAN, A. S. 1958. Effects of acrylamide on the central nervous system of the cat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **123**: 180-192.
14. HOWELL, J. & EDINGTON, N. 1968. The neurotoxicity of sodium diethyldithiocarbamate in the hen. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **27**: 464-472.
15. YAMADA, A. 1964. An occurrence of polyneuritis by n-hexane in the polyethylene laminating plants. *Jap. J. Ind. Health* **6**: 192.
16. MENDELL, J. R., SAIDA, K., GANANSIA, M. F., JACKSON, D. B., WEISS, H., GARDIER, R. W., CHRISMAN, C., ALLEN, N., COURI, D., O'NEILL, J., MARKS, B. & HETLAND, L. B. 1974. Toxic polyneuropathy produced by methyl n-butyl ketone. *Science*, **185**: 787-789.
17. MURALI & KUROIWA, Y. 1971. Peripheral neuropathy in chlorobiphenyl poisoning. *Neurology*, **21**: 1173-1176.
18. KONO, R. 1975. Introductory review of subacute myelo-optico-neuropathy (SMON) and its studies done by the SMON research Commission. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* **28** 1-21 (Suppl.).
19. CHAUDERON, J. & LEVEQUE, J. 1969. 13 Cas d'intoxication professionnelle par le TOCP en milieu artisanal. *Arch. Mal. Prof. Med. Trav. Secur.* **30**: 716-719.
20. BERMEJILLO, M. 1971. Intoxicacion laboral por el tri ortocresilfosfato. *Med. Segur. Trab.* **74**: 49-58.
21. ISOTTI, M. & SARAVAL, A. 1957. Su di una epidemia di polinevrite motoria da intossicazione. *Boll. Soc. Med. Chir. (Pavia)* **1**: 131-133.
22. MAZZELLA DI BOSCO, M. & FONZI, S. 1974. La polineuropatia cosiddetta da collanti o dei calzaturieri. *Riv. Infort. Mal. Prof.* **4**: 665-692.
23. ABBRITTI, G., SIRACUSA, A., CIANCHETTI, C., COLI, C. A., CURRADI, F., PERTICONI, C. F. & DE ROSA, F. 1976. Shoe makers' polyneuropathy: the aetiological problem. *Br. J. Ind. Med.* **33**: 92-99.
24. ABBRITTI, G., COLANGELI, C. & MADEO, E. 1977. La polineuropatia « dei calzaturieri »: etiologia e epidemiologia. *Securitas*, **1**: 24-35.
25. CARNEVALE, F. & D'ANDREA, F. 1977. Eziopatogenesi delle polineuropatie da collanti. *Difesa Sociale*, **1**: 47-84.

26. ISOTTI, M. & SARAVAL, A. 1958. Le polinevriti da T.O.C.P. Contributo clinico di una epidemia di casi atipici di origine professionale. *Neurone*, **6**: 275-311.
27. GATTI, B. & SARAVAL, A. 1959. Il problema delle sindromi neurologiche conseguenti all'intossicazione con adesivi gommosi. *Osp. Psichiatr.*, **28**: 185-202.
28. FABIANI, P. & BEDOGNI, G. 1962. Le polinevriti tossiche da adesivi gommosi. *Riv. Neurobiol.*, **8**: 97-100.
29. LOPERFIDO, C. 1962. Considerazioni intorno a particolari manifestazioni polinevritiche insorte in 5 pazienti per probabile assorbimento percutaneo di tri-orto-cresilsolfato. *Riv. Sper. Freniatr.*, **86**: 938-948.
30. LANZARINI, G. 1962. Note su un episodio di intossicazione professionale da triorto-cresilsolfato in una fabbrica di calzature della provincia di Piacenza. *Ig. San. Pubbl.*, **18**: 164-172.
31. PRETOLANI, E. & SCOTTI, M. 1963. Indagine elettroencefalografica in corso di polinevriti tossiche (da T.O.C.P.). *Riv. Infort. Mal. Prof.*, **50**: 357-366.
32. BELLONI, G. B. 1963. Sulle polinevriti. *Fed. Med.*, **6**: 12-18.
33. MAZZELLA DI BOSCO, M. 1964. Su alcuni casi di intossicazione professionale da triorto-crisilsolfato. *Lav. Um.*, **16**: 267-275.
34. PINELLI, P. & TONALI, P. 1964. Studi seriali elettromiografici delle polinevriti. I) Su di un caso di polinevrite motoria (polinevrite dei calzalai) trattato con terapia vitaminico-disintossicante. *Riv. Patol. Nerv. Ment.*, **85**: 345-385.
35. GHERARDI, M. 1965. Polinevriti da triarilsolfati nell'industria delle calzature (aspetti clinici e tossicologici di un focolaio epidemico). *Artis Medicæ Studia*, **29**: 47-66.
36. DEL GRECO, V. & CECCHINI, S. 1966. Neuropatia periferica tossica da adesivi gommosi. *Riv. Neurobiol.*, **1**: 93-97.
37. PINELLI, P. & TONALI, P. 1967. Studi seriali elettromiografici sulle polinevriti. II) Su due casi di polinevrite motoria (« polinevrite dei calzalai ») sottoposti a diverso trattamento. *Acta Med. Rom.*, **5**: 430-471.
38. BORRI, P., CIANCHETTI, C. & GAJNOTTI, G. 1967. Su alcuni casi di polinevriti tossiche provenienti da calzaturifici della regione marchigiana. *Ann. Fac. Med. Chir. Univ. Studi Perugia*, **58**: 491-497.
39. BESSERO, C. 1967. Circa il nesso causale diretto tra polinevriti tossiche e ortotricresilsolfato (T.O.C.P.). *Securitas*, **52**: 55-72.
40. LEONI, G. 1967. Il problema delle polinevriti attribuite a collanti industriali. *Riv. Sper. Freniatr.*, **91**: 1010-1029.
41. PETROMILLI, M. 1968. Considerazioni cliniche e medicolegali su di alcuni casi di polinevrite professionale da tricresilsolfato. *Arch. Soc. Lomb. Med. Assicur.*, **4**: 161-187.
