

# Evaluation of the exposure to airborne endotoxins in several working environments in Tuscany

## Valutazione dell'esposizione alle endotossine aerodisperse in diversi ambienti lavorativi del territorio Toscano

Fabrizio Cervelli\*, Marzia Quilici, Agostino Bazzichi

Laboratori ARCHA srl, Divisione Biologica

Corresponding author:

Laboratori ARCHA srl, Divisione Biologica, via di Tegulaia, 10/A, 56121 Ospedaletto (PI), Italy; tel. 050-985196; Fax 050-985233; E.mail: fabrizio.cervelli@archa.it

The exposure to airborne endotoxins in working environments is often correlated with the onset of various symptoms that affect mainly the airway. Considering their provenience from gram negative bacteria, microorganisms prevailing in water environment, several activities involving handling elements containing aqueous fractions (such as waste handling, waste water treatment, and metal mechanic industry), may expose their operators to the onset of pathologies caused by endotoxins. The exposure level has been evaluated in specific fields considered at risk evaluating possible correlations with the generic Total Vital Bacterial at 36°C (TVB). All the investigations have demonstrated the presence of endotoxins aerosols in a quite extended range (<0,01-103,778 ng·m<sup>-3</sup>/8 hours) and the lack of correlation with TVB. Considering the ineluctable exposure to airborne endotoxins, we proposed a system to assess the maximum allowed exposure in a contaminated environment on the base of the proposed TLV (4.5 ng·m<sup>-3</sup>/8 hours).

L'esposizione alle endotossine aerodisperse negli ambienti di lavoro è spesso associata all'insorgenza di numerosi sintomi che colpiscono principalmente le vie aeree. Vista la loro provenienza dalla parete dei batteri gram negativi, microrganismi prevalenti dell'ambiente idrico, le varie attività coinvolte nella manipolazione di matrici contenenti frazioni acquose (come trattamento rifiuti, trattamento reflui, industrie metalmeccaniche), possono esporre i propri addetti all'insorgenza di patologie ascrivibili alle endotossine. Il livello di esposizione è stato valutato in specifici settori considerati a rischio andandone a valutare l'entità e le possibili correlazioni con la generica carica batterica totale a 36°C (CBT). Tutti i settori indagati hanno dimostrato la presenza di endotossine aerodisperse in un range piuttosto ampio (<0,01-103,778 ng·m<sup>-3</sup>/8 ore) e la sostanziale mancanza di una correlazione con la CBT. Vista l'ineluttabile esposizione alle endotossine aerodisperse, viene presentato un sistema per la stima del tempo massimo di permanenza in un ambiente contaminato basandosi sul TLV proposto (4,5 ng·m<sup>-3</sup>/8 ore).

### Introduzione

Le endotossine, o lipopolisaccaridi (LPS), sono dei costituenti della membrana cellulare esterna dei batteri Gram negativi [Davis et al., 1986] e di alcuni cianobatteri [Weise et al., 1970]. Chimicamente possono essere descritte come un complesso lipopolisaccaridico formato da tre regioni principali: il Lipide A, una regione di transizione o polisaccaride R e una lunga catena zuccherina chiamata polisaccaride O o antigene O [Braude, 1982; Keleti and Sykora, 1982].

I termini endotossina o LPS vengono di norma utilizzati come sinonimi anche se, più correttamente, l'LPS rappresenta il composto chimico puro senza altri costituenti della membrana cellulare, mentre l'endotossina è formata dalle porzioni di membrana batterica contenenti il lipopolisaccaride assieme ad altri costituenti della membrana cellulare [Greff-Mirguet, 2002; Anderson et al., 2002].

Le endotossine sono diffuse ubiquitariamente nell'ambiente [Singh and Schwartz, 2005]. Numerosi studi hanno infatti dimostrato la presenza di endotossine nell'acqua, nella polvere ambientale e disperse nell'aria dei più svariati siti occupazionali o domestici [Rylander, 2002; Simpson et al., 2003; Wouters et al., 2006; Rylander et al., 1999; Prazmo et al., 2003; Heldal et al., 1997; Midtgård et al., 1997; Breum et al., 1999; Thorn et al., 2002; Thorne et al., 2003; Park et al., 2000, Park, 2001] con livelli di concentrazione di LPS ampiamente variabili a seconda delle attività prese in considerazione (da 0,1 a 32170 ng·m<sup>-3</sup>). Tra tutti i settori valutati quello agricolo presenta il minore range

di variabilità, con livelli di endotossina mediamente elevati (da 25 a 3480 ng·m<sup>-3</sup>).

L'importanza delle endotossine è ben nota in ambito sanitario, in particolare nel settore dialitico, dove è stata ampiamente documentata la loro azione tossica nei pazienti esposti ad alte concentrazioni ematiche di endotossine (effetto pirogenico) [Anderson et al., 2002].

Vista però l'ampia diffusione ambientale dei batteri gram negativi è possibile che avvenga l'esposizione alle endotossine anche attraverso la frequentazione di ambienti contaminati da questi microrganismi, determinando così una loro rilevanza igienico sanitaria anche in campo ambientale.

Normalmente la via di ingresso preferenziale delle endotossine ambientali è rappresentata da quella respiratoria, provocando nel soggetto interessato tutta una serie di sintomi che comprendono febbre, mialgia, brividi e dispnea accompagnati da una ostruzione delle vie aeree con una loro marcata iperreattività e una caduta della capacità di diffusione polmonare [Singh and Schwartz, 2005]. A livello cellulare le endotossine espletano la loro azione tossica innescando una serie di reazioni a catena [Rylander, 2002; Singh and Schwartz, 2005].

