

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Scienze della Prevenzione

Ciclo XXVIII

[Metodiche non invasive per l'identificazione di indicatori biologici di
effetto precoci in lavoratori a rischio di broncopneumopatie]

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Antonio Mutti

Tutor:

Chiar.mo Prof. Massimo Corradi

Dottoranda: Dr.ssa Federica Tafuro

INDICE

INTRODUZIONE.....	pag 1
TEST DI FUNZIONALITA' RESPIRATORIA.....	pag 3
Valutazione longitudinale della funzione respiratoria	pag 4
BIOMARCATORI IN MATRICI NON INVASIVE.....	pag 5
SCOPO DELLA TESI.....	pag 10
PRIMO STUDIO	
INTRODUZIONE.....	pag 11
Epidemiologia.....	pag 11
Clinica dell'allergia ad animali da laboratorio.....	pag 15
Diagnosi.....	pag 16
SCOPO.....	pag 18
METODI.....	pag 18
Popolazione.....	pag 18
Questionario.....	pag 20
IgE totali e specifiche.....	pag 21
Skin prick test (SPT).....	pag 21
Spirometria.....	pag 21
Frazione esalata di ossido nitrico (FeNO).....	pag 21
Raccolta ed analisi dei biomarcatori nel CAE.....	pag 21
Pneumoproteine sieriche.....	pag 22

Analisi statistica.....	pag 22
RISULTATI.....	pag 23
DISCUSSIONE.....	pag 28

SECONDO STUDIO

INTRODUZIONE.....	pag 38
Silice.....	pag 39
Tossicità.....	pag 40
Patogenesi.....	pag 40
Condizioni associate.....	pag 40
Epidemiologia.....	pag 42
Esposizione professionale.....	pag 42
Misure di prevenzione.....	pag 43
Valore limite di esposizione.....	pag 43
COMPARTO LAVORATIVO ANALIZZATO.....	pag 44
SCOPO.....	pag 45
METODI.....	pag 45
RISULTATI.....	pag 48
DISCUSSIONE.....	pag 58

CONCLUSIONI DELLA TESI.....	pag 62
------------------------------------	---------------

BIBLIOGRAFIA.....	pag 64
--------------------------	---------------

INTRODUZIONE DELLA TESI

La via inalatoria è la più importante fonte di esposizione a sostanze tossiche, irritanti/sensibilizzanti in ambito occupazionale. Le broncopneumopatie work-related sono riscontrate in molti settori, costituendo, secondo una recente stima della OMS, circa il 60% di tutte le malattie e il 70% delle cause di mortalità tra le patologie professionali (1).

Le bronco-pneumopatie professionali più comuni, causate dall'esposizione professionale a polveri, fumi, tossine e agenti biologici, includono patologie delle vie aeree, come asma professionale, bronco-pneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), bissinosi e bronchiolite costrittiva e malattie polmonari interstiziali, come ad esempio le pneumoconiosi [asbestosi, silicosi, pneumoconiosi dei lavoratori del carbone (Coal Workers Pneumoconiosis), malattia cronica da berillio, pneumoconiosi da metalli duri] e polmoniti da ipersensibilità. Altre categorie sono tumori (cancro del polmone e mesotelioma maligno), sindromi da inalazione acuta di tossici, e patologie asbesto-correlate non legate all'amianto.

L'approccio migliore per identificare le bronco-pneumopatie professionali è una corretta e completa anamnesi occupazionale ed ambientale che permetta di stabilire il nesso causale tra patologia ed esposizione. La diagnosi di bronco-pneumopatia occupazionale è la sintesi del quadro clinico compresi segni e sintomi, riscontri fisiologici, radiografici e patologici, e la storia naturale compresa la latenza e la storia di esposizione ad un agente chimico/fisico/biologico.

Ogni tratto del sistema respiratorio può essere interessato da patologie work-related dal tratto nasale al parenchima polmonare. Le vie aeree dalle narici agli alveoli vengono in contatto con 14.000 L di aria nell'ambiente di lavoro durante una settimana lavorativa di 40h. L'attività fisica aumenta la ventilazione, e quindi l'esposizione ai contaminanti, almeno 12 volte rispetto al valore di riposo (2). La tipologia di sostanze in causa ed i meccanismi patogenetici sono i più svariati. Compito del medico del lavoro attraverso la sorveglianza sanitaria e la partecipazione al processo di valutazione dei rischi è quello di evidenziare precocemente situazioni di aumentato rischio per prevenire le fasi conclamate di malattie work-related.