42. CREPET, M., GAFFURI, E. & PICOTTI, G. 1968. La patologia da tri-arilsolfati nell'industria calzaturiera. *Lav. Um.*, **20**: 443-447.
43. CAPELLINI, A., CHIAPPINO, G. & ZURLO, N. 1968. Osservazioni cliniche e sperimentali sulle polinevriti cosiddette da tricresilsolfati. *Med. Lav.*, **59**: 721-759.
44. MAUGERI, S. & CANDURA, A. 1968. La nostra esperienza in tema di patologia da cresilsolfati. *Lav. Um.*, **20**: 450-451.
45. MAZZUCHELLI, B. & GHERSON, G. 1968. L'intossicazione professionale da tricresilsolfato nella industria calzaturiera. *Arch. Soc. Lomb. Med. Assicur.*, **4**: 127-159.

46. MARRONI, M., BENTIVEGNA, R. & RUSSO, G. 1970. Intossicazione da triortocresilfosfato e da triarilfosfati: contributo casistico. *Russ. Med. Lavorat.* **3**: 17-46.
47. VIGLIANI, E.C. 1968. Osservazioni cliniche su 47 casi di polineuriti motorie manifestatesi in operai lavoratori con mastici e collanti. *Lav. Um.* **20**: 448-449.
48. D'ERRICO, T., DE PEDRINI, L., PERBELLINI, G. & BENZANINO, A. 1968. Osservazioni su alcuni casi di intossicazione professionale da T.O.C.P. In: *Atti del XXXI Congresso Nazionale di Medicina del Lavoro*, Bologna, pp. 344-355.
49. RUGGERINI, C. & TESO, G. A. 1968. Episodio di intossicazione collettiva riferita a triortocresilfosfato. *Riv. Infort. Mal. Prof.* **56**: 415-418.
50. MONTANARI, M., GAFFURI, E., GASPERINI, G. F. & DIOLI, G. L. 1969. Sulle polineuropatie tossiche da triarilfosfati. *G. Veneto Sci. Med.* **24**: 224-244.
51. GRAEV, M., CECERE, U. & FROLDI, R. 1971. Illustrazione di 8 casi di polinevriti da ortocresilfosfato e sua dimostrazione chimica in un composto plastificante «Celloresina» usato in una conceria. *Riv. Infort. Mal. Prof.* **58**: 54-74.
52. COSI, V., FAGGI, L. & CAVALLERI, A. 1973. Le polinevriti nell'industria calzaturiera (studio clinico, elettromiografico e bioumorale). *Riv. Neurobiol.* **19**: 5-107.
53. SALIMEI, E. & DI DONFRANCESCO, V. 1972. Osservazione su casi di polineurite nell'industria calzaturiera. *Securitas.* **57**: 777-782.
54. CARNEVALE, F., COSTA, G., D'ANDREA, F., FAGGIONATO, G. & PERBELLINI, L. 1973. Nuove ipotesi sull'etiologia delle polineuropatie da collanti. *Folia Med.* **56**: 11-16.
55. BATTISTINI, N., LENZI, G. L., ZANETTE, E., FIESCHI, C., BATTISTA, F., FRANZINELLI, A. & SARTORELLI, E. 1976. Some observations on polyneuropathies due to organic glues. *Proceedings of the 2nd International Industrial and Environmental Neurology Congress*, Prague 1974, pp. 166-170.
56. BATTISTA, G., BATTISTINI, N., CARBONCINI, F., CATALANO, P., CIONI, R., SARTORELLI, E. & STRAMBI, F. Contributo allo studio delle polineuropatie nei calzaturifici. In preparazione.
57. BARONE, A. 1973. Gli aspetti clinici della polineuropatia da collante. *Acta Neurol.* **28**: 638-646.
58. BUSCAINO, G. A., BALBI, R., CATALDI, L., CARUSO, G., STRIANO, S., BARBIERI, F., STELLA, L. & BACULO, G. 1973. Clinica ed epidemiologia dei casi di «polinevrite da collanti industriali» osservati di recente nel circondario di Napoli. In: *Atti XVIII Congresso della Società Italiana di Neurologia*, Roma, pp. 734-751.
59. CANEVA, P., GEDDES, M. & REGOLI, G. 1973. Polineuropatie tossiche nell'industria delle calzature (Indagine degli Enti Locali nell'Aretino). *Rassegna di Medicina dei Lavoratori.* **5**: 511-519.
60. MONTANARI, M., GASPERINI, G. F., SBARBARO, V. & GIRELLI BRUNI, E. 1973. Considerazioni clinico-statistiche sulle polineuropatie da collanti nella provincia di Verona. In: *Atti XVIII Congresso della Società Italiana di Neurologia*, Roma, pp. 697-708.
61. ABBRITTI, G., SIRACUSA, A., CIANCHETTI, C., COLI, C. A., CURRADI, F., PERTICONI, G. F. & DE ROSA, F. 1973. Sull'etiologia della «polineuropatia tossica dei calzaturieri» (Considerazioni su 88 casi). *Folia Med.* **56**: 374-396.
62. ROSSI, L., RUBINO, A. & TANGREDI, G. 1974. Polineuropatia da collanti industriali: contributo clinico e tossicologico. *Folia Med.* **57**: 165-193.

63. CIANCHETTI, C., ABBRITTI, G., PERTICONI, G., SIRACUSA, A. & CURRADI, F. 1976. Toxic polyneuropathy of shoe-industry workers. A study of 122 cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **39**: 1151-1161.
64. FIASCHI, A., FERRARI, G., & ZIVELONGHI, G. B. 1977. Evoluzione clinica ed elettromiografica delle polineuropatie da collanti. *Riv. Infort. Mal. Prof.* **2**: 285-290.
65. CARAFELLA, C. 1977. Polineuropatie tossiche nei calzaturifici: aspetti preventivi. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **13**: 353-366.
66. CAVALLERI, A. & COSI, V. 1978. Polyneuritis incidence in shoe factory workers: cases report and etiological considerations. *Arch. Environ. Health*, **33**: 192-197.