La prima fase di queste vede il legame del lipopolisaccaride a una proteina ad alta affinità lipidica (LBP - Lipid Binding Protein) normalmente presente nei fluidi che rivestono la mucosa delle vie aeree. Questa proteina trasferisce l'endotossina a specifici recettori di membrana quali la proteina CD14 e il TLR-4 (Toll-like receptor-4) particolarmente espressi sulla superficie delle cellule del sistema immunitario. Tale legame porta, attraverso la produ-

zione di varie citochine (IL-1, IL-6, IL-8 e il Tumor Necrosis Factor o TNF) all'innescio di tutta una serie di reazioni a catena sia nel distretto polmonare che a livello sistemico, mediante l'attivazione rispettivamente della cascata del complemento (con conseguente infiammazione delle vie aeree e polmoniti) e del fattore di Hagemann (con conseguenti infiammazioni e, in casi estremamente gravi, emorragie interne, coagulazione intravascolare, ipotensione e shock).

La presenza di endotossine nell'ambiente può quindi portare allo sviluppo di un ampio spettro di manifestazioni patologiche, sia acute che croniche, a carico del sistema respiratorio [Singh and Schwartz, 2005; Anderson et al., 2002; Rylander, 1994], anche se alcuni autori hanno invece riportato delle evidenze sperimentali che dimostrano come l'esposizione alle endotossine nella prima infanzia possa giocare un ruolo protettivo nei confronti dello sviluppo di patologie allergiche [Liu, 2002; Portengen et al., 2005; von Mutius et al., 2000; Lange, 2000].

Nonostante siano stati eseguiti a livello internazionale numerosi studi nei più differenti ambienti, ancora non sono stati definiti appropriati livelli soglia di esposizione (TLV) universalmente riconosciuti.

Questo è dovuto principalmente al fatto che il LAL test, metodica che permette la quantificazione delle endotossine ed identificata come "gold standard", risente della variabile sensibilità da lotto a lotto dei reagenti LAL per cui i risultati fra vari laboratori possono cambiare sensibilmente.

Attualmente l'American Thoracic Society ha proposto, come valore soglia da non superare, 10 ng·m<sup>-3</sup> per evitare infiammazioni delle vie respiratorie; 100 ng·m<sup>-3</sup> per evitare possibili effetti sistemici; 200 ng·m<sup>-3</sup> per evitare sindromi da polveri tossiche [American Thoracic Society, 1998]. In Europa, una commissione olandese appositamente nominata, ha invece proposto un TLV pari a 4,5 ng·m<sup>-3</sup>/8 ore lavorative [Dutch Expert Committee on Occupational Standards, 1998].

Tali valori dovrebbero perciò servire da linee guida per l'interpretazione del livello di pericolosità di un dato ambiente limitatamente al rischio di inalare endotossine.

Al momento, sul territorio nazionale italiano, non sono stati ancora pubblicati studi che evidenzino la presenza del "pericolo endotossina" nel settore extra-sanitario e, in particolare, negli ambienti lavorativi.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di indagare il livello di esposizione alle endotossine fra gli addetti di diverse attività lavorative, verificando una eventuale correlazione con il parametro Carica Batterica Totale a 36°C che più abitualmente viene ricercato ai fini di una valutazione della qualità microbiologica dell'aria, anziché i batteri psicrofili gram negativi che, sebbene siano i diretti produttori di endotossine, molto raramente vengono valutati negli studi di valutazione del rischio biologico.

## Materiali e metodi

### Attività lavorative coinvolte e punti di campionamento

Le aziende sottoposte a monitoraggio appartenevano ai settori dell'industria cartaria, metalmeccanica, farmaceutica oltre ad attività coinvolte nella raccolta e trattamento dei rifiuti, compostaggio e depurazione di reflui civili e industriali.

I punti di prelievo prescelti sono stati individuati sulla base di questi criteri:

- 1) Presenza di una possibile fonte di bioaerosol contaminato;
- 2) Possibile sosta o intervento degli addetti nel luogo prescelto, o nelle immediate vicinanze, anche non necessariamente in maniera continuativa.

Tutte le indagini sono state svolte in ambienti lavorativi sia indoor che outdoor

### Campionamento dell'aerosol

Ai fini delle indagini microbiologiche, campioni di aria ambiente sono stati prelevati mediante l'impiego del campionatore SAS Super 90 (International PBI) aspirando 1000 litri per postazione di campionamento. Per il prelievo sono state utilizzate piastre rodac riempite con terreno agarizzato Plate Count Agar (PCA-Oxoid). I campioni così raccolti sono stati conservati a +4°C fino al momento della loro analisi.

Per il prelievo di endotossine sono stati utilizzati i campionatori personali SKC AIRCHEK XR500 (Analitica Strumenti) regolati per garantire un flusso in aspirazione di 2 lt·min<sup>-1</sup>. L'aria è stata fatta passare attraverso un filtro in fibra di vetro da 25 mm con porosità di 1 µm (SKC TypeAE Glass Fiber - Analitica Strumenti) preventivamente montato in cassetta d'acciaio (IOM Multi dust stainless steel cassette). Prima del loro impiego filtri e cassette sono state sottoposte ad un ciclo di depirogenizzazione in stufa (250°C per 1 ora). Al termine del campionamento i filtri sono stati raccolti, trasferiti e conservati a -25°C per un periodo di tempo non superiore a 7 giorni.

### Culture batteriche

La superficie agarizzata delle piastre Rodac utilizzate è stata prelevata asepticamente mediante bisturi sterile e dispersa in soluzione diluente sterile (Peptone Water - OXOID) mediante omogeneizzatore a battuta (Stomacher new 400 - SEWARD). Aliquote della sospensione così ottenuta sono state diluite, seminate per inclusione in PCA ed incubate a 36°C per 48 ore.

### Estrazione e analisi delle endotossine

I filtri conservati a -25°C sono stati posti a temperatura ambiente per 1 ora prima di procedere all'estrazione secondo quanto descritto da Douwes et al. [Douwes et al., 1995] con leggere modifiche. In sintesi, i filtri sono stati collocati in provette apirogene in polipropilene, precedentemente testate per la loro capacità di non adsorbire le endotossine, riempite con 10 ml di una soluzione di estrazione costituita da acqua apirogena (LONZA) integrata con lo 0,05% di Tween 20 (SIGMA) precedentemente filtrato con filtri da siringa da 0,2 µm (SARTORIUS). I campioni sono stati quindi sottoposti ad agitazione intermittente per 1 ora a temperatura ambiente mediante l'impiego di vortex (1 minuto a 35 Hz) seguita, fra un ciclo e l'altro, dall'impiego di un agitatore a rulli (CAT RM5 - FISCHER SCIENTIFIC). Alla fine dell'ora i campioni sono stati centrifugati a 1000·g (Centrifuga AE58 - ECDM) e il sovranante raccolto per l'esecuzione delle analisi. Per poter eliminare l'interferenza del Tween, ciascun campione è stato diluito 1:20 con acqua apirogena, con conseguente diminuzione della sensibilità del metodo a 0,01 EU·ml<sup>-1</sup>.

Il contenuto di endotossine di ciascun filtro è stato quindi valutato utilizzando il metodo LAL cinetico cromogenico (Endochrome -K -CHARLES RIVER LABORATORIES) a 37°C con un lettore automatico di micropiastre (ELx808csc - BIO-TEK). Come standard è stata utilizzata l'endotossina estratta da Escherichia coli O55:B5 con una potenza di 10 EU·ng<sup>-1</sup> (Endosafe Control Standard Endotoxin - CHARLES RIVER LABORATORIES). Ciascun campione (100 µl) è stato analizzato in doppio mediante confronto con una curva degli standard con range da 50 a 0,005 EU·ml<sup>-1</sup>. Parallelamente all'analisi di ciascun campione è stato valutato anche il contenuto di endotossine di un filtro di controllo non esposto all'aria ambiente, al fine di valutarne l'eventuale contaminazione (per mancata o insufficiente depiro-

genazione) e/o la cross contaminazione tra filtro-cassetta e l'apparato IOM utilizzato. Infine, utilizzando i volumi di aria campionata, i valori sono stati convertiti in ng·m<sup>-3</sup>.

**Conversione risultati delle endotossine in TLV-TWA/8 ore**

Per poter confrontare i risultati ottenuti per le endotossine aerodisperse con i limiti di esposizione proposti, si è resa necessaria una loro conversione da ng·m<sup>-3</sup> a ng·m<sup>-3</sup>/8 ore mediante la formula matematica

$$\frac{\sum c_i t_i}{\sum t_i} = \frac{c_1 t_1 + c_2 t_2 + \dots + c_n t_n}{8} \quad [1]$$

dove:

c<sub>i</sub> è la concentrazione di esposizione professionale;

t<sub>i</sub> è il corrispondente tempo di esposizione in ore;

Σt<sub>i</sub> è la durata del turno espressa in ore

Per potere applicare questa formula si è quindi reso necessario acquisire informazioni relative alla durata in ore di ciascun turno lavorativo e/o alla permanenza di un addetto nel luogo di campionamento interessato

**Analisi statistica**

Come comunemente avviene per i dati di esposizione, la distribuzione dei livelli di concentrazione è apparsa essere di tipo asimmetrico (log-normale) piuttosto che di tipo normale. Per questo motivo i dati sono stati trasformati nei corrispettivi valori logaritmici prima di procedere alla successiva analisi statistica attraverso il calcolo dei consueti strumenti parametrici descrittivi (media e deviazione standard). La correlazione tra i valori di endotossine e CBT aerodisperse è stata valutata mediante il calcolo del coefficiente di correlazione di Spearman (R) e il corrispettivo p-value per la valutazione della significatività del parametro calcolato. Tutti i calcoli sono stati eseguiti con il software Minitab v. 15.1.1.0 (Minitab Inc.).

**Risultati**

Sono state analizzate 14 attività lavorative appartenenti a settori nei quali si fa un largo uso di matrici acquose o caratterizzate da un elevato contenuto di acqua, raccogliendo e analizzando un totale di 245 campioni, la maggior parte dei quali appartenenti al settore di trattamento rifiuti e/o compostaggio (56%) e la restan-

te ai settore metalmeccanico (29%), trattamento reflui (7%) e attività varie (8%).

La larga maggioranza di tutti i campioni analizzati (199 vs 245) è risultata essere positiva per la presenza di endotossine dimostrando perciò l'ampia diffusione di tale contaminante in questi ambienti di lavoro. Fra quelli analizzati, il settore del trattamento rifiuti/compostaggio ha presentato la maggiore percentuale di positività dei campioni (91%) seguito da quello del trattamento reflui (83%), delle attività varie (70%) e infine metalmeccanico (64%). Come discusso nella parte introduttiva, la concentrazione di endotossine aerodisperse assume un ruolo importante nel valutare la salubrità di un ambiente lavorativo. È stato quindi interessante osservare che l'ampia maggioranza dei campioni positivi (69%) si è collocata al disotto del limite soglia proposto (4,5 ng·m<sup>-3</sup>/8 ore lavorative) e che in questo gruppo la prevalenza dei campioni (73%) non ha superato il valore di 2 ng·m<sup>-3</sup>/8 ore lavorative. I restanti campioni positivi analizzati si sono suddivisi in due gruppi pari all'11% delle positività, per le concentrazioni comprese tra 4,5 e 10 ng·m<sup>-3</sup>/8 ore lavorative, e al 20 % per le concentrazioni superiori ai 10 ng·m<sup>-3</sup>/8 ore lavorative. Andando a valutare come il fenomeno della distribuzione disomogenea dei valori di contaminazione interessi i vari settori lavorativi è stato possibile individuare una differenza fra essi per le classi di contaminazione intermedie (> 4,5 ng·m<sup>-3</sup>/8 ore). Il settore di trattamento dei reflui ha presentato, infatti, la maggioranza dei campioni positivi con una concentrazione superiore a 4,5 ng·m<sup>-3</sup>/8 ore (54%) con addirittura il 47% dei campioni superiori a 10 ng·m<sup>-3</sup>/8 ore. Viceversa le attività cartarie e farmaceutiche (settor "Vari") hanno mostrato la quasi totalità dei valori (93%) al disotto del limite fissato a 4,5 ng·m<sup>-3</sup>/8 ore (tabella 1).