67. BUIATTI, E., CECCHINI, S., RONCHI, O., DOLARA, P. & BULGARELLI, G. 1978. Relationship between clinical and electromyographic findings and exposure to solvents, in shoe and leather workers. *Br. J. Ind. Med.* **35**: 168-173.
68. DE ZANCHE, L., NEGRINI, P., FARDIN, P., MENEGHETTI, G. & SAIA, A. 1977. Studio clinico ed elettromiografico su 121 lavoratori dell'industria calzaturiera (identificazione di forme subcliniche di polinevrite). *Riv. Infort. Mal. Prof.* **2**: 273-277.
69. CARNEVALE, F., DE GRANDIS, D., DE NONI, L., FIASCHI, A., MERLER, E. & ZIVELONGHI, G. B. 1979. La polineuropatia dei lavoratori calzaturieri: riesame di una casistica ed esiti a distanza. *Epidemiologia e Prevenzione*, **7**: 35-43.
70. ARENA, R., MASSETANI, R., ROSSI, B. & CUOCHI, A. 1977. Indagine sulla polineuropatia da solventi in un gruppo di aziende calzaturiere del Comune di Camisore. *Securitas*, **62**: 667-671.
71. CARLOMAGNO, S. Comunicazione personale, a proposito di casi osservati a Napoli.
72. BATTISTINI, N. & LENZI, G. L. 1975. EEG observations in the polyneuropathy of boot-workers. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **39**: 531-532.
73. BATTISTINI, N. Comunicazione personale.
74. LENZI, G. L., BATTISTINI, N. & CIONI, R. 1977. Studio longitudinale elettroencefalografico sulle polineuropatie da collanti. In: *Congresso Società Italiana di EEG e Neurofisiologia*, Punta Ala 26 maggio 1977.
75. PICOTTI, G. & TREVISAN, A. 1977. Segni di compromissione del sistema nervoso centrale nella intossicazione da collanti. *Riv. Infort. Mal. Prof.* **2**: 279-283.
76. RIZZUTO, N., TERZIAN, H. & GALIAZZO-RIZZUTO, S. 1977. Toxic polyneuropathies in Italy due to leather cement poisoning in shoe industries. A light- and electron-microscopic study. *J. Neurol. Sci.* **31**: 343-354.
77. BONDY, H. F., FIELD, E. J., WORDEN, A. N. & HUGHES, J. P. W. 1960. A study on the acute toxicity of the triaryl phosphates used as plasticizers. *Brit. J. Ind. Med.* **17**: 190-200.
78. TABERSHAW, I. R., KLEINFELD, M. & FEINER, B. 1957. Manufacture of tricresyl phosphate and other alkyl phosphates: an industrial hygiene study. *AMA Arch. Ind. Health*, **15**: 537-540.
79. HODGE, H. C. & STERNER, J. H. 1943. The skin absorption of tricresyl phosphate as shown by radioactive phosphorus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **79**: 225-234.
80. GROSS, E. & GROSSE, A. 1932. Ein Beitrag zur Toxicologie des Orthokresylphosphates. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **168**: 473-514.

81. SMITH, M. I., ENGEL, E. W. & STOHLMAN, H. F. 1932. Further studies on the pharmacology of certain phenol esters, with special reference to the relation of chemical constitution and physiologic action. *Nat. Inst. Health Bull.* **160**: 1.
82. BURLEY, B. T. 1932. Polyneuritis from tricresyl phosphate. *J.A.M.A.* **23**: 298-304.
83. MEDNIKYAN, G. A. & MIRSOYAN, S. A. 1936. Zur Toxikologie des Trikresylphosphats. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **53**: 248-258.
84. SUSSER, M. & STEIN, Z. 1957. An outbreak of T.O.C.P. Poisoning in Durban. *Brit. J. Industr. Med.* **14**: 111-120.
85. WALTHARD, K. M. 1946. Aperçu des résultats obtenus lors des derniers examens des malades intoxiqués en 1940 par le phosphate triorthocrésilique. *Schweiz. Arch. Neurol. Psychiatr.* **58**: 189-194.
86. HOTSTON, R. D. 1946. Outbreak of polyneuritis due to ortho-tricresyl phosphate poisoning. *Lancet.* **i**: 207.
87. GEOFFROY, H., SLOMIC, A., BENEBAJJI, M. & PASCAL, P. 1960. Myélo-polynévrites tri-crésyl phosphatées. Toxi-épidémie marocaine de septembre-octobre 1959. *World Neurol.* **1**: 294-315.
88. VORA, D. D., DASTUR, D. K., BRANGANCA, B. M., PARIHAR, L. M., IYER, C. G. S., FONDEKAR, R. B. & PRABHAKARAN, K. 1962. Toxic polyneuritis in Bombay due to ortho-cresyl-phosphate poisoning. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **25**: 234-242.
89. HUNTER, D., PERRY, K. M. A. & EVANS, R. B. 1944. Toxic polyneuritis arising during the manufacture of tricresyl phosphate. *Brit. J. Ind. Med.* **1**: 227-231.
90. HENSCHLER, D. 1958. Die Trikresylphosphatvergiftung. Experimentelle Klärung von Problemen der Aetiologie und Pathogenese. *Klin. Wochenschr.* **36**: 663-674.
91. ROGER, H. & RECORDIER, M. 1934. Les polynevrites phosphocréosotiques (phosphate de créosote, gînger paralysis, apiol). *Ann. Med. (Paris)* **35**: 44-63.
92. MIDDENDORFF, E. 1952. Ortho-trikresylschäden durch den Gebrauch von Igelitgegenständen. *Arch. Toxicol.* **14**: 117-123.
93. BORGMANN, W. & HUNOLD, G. A. 1951. Ortho-Trikresylphosphat im Weichigelit. *Z. Hyg.* **133**: 26-44.
94. GLESS, P. & JANZIK, H. 1965. Chemically (TCP) induced fibre degeneration in the central nervous system, with reference to clinical and neuropharmacological aspects. *Progr. Brain Res.* **14**: 97-121.
95. HIERHOLZER, K., NOETZEL, H. & SCHMIDT, L. 1957. Vergleichende toxicologische Untersuchung von Triphenylphosphat und Trikresylphosphat. *Arzneim. Forsch.* **7**: 585-588.
96. DAVIES, D. R. 1963. Neurotoxicity of organophosphorus compounds. *Handb. Exp. Pharmacol.* **15**: 860-882.
97. CAVANAGH, J. B. 1954. The toxic effects of tri-ortho-cresyl phosphate on the nervous system. An experimental study on hens. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **17**: 163-172.
98. HINE, C. H., DUNLAP, M. K., RICE, E. G., COURSEY, M. M., GROSS, R. M. & ANDERSON, H. H. 1956. The neurotoxicity and anticholinesterase properties of some substituted phenyl phosphates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **116**: 227-235.

99. JOHNSON, M. K. 1975. Organophosphorus esters causing delayed neurotoxic effects. Mechanism of action and structure/activity studies. *Arch. Toxicol.* **34**: 259-288.
100. HENSCHLER, D. 1957. Toxikologische Untersuchungen an Trikresylphosphaten. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **232**: 223-225.
101. GLEES, P. & WHITE, W. G. 1961. The absorption of tri-ortho-cresyl phosphate through the skin of hens and its neurotoxic effects. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **24**: 271-274.
102. CARPENTER, H. M., JENDEN, D. J., SHULMAN, N. R. & TUREMAN, J. R. 1959. Toxicology of triaryl phosphate oil. *AMA Arch. Ind. Health.* **20**: 234-252.
103. BIDSTRUP, P. L., BONNELL, J. A. & BECKETT, A. G. 1953. Paralysis following poisoning by a new organic phosphorus insecticide. *Brit. Med. J.* **1**: 1068-1072.
104. BAKER, T., GLAZER, E. & LOWNDES, H. E. 1977. Subacute neuropathic effects of diisopropylfluorophosphate at the cat soleus neuromuscular junction. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **3**: 377-390.
105. JOHNSON, M. K. 1969. Delayed neurotoxic action of some organophosphorus compounds. *Brit. Med. Bull.* **25**: 231-235.
106. CAVANAGH, J. B. 1964. Peripheral nerve changes in ortho-cresyl phosphate poisoning in the cat. *J. Pathol. Bacteriol.* **87**: 365-383.
107. CAVANAGH, J. B. & PATANGIA, G. N. 1965. Changes in the central nervous system of the cat as a result of tri-o-cresyl phosphate poisoning. *Brain.* **88**: 165-180.
108. BISCHOFF, A. 1967. The ultrastructure of triortho-cresyl phosphate poisoning. I) Studies on myelin and axonal alterations in the sciatic nerve. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **9**: 158-174.
109. PRINEAS, J. 1969. The pathogenesis of dying-back polyneuropathies. I. An ultrastructural study of experimental tri-ortho-cresyl phosphate intoxication in the cat. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **28**: 571-597.
110. BLOCH, H. 1941. Der Einfluss von Trikresylphosphat auf die Aktivität der Cholinesterase. *Helv. Med. Acta.* **8**: (Suppl. 7): 15-17.
111. ALDRIDGE, W. N. 1954. Trikresyl phosphates and cholinesterase. *Biochem. J.* **56**: 185-189.
112. EARL, C. J. & THOMPSON, R. H. S. 1952. Cholinesterase levels in the nervous system in tri-ortho-cresyl phosphate poisoning. *Brit. J. Pharmacol.* **7**: 685-694.
113. MYERS, D. K., REBEL, J. B. J., VEEGER, C., KEMP, A. & SIMONS, F. G. L. 1955. Metabolism of triaryl phosphate in rodents. *Nature (London).* **176**: 259-260.
114. CASIDA, J. E., ETO, M. & BARON, R. L. 1961. Biological activity of a tri-o-cresyl phosphate metabolite. *Nature (London).* **191**: 1396-1397.
115. HOTTINGER, A. & BLOCH, H. 1943. Über die Spezifität der Cholinesterase Hemmung durch Tri-o-kresyl-phosphat. *Helv. Chim. Acta.* **26**: 142-155.
116. FARAJ. 1960. Intoxicacion collective par une huile à base de crésylphosphates. *Sem. Hép.* **36**: 2807-2840.
117. DAVISON, A. N. 1953. Some observations on the cholinesterases of the central nervous system after the administration of organo-phosphorus compounds. *Brit. J. Pharmacol.* **8**: 212-216.

118. ALDRIDGE, W. N., BARNES, J. M. & JOHNSON, M. K. 1969. Studies on delayed neurotoxicity produced by some organophosphorus compounds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **160**: 314-322.
119. JOHNSON, M. K. 1975. The delayed neuropathy caused by some organophosphorus esters: mechanism and challenge. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **3**: 289-316.
120. JOHNSON, M. K. 1975. Structure-activity relationships for substrates and inhibitors of hen brain neurotoxic esterase. *Biochem. Pharmacol.* **24**: 797-805.
121. JOHNSON, M. K. 1976. Mechanism of protection against the delayed neurotoxic effects of organophosphorus esters. *Fed. Proc.* **35**: 73-74.
122. ETO, M., ABE, M. & TAKAHARA, H. 1971. Metabolism of tri-*p*-ethylphenyl phosphate and neurotoxicity of the metabolites. *Agric. Biol. Chem.* **35**: 929-940.
123. JOHANNSEN, F. R., WRIGHT, P. L., GORDON, D. E., LEVINSKAS, G. J., RADUE, R. W. & GRAHAM, P. R. 1977. Evaluation of delayed neurotoxicity and dose-response relationships of phosphate esters in the adult hen. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **41**: 291-304.
124. CLOTHIER, B. & JOHNSON, M. K. 1979. Rapid aging of neurotoxic esterase after inhibition by di-isopropyl phosphorofluoridate. *Biochem. J.* **177**: 549-558.
125. JOHNSON, M. K. 1977. Improved assay of neurotoxic esterase for screening organophosphates for delayed neurotoxicity potential. *Arch. Toxicol.* **37**: 113-115.