**Tabella 1:** Distribuzione delle varie classi di contaminazione di endotossine nei vari settori lavorativi valutati. I valori sono espressi come percentuale del totale dei campioni positivi prelevati e calcolati sulle otto ore lavorative

Settori esaminati	Classi di contaminazione ng·m <sup>-3</sup> /8 ore				
	0 ÷ 4,5	4,5 ÷ 10	10 ÷ 100	100 ÷ 200	> 200
Metalmeccanico	71	9	20	0	0
Trattamento rifiuti/ compostaggio	64	12	15	1	0
Trattamento reflui	47	7	47	0	0
Vari	93	7	0	0	0

**Tabella 2:** Analisi statistica dei dati complessivamente ottenuti

Settore	CBT (UFC·m <sup>-3</sup> )				Endotossine <sup>b</sup> (ng·m <sup>-3</sup> /8 ore)				Correlazione lineare (log/log)	
	n <sup>a</sup>	M <sup>a</sup>	(SD) <sup>a</sup>	Min-Max <sup>a</sup>	n <sup>a</sup>	M <sup>a</sup>	(SD) <sup>a</sup>	Min-Max <sup>a</sup>	R	p-value
Globale <sup>c</sup>	158	2,69	(±1,11)	<1 - 6,81	158	0,564	(±0,505)	<0,01 - 2,020	0,370	<0,001
Trattamento rifiuti/ compostaggio	88	2,89	(±1,11)	<1 - 6,81	88	0,555	(±0,505)	<0,01 - 2,020	0,389	<0,001
Metalmeccanico	38	2,36	(±0,97)	<1 - 4,72	38	0,689	(±0,529)	<0,01 - 1,769	0,390	0,016
Trattamento reflui	9	2,53	(±0,77)	1,34 - 3,85	9	0,481	(±0,603)	<0,01 - 1,801	0,828	0,006
Vari	8	1,59	(±1,11)	<1 - 3,09	8	0,170	(±0,210)	<0,01 - 0,663	-0,502	0,205

<sup>a</sup>Numero di misurazioni (n), media aritmetica (M), deviazione standard (SD), minimo valore trovato (Min), massimo valore trovato (Max);

<sup>b</sup>valori riferiti ad un TLV-TWA/8 ore

<sup>c</sup>Determinazioni complessivamente fatte in tutti i settori e per le quali sono state ricercate sia la Carica Batterica Totale a 36°C che le endotossine

Parallelamente alla determinazione del valore di endotossine aerodisperse, è stata determinata la contaminazione microbica totale a 36°C (CBT) per verificare se esisteva una correlazione fra i due parametri analitici.

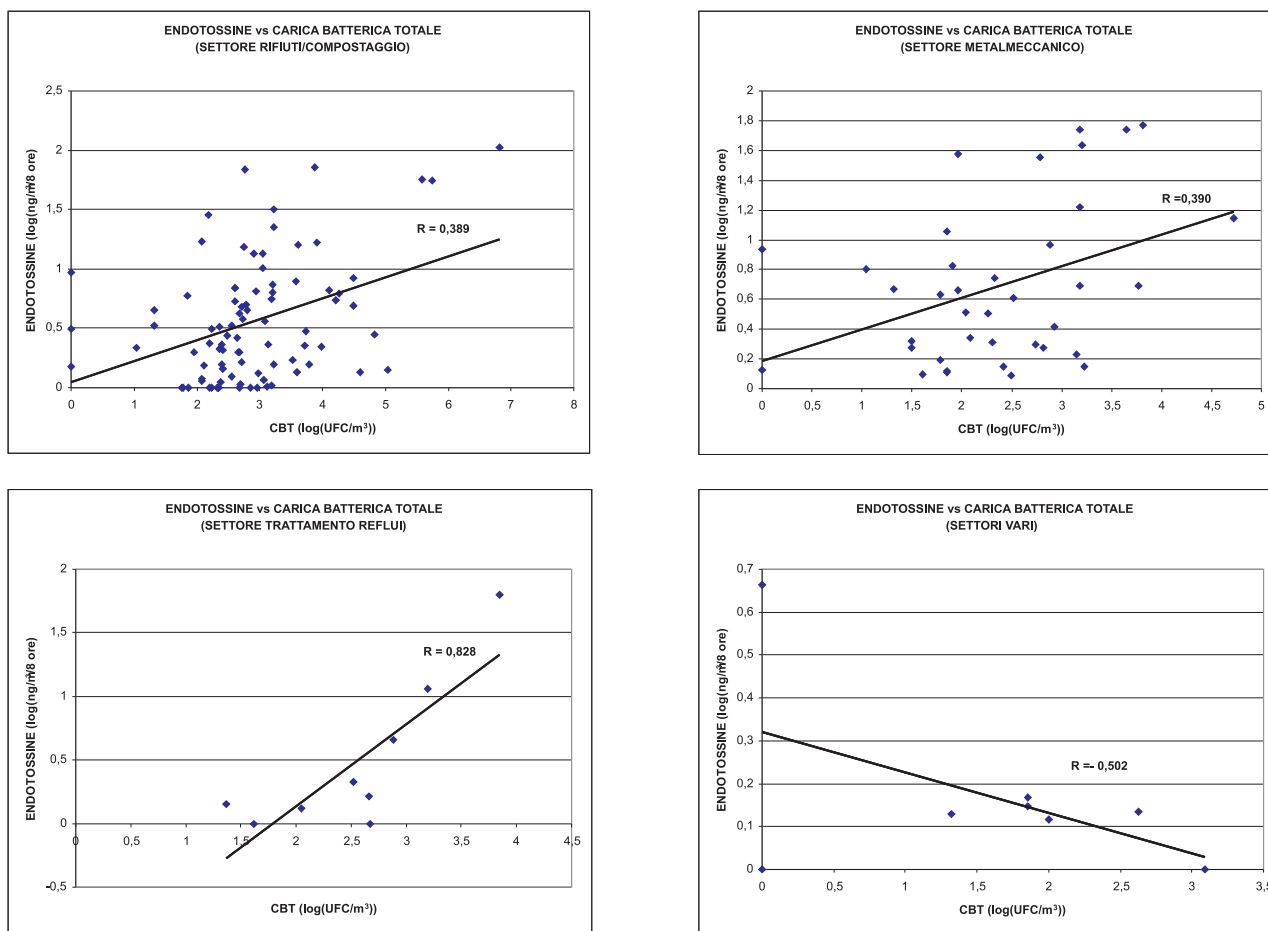
L'analisi dei dati raccolti ha messo in evidenza una distribuzione asimmetrica, con valori di media e mediana molto distanti fra di loro. Si è quindi resa necessaria una loro trasformazione logaritmica che ha consentito di ottenere una distribuzione normale permettendo quindi una loro elaborazione statistica con i tradizionali strumenti parametrici

Il confronto fra i dati così elaborati ha permesso di escludere la presenza di una correlazione lineare fra i due parametri, con un coefficiente R molto basso (0,1369) e un p-value < 0,001 (tabella 2).

Anche analizzando i risultati relativi alle singole attività, permane la mancata linearità fra i parametri, fatta eccezione per il settore trattamento reflui (figura 1).

tate, determinando quindi una prevalenza di batteri gram negativi. La presenza di tali microrganismi porta inevitabilmente alla liberazione di endotossine durante i processi di duplicazione, lisi o morte cellulare. Quando le lavorazioni di tali matrici determinano uno sviluppo di aerosol, questo potrà presentarsi contaminato con endotossine. I dati presentati confermano questa affermazione mostrando un'ampia maggioranza dei campioni analizzati positiva per la presenza di endotossine aerodisperse. Questo dato mette in evidenza come sia necessario prendere in considerazione anche questo fattore qualora si voglia effettuare una valutazione del rischio biologico al quale i lavoratori sono esposti nell'esercizio delle loro mansioni.

I risultati relativi ai vari settori considerati differiscono leggermente fra di loro, evidenziando come le varie attività possano comportare un livello di rischio di esposizione differente. Fra queste, la manipolazione dei rifiuti, solidi (raccolta, stoccaggio e compostaggio) o liquidi (trattamento reflui), si distingue per le



**Figura 1:** Correlazione fra i valori di endotossine aerodisperse e carica batterica totale rilevati nei vari settori lavorativi sottoposti ad indagine. I dati sono espressi in forma logaritmica

## Discussione

Le varie attività sottoposte ad indagine si caratterizzano tutte per il fatto che il materiale utilizzato per le normali mansioni è normalmente contaminato con una flora batterica mista, sia di origine ambientale che antropica, la cui entità varia ampiamente da settore a settore. Il *trait d'union* fra queste diverse tipologie di attività è rappresentato dalla presenza di acqua nelle matrici trat-

alte percentuali di positività. Questo dato può essere collegato all'intensa attività di proliferazione microbica che caratterizza queste matrici dove la contemporanea presenza di acqua e di alte quantità di sostanza organica rappresentano i principali fattori promovenenti.

Nonostante l'ampia presenza di endotossine in tutti i settori valutati, le concentrazioni rilevate sono state comunque prevalentemente ben al di sotto del limite proposto di 4,5 ng·m<sup>-3</sup> calcolato

sulle 8 ore lavorative [Dutch Expert Committee on Occupational Standards, 1998]. La presenza di alcuni campioni con concentrazioni di endotossine superiori al limite indicato, con diversi casi oltre i  $10 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}$ , impone comunque di mantenere alta l'attenzione a questo fattore di rischio biologico finora poco valutato.

Volendo scendere nel dettaglio e discutere dei risultati ottenuti nei singoli settori, confrontandoli con quanto reperibile in letteratura, è importante tenere presente che è possibile che siano state utilizzate diverse procedure di estrazione e analisi per le endotossine oltre all'impiego di reagenti LAL con differenti sensibilità. Questo porta inevitabilmente a rendere più complicato il confronto fra i risultati dei diversi gruppi di ricerca.

Indipendentemente da questo, nel complesso, tutti i settori esaminati sono risultati essere in grado di esporre gli addetti ad un aerosol che, seppur con livelli di concentrazione differenti, è contaminato da endotossine batteriche che possono, nel lungo periodo, portare a fenomeni di sensibilizzazione con manifestazioni croniche principalmente a carico delle vie aeree.

È noto che le emulsioni olio-acqua utilizzate a livello industriale come agente lubrorefrigerante (Metal Working Fluid o MWF), sono sottoposte ad una colonizzazione microbica importante rappresentata principalmente dai batteri gram negativi. Per questo motivo è consuetudine aggiungere alle emulsioni agenti biocidi per cercare di tenere sotto controllo il processo proliferativo [Mattsby-Baltzer et al., 1989]. Diversi studi hanno messo in evidenza che i lavoratori che entrano in contatto con le MWF possono presentare una serie di sintomi che colpiscono per lo più la cute e il sistema respiratorio [Simpson et al., 2003; Lewis et al., 2001] e che alcuni di questi sintomi siano ascrivibili alla presenza di endotossine batteriche all'interno delle emulsioni [DeLorme et al., 2003; Thorne et al., 2002; Thorne and DeKosker, 1996].

I dati raccolti nel presente studio, con una percentuale di campioni contenenti endotossine pari al 64%, sono in linea con quanto riportato in letteratura (54% - 100%) [Lewis et al., 2001]. Fra i vari settori esaminati, quello che prevede l'impiego di MWF presenta la più alta percentuale di campioni con concentrazioni di endotossine inferiori ai  $4,5 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}$  (71%). È comunque da sottolineare come in alcuni casi tale valore sia stato ampiamente superato (20% dei campioni positivi con concentrazioni superiori a  $10 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}$ ) distaccandosi in parte da quanto riportato in precedenti ricerche dove le endotossine aerodisperse oscillavano fra i  $0,15 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}$  e i  $6,7 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}$  [Lewis et al., 2001; Laitinen et al., 2001].