126. COCHED, V., DE ROSA, E., BARTOLUCCI, G. B. & MAZZOTTA, M. 1977. Determinazione dei plastificanti monomerici e dei solventi organici impiegati nell'industria calzaturiera: contributo sperimentale. *Riv. Infort. Mal. Prof.* **2**: 189-203.
127. BERLINCIONI, M., SIGNORELLI, L., MARTELLINI, F., BATTINI, P., MANTELLI, F., FAROLFI, P. L., BACHERINI, F. & TARABUSI, L. 1977. Determinazione dei plastificanti fosfororganici e dei solventi nell'aria ambientale dell'industria calzaturiera. *Ann. Ist. Super. Sanità.* **13**: 267-284.
128. SCRIMA, M. 1970. Riconoscimento per via enzimatica dell'ortotocresilfosfato nei collanti e pellami. *Lav. Um.* **22**: 125-131.
129. BELLINO, M., FICARRA, M., FRONTALI, N., CHEZZO, F., GUARCINI, A. M., ORECCHIO, F., SERPIETRI, L. A. & TRAINA, M. E. 1978. A quick and simple method for the routine determination of acetyl- and butyrylcholinesterase in blood. *Brit. J. Ind. Med.* **35**: 161-167.
130. CAUDARELLA, R., GENNARI, P. & D'ANTUONO, G. 1975. Aspetti istologici del danno epatico nelle intossicazioni croniche da triortocresilfosfato. *Lav. Um.* **27**: 161-174.
131. LAZAREW, N. W. 1929. Über die Giftigkeit verschiedener Kohlenwasserstoffdämpfe. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **143**: 223-233.
132. PIOTROWSKI, J. K. 1977. *Exposure tests for organic compounds in industrial toxicology.* U. S. Department of H. E. W. NIOSH, Cincinnati, Ohio.
133. NOMIYAMA, K. & NOMIYAMA, H. 1974. Respiratory retention, uptake and excretion of organic solvents in man. *Int. Arch. Arbeitsmed.* **32**: 75-83.
134. BRUGNONE, F., PERBELLINI, L., GRIGOLINI, L. & APOSTOLI, P. 1978. Solvent exposure in a shoe upper factory. I. n-Hexane and acetone concentration in alveolar and environmental air and in blood. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* **42**: 51-62.

135. ROMMELT, H. & DIRNAGL, K. 1977. Pulmonale Resorption von sechs Kohlenwasserstoffen in Abhängigkeit von der Konzentration in der Atemluft. *Münch. Med. Wschr.* **119**: 367-368.
136. NOMIYAMA, K. & NOMIYAMA, H. 1975. The effects of the cutaneous absorption of n-hexane on humans. *Jap. J. Hyg.* **30**: 140.
137. BOHLEN, P., SCHLUNEGGER, U. P. & LÄUPPI, E. 1973. Uptake and distribution of hexane in rat tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **25**: 242-249.
138. MOHAMMADZADEH-K., A., FEENEY, R. E., SAMUELS, R. B. & SMITH, L. M. 1967. Solubility of alkanes in protein solutions. *Biochim. Biophys. Acta.* **147**: 583-589.
139. ULLRICH, V. 1969. On the hydroxylation of cyclohexane in rat liver microsomes. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **350**: 357-365.
140. ICHIHARA, K., KUSUNOSE, E. & KUSUNOSE, M. 1969. Microsomal hydroxylation of decane. *Biochim. Biophys. Acta.* **176**: 713-719.
141. FROMMER, U., ULLRICH, V. & STAUDINGER, H. 1970. Hydroxylation of aliphatic compounds by liver microsomes. I. The distribution pattern of isomeric alcohols. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **351**: 903-912.
142. FROMMER, U., ULLRICH, V. & STAUDINGER, H. 1970. Hydroxylation of aliphatic compounds by liver microsomes. II. Effect of phenobarbital induction in rats on specific activity and cytochrome P-450 substrate binding spectra. *Hoppe-Seiler's Z. Physiol. Chem.* **351**: 913-918.
143. FROMMER, U., ULLRICH, V., STAUDINGER, H. & ORRENIUS, S. 1972. The monooxygenation of n-heptane by rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta.* **280**: 487-494.
144. KRÄMER, A., STAUDINGER, H. & ULLRICH, V. 1974. Effect of n-hexane inhalation on the monooxygenase system in mice liver microsomes. *Chem. Biol. Interact.* **8**: 11-18.
145. FROMMER, U., ULLRICH, V. & ORRENIUS, S. 1974. Influence of inducers and inhibitors on the hydroxylation pattern of n-hexane in rat liver microsomes. *Febs Lett.* **41**: 14-16.
146. ABDEL-RAHMAN, M. S., HETLAND, L. B. & COURI, D. 1976. Toxicity and metabolism of methyl n-butyl ketone. *J. Am. Ind. Hyg. Assoc.* **37**: 95-102.
147. DI VINCENZO, G. D., KAPLAN, C. J. & DEDINAS, J. 1976. Characterization of the metabolites of methyl n-butyl ketone, methyl iso-butyl ketone, and methyl ethyl ketone in guinea pig serum and their clearance. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **36**: 511-522.
148. SPENCER, P. S. & SCHAUMBURG, H. H. 1975. Experimental neuropathy produced by 2,5-hexanedione, a major metabolite of the neurotoxic industrial solvent methyl n-butyl ketone. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **38**: 771-775.
149. PERBELLINI, L., DE GRANDIS, D., SEMENZATO, F., RIZZUTO, N. & SIMIONATI, A. 1978. An experimental study on the neurotoxicity of n-hexane metabolites: hexanol-1 and hexanol-2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **46**, 421-427.
150. SCHAUMBURG, H. H. & SPENCER, P. S. 1976. Central and peripheral nervous systems degeneration produced by pure n-hexane: an experimental study. *Brain.* **99**: 183-192.
151. SPENCER, P. S., SCHAUMBURG, H. H., RALEIGH, R. L. & TERHAAR, C. J. 1975. Nervous system degeneration produced by the industrial solvent methyl n-butyl ketone. *Arch. Neurol.* **32**: 219-222.