I rifiuti rappresentano una ben nota fonte di inquinamento microbico degli ambienti di lavoro per la massiccia presenza di microrganismi che trovano in essi una fonte di nutrimento. La manipolazione dei rifiuti (raccolta, stoccaggio, cernita, compostaggio) è perciò associata al rischio di inalazione di bioaerosol contaminato che può determinare degli effetti avversi nei soggetti esposti [Douwes et al., 2003]. Le principali sindromatologie descritte interessano principalmente le vie aeree, anche se in alcuni casi sono stati riportati sintomi sistemici simil-influenzali e gastrointestinali [Poulsen et al., 1995; Heldal et al., 2003], raramente l'insorgenza di malattie infettive [Allmers et al., 2000]. La movimentazione più o meno accentuata dei rifiuti, in particolare quelli di natura organica, influenza ampiamente il livello di agenti contaminanti aerodispersi, fra i quali le endotossine risultano essere una frazione molto importante. È stato infatti ampiamente dimostrato che i valori di concentrazione rilevabili cambiano sostanzialmente andando a monitorare attività che comportano una manipolazione dei rifiuti piuttosto che altre che non comportano un loro rimaneggiamento [Wouters et al., 2006].

Nel presente studio il settore del trattamento rifiuti e/o del loro compostaggio è risultato essere quello con la più alta percentuale di positività dei campioni (91%), anche se non si è comunque distinto particolarmente dagli altri indagati per valori di contaminazione eccessiva, fatta eccezione per un campione in cui è stato rilevato un valore superiore a  $100 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}/8\text{ore}$ . Anche in questo caso i valori trovati sono perfettamente sovrapponibili con quelli presentati in precedenti lavori [Heldal et al., 1997; Wouters et al., 2006; Heldal et al., 2003; Nielsen et al., 1997; Clark et al., 1983] dove il range medio di contaminazione era di  $<0,01 \div 101,032$ .

Numerosi studi hanno descritto l'insorgenza di disturbi clinicamente rilevabili fra gli addetti del settore trattamento reflui, ipotizzando una relazione diretta con l'inalazione di bioaerosol contaminato da endotossine [Rylander, 1999; Douwes et al., 2001; Thorn and Kerekes, 2001]. Il trattamento dei reflui determina inevitabilmente una produzione di bioaerosol più o meno intensa in base alle diverse tipologie di depurazione adottate e, di conseguenza, gli addetti sono necessariamente esposti all'inalazione di agenti biologici e loro derivati [Pillai and Rieke, 2002]. Poiché la maggior parte dei batteri presenti in questi ambienti sono Gram-negativi ne consegue che l'inalazione di aerosol contaminato con endotossine sia un'evenienza piuttosto probabile. I diversi studi pubblicati sull'argomento [Oppliger et al., 2005; Prazmo et al., 2003; Visser et al., 2006; Thorn et al., 2002; Spaan et al., 2008] presentano dei risultati estremamente variabili fra di loro, a causa non solo della già citata variabilità intrinseca dei metodi di analisi ma, soprattutto, delle differenti tipologie di ambienti sottoposti ad indagine (es. trattamenti outdoor piuttosto che indoor). Il range medio di contaminazione riportato appare essere  $<0,01 \div 5446,367$  (con valori però ampiamente dispersi fra di loro,  $SD = 13092,13$ ), mettendo in risalto un rischio di esposizione ben superiore rispetto a quanto da noi rilevato. La discrepanza tra i nostri risultati e quelli di letteratura può essere attribuibile sia allo scarso numero di campioni analizzati ( $n=9$ ) sia agli ambienti di lavorazione monitorati che, essendo prevalentemente esterni, sono evidentemente soggetti a fenomeni di diluizione dei contaminanti aerodispersi. In ogni modo è bene sottolineare come, fra tutte le attività monitorate, quella del trattamento reflui è risultata avere la più alta percentuale di campioni oltre il limite indicato di  $4,5 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}/8 \text{ ore}$  (54%) con addirittura il 47% di campioni superiori a  $10 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}/8 \text{ ore}$ .

La mancata correlazione evidenziata tra le endotossine e la CBT ( $r=0,1369$ ,  $p<0,001$ ), è con ogni probabilità dovuta al fatto che l'analisi culturale permette di mettere in evidenza esclusivamente i microrganismi vitali coltivabili. In questa maniera i batteri morti, ma comunque con endotossine bioattive nella loro membrana batterica, non vengono valutati, determinando perciò una sottostima del "potenziale endotossinogenico" della comunità microbica presente nel campione in esame.

La mancata correlazione permane anche analizzando singolarmente i risultati ottenuti in ciascun settore, ad eccezione di quello di trattamento reflui, dove si è potuta osservare una significativa correlazione tra i due parametri ( $r=0,828$ ,  $p=0,006$ ). Questo risultato è probabilmente da imputarsi al fatto che in questa attività la matrice predominante è l'acqua, quindi la CBT aerodispersa è, verosimilmente, da ascrivere per la maggior parte a batteri gram negativi. Negli altri settori indagati è probabile che ci sia una flora mista costituita sia da Gram negativi che Gram positivi che contribuisce perciò alla perdita di correlazione osservata.

Sulla base dei valori guida proposti e sui parametri di una fisiologica attività respiratoria che preveda una frequenza respiratoria

media di 15 atti/minuto con un volume di aria inspirata per ciascun atto pari a 0,5 litri [Guyton and Hall, 2000], è possibile fare alcune considerazioni di carattere puramente teorico che però potrebbero avere anche una certa utilità pratica, potendo aiutare a gestire l'esposizione alle endotossine aerodisperse.

Assumendo come limite massimo di concentrazione il valore di  $4,5 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}$  e come tempo di esposizione a tale concentrazione le consuete otto ore lavorative, si può facilmente calcolare che in un ambiente con tale livello di contaminazione endotossinica, un individuo in condizioni fisiologiche si troverebbe ad inalare ogni ora 2,025 ng di endotossine pari a 16,200 ng nelle 8 ore di turno lavorativo. Quest'ultimo valore si può quindi assumere come il carico massimo tollerabile di endotossine inalate.