152. DI VINCENZO, G. D., HAMILTON, M. L., KAPLAN, C. J. & DEDINAS, J. 1977. Metabolic fate and disposition of ¹⁴C-labelled methyl n-butyl ketone in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **41**: 547-560.
153. COURI, D., ABDEL-RAHMAN, M. S. & HETLAND, L. B. 1978. Biotransformation of n-hexane and methyl n-butyl ketone in guinea pigs and mice. *J. Am. Ind. Hyg. Assoc.* **39**: 295-300.
154. PERBELLINI, L., BRUGNONE, F., PASTORELLO, G. & GRIGOLINI, L. 1978. Urinary excretion of n-hexane metabolites in rats and humans. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* **42**: 349-354.
155. DI VINCENZO, G. D., HAMILTON, M. L., KAPLAN, C. J., KRASAVAGE, W. J. & O'DONOGHUE, J. L. 1978. Studies on the respiratory uptake and excretion and the skin absorption of methyl n-butyl ketone in humans and dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **44**: 593-604.
156. COURI, D., HETLAND, L. B., ABDEL-RAHMAN, M. S. & WEISS, H. 1977. The influence of inhaled ketone solvent vapors on hepatic microsomal biotransformation activities. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **41**: 285-289.
157. SAIDA, K., MENDELL, J. R. & WEISS, H. 1976. Peripheral nerve changes induced by methyl n-butyl ketone and potentiation by methyl ethyl ketone. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **35**: 207-225.
158. PERBELLINI, L., BRUGNONE, F. & PAVAN, I. Identification of the metabolites of n-hexane, cyclohexane and their isomers in men's urine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* In corso di stampa.
159. ALTENKIRCH, H., STOLTENBURG, G. & WAGNER, H. M. 1978. Experimental studies on hydrocarbon neuropathies induced by methyl-ethyl-ketone (MEK). *J. Neurol.* **219**: 159-170.
160. ALTENKIRCH, H., MAGER, J., STOLTENBURG, G. & HELMBRECHT, J. 1977. Toxic polyneuropathies after sniffing a glue thinner. *J. Neurol.* **214**: 137-152.
161. NOTTEN, W. R. F. & HENDERSON, P. T. 1975. Action of n-alkanes on drug-metabolizing enzymes from guinea pig liver. *Biochem. Pharmacol.* **24**: 1093-1097.
162. PATTY, F. A. & YANT, W. P. 1929. Report of investigations—odor intensity and symptoms produced by commercial propane, butane, pentane, hexane, and heptane vapor, No. 2979. US Dept. of Commerce, Bureau of Mines, 10 pp.
163. HENDERSON, V. E. & SMITH, A. H. R. 1936. Propylene impurities—hexenes and hexanes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **58**: 319-327.
164. FÜHNER, H. 1921. Die narkotische Wirkung des Benzins und seiner Bestandteile (Pentan, Hexan, Heptan, Octan). *Biochem. Z.* **115**: 235-261.
165. SWANN, H. E., KWON, B. K., HOGAN, G. K. & SNELLINGS, W. M. 1974. Acute inhalation toxicology of volatile hydrocarbons. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **35**: 511-18.
166. KIMURA, E. T., EBERT, D. M. & DODGE, P. W. 1971. Acute toxicity and limits of solvent residue for sixteen organic solvents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **19**: 699-704.
167. BRAIER, L. 1973. A comparative study of isocyclic hydrocarbons in animals and in man. *Haematologica.* **58**: 491-500.
168. SPAGNA, C., PARLATO, G. & TIMPANARO, V. 1967. Comportamento della crisi ematica nelle intossicazioni sperimentali da esano. *Folia Med.* **50**: 977-985.

169. FICHERA, G., SPAGNA, C. & TIMPANARO, V. 1968. Intossicazioni da idrocarburi. *Folia Med.* **51**: 633-640.
170. OETTEL, H. 1936. Einwirkung organischer Flüssigkeiten auf die Haut. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmac.* **183**: 641-696.
171. OISHI, H., MINENO, K., YAMADA, M., CHIBA, K. & SHIBATA, K. 1964. Polyneuropathy caused by an organic solvent (n-hexane). *Saigai Igaku.* **7**: 218-222.
172. WADA, Y., OKAMOTO, S. & TAKAGI, S. 1965. Intoxication polyneuropathy following exposure to n-hexane. *Clin. Neurol.* **5**: 591-598.
173. YAMADA, S. 1967. Intoxication polyneuritis in the workers exposed to n-hexane. *Jap. J. Ind. Health.* **9**: 651-659.
174. MIYAGACHI, H. 1967. Electrophysiological studies on the peripheral neurotoxicity of n-hexane. *Jap. J. Ind. Health.* **9**: 660-671.
175. KURITA, H. 1967. Experimental studies on the effects of n-hexane to albino rats. *Jap. J. Ind. Health.* **9**: 672-677.
176. SOBUE, I., YAMAMURA, Y., ANDO, K., IIDA, M. & TAKAYANAGI, T. 1968. n-Hexane polyneuropathy. Outbreak among vinyl sandal manufacturers. *Clin. Neurol.* **8**: 393-403.
177. YAMAMURA, Y. 1969. n-Hexane polyneuropathy. *Folia Psychiatr. Neurol. Jpn.* **23**: 45-57.
178. IIDA, M., YAMAMOTO, H. & SOBUE, I. 1973. Prognosis of n-hexane polyneuropathy: follow-up studies on a mass outbreak in Fukaya district of Mie prefecture. *Igaku No Ayumi.* **84**: 199-201.
179. INOUE, T., TEKEUCHI, Y., TEKEUCHI, S., YAMADA, S., SUZUKI, H., MATSUSHITA, T., MIYAGAKI, H., MAEDA, K. & MATSUMOTO, T. 1970. Industrial health survey of a high incidence of n-hexane intoxication among vinyl sandal manufacturers. *Jap. J. Ind. Health.* **12**: 73-84.
180. TAKEUCHI, Y., MABUCHI, C. & TAKAGI, S. 1975. Polyneuropathy caused by petroleum benzene. *Int. Arch. Arbeitsmed.* **34**: 184-197.