Da queste considerazioni si può quindi estrapolare una formula generale [1], di valore puramente indicativo, che permetta di dare un'idea del tempo massimo in minuti ( $t_{max}$ ) che un soggetto adulto sano, in condizioni di respirazione fisiologica ( $F_{resp}$ ), possa sostare continuativamente in un dato ambiente con una determinata concentrazione di endotossine aerodisperse ( $endotox_{amb}$ ), prima di raggiungere la massima quantità inalabile per turno di lavoro (valutata cautelativamente pari al 90% del TLV proposto) [2]:

$$t_{max} = \frac{Max_{in} 1000}{[endotox_{amb}] V_{insp} F_{resp}} = \frac{14580}{[endotox_{amb}] 7,5} = \frac{1944}{[endotox_{amb}]}$$

con  $V_{insp}$  = Volume di aria inspirata/atto in litri

Nel caso in cui però un soggetto si trovi a svolgere diverse mansioni che lo espongono per tempi differenti ( $t_{(turno)}$ ) a concentrazioni ambientali di endotossine aerodisperse differenti, è necessario andare a valutare il contributo di ciascuna attività nel computo complessivo verificando che sia osservata la seguente equazione [3]:

$$\left( \sum t_{(turno)i} [endotox_{amb} i] \right) \left( \frac{V_{insph}}{1000} \right) \leq 14,580$$

con  $V_{insph}$  = Volume di aria inspirata/ora in litri

e con [4]

$$\sum t_{(turno)y} [endotox_{amb} y] = (t_{(turno)1} [endotox_{amb} 1]) + (t_{(turno)2} [endotox_{amb} 2]) + \dots + (t_{(turno)n} [endotox_{amb} n])$$

## Conclusioni

L'esposizione a bioaerosol contaminati con endotossine è un evento strettamente connesso con diverse attività lavorative ma, in ogni caso, misure di controllo dell'esposizione possono essere applicate per ridurre significativamente il livello di esposizione, in particolare negli ambienti confinati. Tali misure possono prevedere la predisposizione di sistemi di aspirazione dell'aerosol da punti particolarmente critici (es. macchine impieganti MWF), efficaci sistemi di ricambio aria dei locali, adeguato sistema di filtrazione e condizionamento degli abitacoli dei mezzi (es. Ruspe, Bulldozer, Ragni utilizzati per la movimentazione dei rifiuti), riduzione dei tempi di permanenza in zone ad alto rischio di esposizione (mediante l'impiego delle formule 2 e 3), adozione di mezzi di protezione individuale delle vie aeree respiratorie (mascherine filtranti con livello di protezione FFP3). L'emergenza di sintomatologie di tipo irritativo/allergico negli addetti deve in ogni modo far pensare alla possibilità che ci si trovi in presenza di una esposizione massiccia alle endotossine e

suggerire l'esecuzione di indagini ambientali mirate a valutarne l'entità ed ad individuare i possibili strumenti di contenimento del rischio. Inoltre, la sola presenza nel ciclo lavorativo di matrici che possono generare aerosol contaminati da endotossine, dovrebbe spingere il medico competente a valutare periodicamente i parametri di funzionalità polmonare (es. FEV1), anche in assenza di sintomi fra la popolazione esposta, al fine di individuare precocemente l'insorgenza di eventuali patologie a carico dell'apparato respiratorio ascrivibili ad una esposizione cronica alle endotossine.

La mancanza di una correlazione tra la carica batterica totale a  $36^{\circ}\text{C}$  e le endotossine indica come necessaria la ricerca diretta di questi agenti biologici al fine di aumentare il livello di conoscenza del rischio biologico connesso alle varie attività lavorative.

In conclusione, ai fini di una maggiore tutela degli addetti, appare auspicabile che questo approccio divenga consuetudinario nelle indagini analitiche eseguite a supporto della valutazione del rischio biologico negli ambienti di lavoro.

## Bibliografia

Allmers H., Huber H., Baur X., 2000. Two year follow-up of garbage collector with allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). *Am. J. Ind. Med.*, **37**, 438-442.

American Thoracic Society, 1998. *Respiratory health hazards in agriculture*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **158** Part2, S1-S76 supplement.

Anderson W.B., Slawson R.M., Mayfield C.I., 2002. *A review of drinking-water-associated endotoxin, including potential routes of human exposure*. *Can. J. Microbiol.*, **48**, 567-587.

Braude, A.I., in *Microbiology*, ed. Davis-Fierer, Toronto, Ont., 1982.

Breum N.O., Würtz H., Midtgaard U., Ebbelhøj N., 1999. *Dustiness and bio-aerosol exposure in sorting recyclable paper*. *Waste Manage. Res.*, **17**, 100-108.

Clark C.S., Rylander R., Larsson L., 1983. *Levels of gram-negative bacteria, Aspergillus fumigatus, dust, and endotoxin at compost plants*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1501-1505.

Davis B.D., Eisen H.N., Ginsberg H.S., Dulbecco R., in *Trattato di Microbiologia*, ed. Piccin, Padova, Italy, 1986.

DeLorme M., Gao X., Doyon-Reale N., 2003. *Inflammatory Effects of Inhaled Endotoxin-Contaminated Metal Working Fluid Aerosols in Rats*. *J. Toxicol. Environ. Health*, **66**, 7-24.

Douwes J., Thorne P., Pearce N., Heederik D., 2003. *Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects*. *Ann. Occup. Hyg.*, **47**, 187-200.

Dutch Expert Committee on Occupational Standards, 1998. *Endotoxins: health based recommended occupational exposure limit*. Rijswijk: Health Council of the Netherlands, pp. 1-79.

Greff-Mirguez G., 2002. *Échantillonnage et analyse des endotoxines dans l'air*. *Cahiers de notes documentaires-Hygiène et sécurité du travail*, **187**, 73-87.

Guyton A.C. and Hall J.E., in *Textbook of Medical Physiology*, Ed. W.B. Saunders Company, 2000.

Heldal K., Eduard W., Bergum M., 1997. *Bioaerosol exposure during handling of source separated household waste*. *Ann. Agric. Environ. Med.*, **4**, 45-51.

Heldal K.K., Halstensen A.S., Thorn J., 2003. *Upper airway inflammation in waste handlers exposed to bioaerosols*. *Occup. Environ. Med.*, **60**, 444-50.

Keleti G., Sykora J.L., 1982. *Production and Properties of Cyanobacterial Endotoxins*. *Appl. Environ. Microb.*, **43**, 104-109.

Lange J.H., 2000. *Reduced cancer rates in agricultural workers: a benefit of environmental and occupational endotoxin exposure*. *Med. Hypotheses*, **55**, 3464-3650.

- Lewis D.M., Janotka E., Whitmer M.P., Bledsoe T.A., 2001. *Detection of microbial antigens in metal working fluids*. Int. Biodeterior. Biodegradation, **47**, 89-94.
- Liu, A. H., 2002. *Endotoxin exposure in allergy and asthma: reconciling a paradox*. J. Allergy Clin. Immunol., **109**, 379-392.
- Mattsby-Baltzer I., Sandin M., Ahlström B., Allenmark S., 1989. *Microbial growth and accumulation in industrial metal-working fluids*. Appl. Environ. Microbiol., **55**, 2681-2689.
- Midtgård U. and Poulsen O.M., 1997. *Occupational safety and health in waste collection and recycling: the core research program*. Ann. Agric. Environ. Med., **4**, 21-26.
- Nielsen E.M., Breum N.O., Nielsen B.H., 1997. *Bioaerosol exposure in waste collection: a comparative study on the significance of collection equipment, type of waste and seasonal variation*. Ann. Occup. Hyg., **41**, 325-344.
- Opplinger A., Hilfiker S., Vu Duc T., 2005. *Influence of seasons and sampling strategy on assessment of bioaerosols in sewage treatment plants in Switzerland*. Ann. Occup. Hyg., **49**, 393-400.
- Park J-H., Spiegelman D.L., Burge H.A., Gold D.R., 2000. *Longitudinal study of dust and airborne endotoxins in the home*. Environ. Health Perspect., **108**, 1023-1028.
- Park J-H., Spiegelman D.L., Gold D.R., Burge H.A., 2001. *Predictors of airborne endotoxin in the home*. Environ. Health Perspect., **109**, 859-864.
- Pillai S.D., Ricke S.C., 2002. *Bioaerosol from municipal and animal wastes: background and contemporary issues*. Can. J. Microbiol., **48**, 681-696.
- Portengen L., Preller L., Tielen M., Doekes G., 2005. *Endotoxin exposure and atopic sensitization in adult pig farmers*. J. Allergy Clin. Immunol., **115**, 797-802.
- Poulsen O.M., Breum N.O., Ebbenhøj N., 1995. *Collection of domestic waste. Review of occupational health problems and their possible causes*. Sci. Total. Environ., **170**, 1-19.
- Prazmo Z., Dutkiewicz J., Skórska C., Sitkowska J., 2003. *Exposure to airborne gram-negative bacteria, dust and endotoxin in paper factories*. Ann. Agric. Environ. Med., **10**, 93-100.
- Rix B.A., Lyng E., 1996. *Industrial Hygiene measurement in a new industry: the repulping and deinking of paper waste*. Am. J. Ind. Med., **30**, 142-147.
- Rylander R., in Organic Dusts: Exposure, Effects and Prevention, ed. Rylander-Jacobs, Boca Raton, Florida, USA, 1994.
- Rylander R., 1999. *Health effects among workers in sewage treatment plants*. Occup. Environ. Med., **56**, 354-357.
- Rylander R., 2002. *Endotoxin in the environment - exposure and effects*. J. Endotox. Res., **8**, 241 - 252.
- Rylander R., Thorn J., Attefors R., 1999. *Airways inflammation among workers in a paper industry*. Eur. Respir. J., **13**, 1151-1157.
- Sigsgaard T., Jensen L.D., Abell A., 2004. *Endotoxins isolated from the air of Danish paper mill and the relation to change in lung function: an 11-year follow-up*. Am. J. Ind. Med., **46**, 327-332.
- Simpson A.T., Stear M., Groves J.A, Piney M., 2003. *Occupational Exposure to Metalworking Fluid Mist and Sump Fluid Contaminants*. Ann. occup. Hyg., **47**, 17-30.
- Singh J, Schwartz D.A., 2005. *Endotoxin and the lung: Insight into the host-environment interaction*. J. Allergy Clin. Immunol., **115**, 330-333.
- Spaan S., Smit L.A.M., Eduard W., 2008. *Endotoxin exposure in sewage treatment workers: investigation of exposure variability and comparison of analytical techniques*. Ann. Agric. Environ. Med., **15**, 251-261.
- Thorn J., Beijer L., Jonsson T., Rylander R., 2002. *Measurement strategies for the determination of airborne bacterial endotoxin in sewage treatment plants*. Ann. Occup. Hyg., **46**, 549-554.
- Thorne P.S., Bartlett K.H., Phipps J., Kulhankova K., 2003. *Evaluation of five protocols for quantification of endotoxin in metalworking fluid aerosol*. Ann. Occup. Hyg., **47**, 31-36.
- Thorne P.S., DeKosker J.A., 1996. *Pulmonary effects of machining fluids in guinea pigs and mice*. Am. Ind. Hyg. Assoc. J., **54**, 1163-1167.
- Visser M.J., Spaan S., Arts H.J.J.M., 2006. *Influence of different cleaning practices on endotoxin exposure at sewage treatment plants*. Ann. Occup. Hyg., **50**, 731-736.
- von Mutius E., Braun-Fahrlander C., Schierl R., Riedler J., 2000. *Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy*. Clin. Exp. Allergy, **30**, 1230-1234.
- Weise G., Drews G., Jann B., 1970. *Identification and analysis of a lipopolysaccharide in cell walls of the blue-green alga Anacystis nidulans*. Arch. Mikrobiol., **71**, 89-98.
- Wouters I.M., Spaan S., Douwes J., 2006. *Overview of Personal Occupational Exposure Levels to Inhalable Dust, Endotoxin,  $\beta(1\rightarrow3)$ -Glucan and Fungal Extracellular Polysaccharides in the Waste Management Chain*. Ann. occup. Hyg., **50**, 39-53.