181. HERSKOWITZ, A., ISHII, N. & SCHAUMBURG, H. H. 1971. n-Hexane neuropathy. A syndrome occurring as a result of industrial exposure. *N. Engl. J. Med.* **285**: 82-85.
182. PRINEAS, J. 1969. The pathogenesis of dying-back polyneuropathies. II. An ultrastructural study of experimental acrylamide intoxication in the cat. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **28**: 598-621.
183. PAULSON, G. W. & WAYLONIS, G. W. 1976. Polyneuropathy due to n-hexane. *Arch. Intern. Med.* **136**: 880-882.
184. CAVIGNEAUX, A. 1972. Polinevrites par n-hexane. *Institut National de Recherche et de Sécurité.* Note n. 792-67-72.
185. GAULTIER, M., RANCUREL, R., PIVA, C. & EFTHYMIU, M. L. 1973. Polinévrites et hydrocarbures aliphatiques. *J. Eur. Toxicol.* **6**: 294-296.
186. ASSOULY, M., SIOU, G. & CAVIGNEAUX, A. 1972. Polinévrites par n-hexane. *Arch. Mal. Prof. Med. Trav. Secur.* **33**: 309-310.
187. LAZARINI, H. J., DOIGNON, J., CASSAN, J., L'EPÉE, P. & LARCHE, M. 1977. Un cas de polinévrite par le n-hexane observé à la consultation des maladies professionnelles de Bordeaux. *Arch. Mal. Prof. Med. Trav. Secur.* **38**: 272-273.

188. CONTAMIN, F., GOULON, M. & MARGAIRAZ, A. 1960. Polinévrites observées chez des sujets utilisant comme moyen de chauffage des appareils à combustion catalytique de l'essence. *Rev. Neurol.* **103**: 341-354.
189. SALVADEO, A., CAPODOGLIO, E. & PEZZAGNO, G. 1963. Risultato dell'analisi gas-cromatografica di collanti usati nell'industria calzaturiera, ai fini dell'accertamento del rischio da benzene e omologhi. *Rass. Med. Ind. Ig. Lav.* **32**: 44-54.
190. DE ROSA, E., BARTOLUCCI, G. B., COCHEO, V. & MANNO, M. 1977. Ambiente di lavoro calzaturiero: inquinamento da solventi. *Riv. Infort. Mal. Prof.* **2**: 215-222.
191. MATSUMURA, M., INOUE, N., OHNISHI, A., SANTA, T. & GOTO, I. 1972. Toxic polyneuropathy due to glue sniffing. Report of twin sisters. *Clin. Neurol.* **12**: 290-296.
192. GONZALEZ, E. G. & DOWNEY J. A. 1972. Polineuropathy in a glue sniffer. *Arch. Phys. Med.* **53**: 333-337.
193. GOTO, I., MATSUMURA, M., INOUE, N., MURAI, Y., SHIDA, K., SANTA, T. & KUROIWA, Y. 1974. Toxic polyneuropathy due to glue sniffing. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **37**: 848-853.
194. SUZUKI, T., SHIMBO, S., NISHITANI, H., OGA, T., IMAMURA, T. & IKEDA, M. 1974. Muscular atrophy due to glue sniffing. *Int. Arch. Arbeitsmed.* **33**: 115-123.
195. SHIRABE, T., TSUDA, T., TERAQ, A. & ARAKI, S. 1974. Toxic polyneuropathy due to glue-sniffing. *J. Neurol. Sci.* **21**: 101-113.
196. KOROBKIN, R., ASBURY, A. K., SUMNER, A. J. & NIELSEN, S. L. 1975. Glue-sniffing neuropathy. *Arch. Neurol.* **32**: 158-162.
197. TOWFIGHI, J., GONATAS, N. K., PLEASURE, D., COOPER, H. S. & MCCREE, L. 1976. Glue sniffer's neuropathy. *Neurology.* **26**: 238-243.
198. KARANI, V., 1966. Peripheral neuritis after addiction to petrol. *Br. Med. Bull.* **1**: 216.
199. TRUBAUT, R., LAGET, P., PIAT, G., PHU-LICH, N., DUTERTRE-CATELLA, H. & HUYEN, V. N. 1973. Premiers résultats électrophysiologiques après intoxications expérimentales par l'hexane et par l'heptane techniques chez le rat blanc. *Arch. Mal. Prof. Med. Trav. Secur.* **34**: 417-426.
200. SPENCER, P. S. & SCHAUMBURG, H. H. 1977. Ultrastructural studies of the dying-back process. III. The evolution of experimental peripheral giant axonal degeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **36**: 276-299.
201. SPENCER, P. S. & SCHAUMBURG, H. H. 1977. Ultrastructural studies of the dying-back process. IV. Differential vulnerability of PNS and CNS fibres in experimental central-peripheral distal axonopathies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **36**: 300-320.
202. SCHAUMBURG, H. H. & SPENCER, P. S. 1978. Environmental hydrocarbons produce degeneration in cat hypothalamus and optic tract. *Science.* **199**: 199-200.
203. SPENCER, P. S., SCHAUMBURG, H. H. & PETERSON, E. R. 1975. Neurofilamentous axonal degeneration *in vivo* and *in vitro* produced by 2,5-hexanedione. *Neuroscience Abstracts* (Society for Neuroscience, 5th annual meeting, New York City).
204. VERONESI, B., PETERSON, E., DI VINCENZO, G. & SPENCER, P. S. 1978. A tissue culture model of distal (dying-back) axonopathy - its use in determining primary neurotoxic hexacarbon compounds. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **37**: 703.
205. GRIFFIN, J. W., PRICE, D. I. & SPENCER, P. S. 1977. Fast axonal transport through giant axonal swellings in hexacarbon neuropathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **36**: 603.

206. SPENCER, P. S. & SCHAUMBURG, H. H. 1978. Pathobiology of neurotoxic axonal degeneration. In: *Physiology and Pathobiology of Axons*. S. G. Waxman (Ed.). Raven Press, New York, pp. 265-282.
207. SABRI, M. I., MOORE, C. I. & SPENCER, P. S. 1979. Studies on the biochemical basis of distal axonopathies. I. Inhibition of glycolysis by neurotoxic hexacarbon compounds. *J. Neurochem.* **32**: 683-689.
208. FOÀ, V., GILIOLI, R., BULGERONI, C., MARONI, M. & CHIAPPINO, G. 1976. Sulla eziologia delle polineuriti da collanti: indagine sperimentale intorno alla neurotossicità del n-esano. *Med. Lav.* **67**: 136-144.
209. FOÀ, V., BULGERONI, C., MARONI, M., GILIOLI, R. & CHIAPPINO, G. 1977. Considerazioni cliniche e ricerche sperimentali sull'eziologia delle polineuriti da collanti. *Riv. Infort. Mal. Prof.* **2**: 223-230.
210. DONELLI, G., FRONTALI, N., GUARCINI, A. M., SALTARI, C. & TANGUCCI, F. 1978. Light and electron microscope observations on peripheral nerves of rats treated with n-hexane and cyclohexane. *J. Submicrosc. Cytol.* **10**: 125-126.
211. FRONTALI, N., AMANTINI, M. C., SPAGNOLO, A., GUARCINI, A. M. & SALTARI, M. C. 1979. Polineuropatia sperimentale da solventi dei collanti in uso nell'industria calzaturiera. Trattamento per via respiratoria di ratti con singoli componenti puri. *Atti del Secondo Convegno sulla Patologia indotta dai Tossici Ambientali ed Occupazionali*. Torino 21-22 maggio 1979.
212. BONASHEVSKAYA, T. I. & PARTSEF, D. P. 1971. Experimental investigation of the biological effect of microconcentration of a pentane and hexane mixture in the air. *Gig. Sanit.* **36**: 11-15.
213. SPENCER, P. S., BISCHOFF, M. C. & SCHAUMBURG, H. H. 1978. On the specific molecular configuration of neurotoxic aliphatic hexacarbon compounds causing central-peripheral distal axonopathy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **44**: 17-28.
214. FRANCHINI, I., CAVATORTA, A., D'ERRICO, M., DE SANTIS, M., ROMITA, G., GATTI, R., JUVARRA, G. & PALLA, G. 1978. Studies on the etiology of the experimental neuropathy from industrial adhesive (glues). *Experientia.* **34**: 250-252.
215. FRANCHINI, I., CAVATORTA, A., FALZOL, M., ROMITA, G., GATTI, R., PIETRINI, V., TAGLIAVINI, F. & PALLA, G. 1978. Neurotossicità sperimentale del ciclohexane et du cyclohexanone. *XIX International Congress on Occupational Health*. Abstracts. Dubrovnik 25-30 settembre 1978.
216. GAZZANIGA, G. & CROVATO, E. 1977. Controllo automatico dell'inquinamento nell'ambiente di lavoro presso una industria di vernici. *Boll. Lab. Chim. Prov.* **3**: 57-63.
217. U. S. DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION, AND WELFARE. 1977. *Criteria for a recommended standard... Occupational exposure to Alkanes (C₅-C₈)*. U. S. Government Printing Office, Washington, pp. 97-113.
218. WESTBERG, H. H., RASMUSSEN, R. A. & HOLDREN, M. 1974. Gas chromatographic analysis of ambient air for light hydrocarbons using a chemically bonded stationary phase. *Anal. Chem.* **46**: 1852-1857.
219. EMILIA ROMAGNA. 1978. Indagine regionale sulla nocività dei calzaturieri.
220. BARTOLUCCI, G. B., COCHEO, V., DE ROSA, E., MANNO, M. & MAZZOTTA, M. 1977. Composizione dei materiali (pelli e collanti) di uso corrente nell'industria calzaturiera. *Riv. Infort. Mal. Prof.* **2**: 205-213.

221. SMORTO, M. P. & BASMAJIAN, J. V. 1977. *Electrodiagnosis*. Harper & Row Ed. Hagerstown, Maryland.
222. BOULDIN, T. W. & CAVANAGH, J. B. 1979. Organophosphorous neuropathy. I. A teased-fiber study of the spatio-temporal spread of axonal degeneration. *Amer. J. Pathol.* **94**: 241-248.
223. BOULDIN, T. W. & CAVANAGH, J. B. 1979. Organophosphorous neuropathy. II. A fine-structural study of the early stages of axonal degeneration. *Amer. J. Pathol.* **94**: 253-262.
224. GLAZER, E. J., BAKER, T. & RIKER, W. F. JR. 1978. The neuropathology of DFP at cat soleus neuromuscular junction. *J. Neurocytol.* **7**: 741-758.
225. LOTTI, M. & JOHNSON, M. K. 1978. Neurotoxicity of organophosphorous pesticides: predictions can be based on *in vitro* studies with hen and human enzymes. *Arch. Toxicol.* **41**: 215-221.
226. RICHARDSON, R. J., DAVIS, C. S. & JOHNSON, M. K. 1979. Subcellular distribution of marker enzymes and of neurotoxic esterase in adult hen brain. *J. Neurochem.* **32**: 607-615.
227. OLAJOS, E. J. & ROSENBLUM, I. 1979. Measurement of neurotoxic esterase activity in various subcellular fractions of hen brain and sciatic nerve homogenates and the effect of DFP administration. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **3**: 18-28.
228. MANNO, M., RIGONI, F., BARTOLUCCI, G. B., BIANCHI, M. & MAZZOTTA, M. 1979. Effects of tricresylphosphate on esterase activity of rat serum and tissues. *Br. J. Ind. Med.* **36**: 153-156.
229. ALBERTI, S., BENVENUTI, F. & BOCCIARDI, P. 1978. La polinevrite dei calzaturieri. Studio delle condizioni di rischio, intervento di bonifica ed andamento epidemiologico in un calzaturificio. *Securitas.* **63**: 57-67.
230. POWELL, H. C., KOCH, T., GARRETT, R. & LAMPERT, P. W. 1978. Schwann cell abnormalities in 2,5-hexanedione neuropathy. *J. Neurocytol.* **7**: 517-528.
231. AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. 1979. Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents in the Workroom Environment with Intended Changes for 1979.