La sorveglianza sanitaria, nell'ambito delle definizioni di legge (ex art 2 comma m DLgs 81/2008 e smi) è considerata come l'insieme degli atti medici, finalizzati alla tutela dello stato di salute e sicurezza dei lavoratori, in relazione all'ambiente di lavoro, ai fattori di rischio professionali e alle modalità di svolgimento dell'attività lavorativa. Essa rientra nella più ampia collaborazione del medico competente con il datore di lavoro e con il Servizio di Prevenzione e Protezione, sulla base della sua specifica conoscenza dell'organizzazione dell'azienda e delle situazioni di rischio, che

richiede la sua partecipazione alla predisposizione delle misure per la tutela della salute e dell'integrità psico-fisica dei lavoratori. Secondo l'ILO una adeguata sorveglianza sanitaria deve rispettare i principi della necessità (applicazione solo in presenza di rischi per la salute), attinenza, validità scientifica ed efficacia. Il medico del lavoro competente è particolarmente tenuto all'osservanza di questi due ultimi principi sia dal Codice ICOH (punto 12) sia dal Codice di Deontologia Medica (art. 5). I principi su cui dovrebbe basarsi la sorveglianza sanitaria sono finalizzati, secondo l'ILO, al raggiungimento degli scopi principali di tale attività di prevenzione ovvero alla identificazione dei più precoci effetti sulla salute dei lavoratori che potrebbero comparire nonostante gli adeguati interventi di prevenzione primaria.(3)

TEST DI FUNZIONALITA' RESPIRATORIA

L'uso di metodiche per la diagnosi precoce è sempre più utile dal punto di vista di una gestione integrata di salute, sicurezza e produttività negli ambienti di lavoro (4,5). In Italia, così come a livello internazionale, il monitoraggio spirometrico periodico rappresenta un cardine dei programmi di sorveglianza sanitaria per i lavoratori esposti a fattori di rischio respiratorio, giocando un ruolo cruciale nella prevenzione e nella diagnosi di patologie polmonari lavoro correlate (6). In ambito occupazionale la spirometria è eseguita periodicamente per monitorare il livello e le variazioni nel tempo della funzione polmonare, per prevenire un peggioramento attribuibile all'esposizione lavorativa, per stabilire e mantenere la compliance dei lavoratori nell'indossare i dispositivi di protezione individuale, o semplicemente per mantenere uno stato di salute generale dei lavoratori (7,8). La spirometria, in effetti, si è ampiamente diffusa nei programmi di sorveglianza sanitaria dei lavoratori esposti a fattori di rischio respiratorio (9) poiché è un metodo semplice e non invasivo per la misurazione del flusso e del volume di aria espirata (10). In ambito clinico, la spirometria consente di porre diagnosi di deficit ventilatori di tipo ostruttivo e può essere utile nel sospettare un deficit restrittivo o misto, sebbene per una corretta definizione di tali pattern sia necessaria la determinazione dei volumi polmonari statici tramite il metodo di diluizione dell'elio in circuito chiuso o il metodo della pletismografia corporea totale. La spirometria è un esame che può essere eseguito in diversi ambienti (ambulatori di fisiopatologia respiratoria o direttamente in azienda) e con diversi tipi di strumentazione, ma a livello di medicina del lavoro si è diffuso l'uso di strumenti portatili. L'American College of Occupational and Environmental Medicine (ACOEM) ha prodotto alcuni documenti nell'ultimo decennio, di cui l'ultimo nel 2011 (7), per fornire informazioni utili a tutti gli utilizzatori di spirometri. In particolare, sono citate la standardizzazione dell'American Thoracic Society (ATS) e dell'European Respiratory Society (ERS) sull'esecuzione e sulla interpretazione dei test di funzione polmonare (11,12), la pubblicazione delle norme ISO 26782

sulle caratteristiche tecnico-operative degli spirometri, i dati sull'interpretazione longitudinale della funzione polmonare e sull'impatto degli errori causati da un uso improprio degli spirometri a flusso. L'esecuzione corretta della manovra spirometrica non può prescindere dall'utilizzo di una strumentazione calibrata, da un adeguato training dell'operatore e da un'adeguata compliance del paziente. In ambito occupazionale, una corretta interpretazione dei dati spirometrici consente di identificare con maggiore confidenza e precocemente le modificazioni funzionali attribuibili all'esposizione lavorativa e non può prescindere dall'adeguata esecuzione della manovra e dalla scelta consapevole dei teorici di riferimento e dei criteri interpretativi. In particolare, l'operatore deve ricordare che:

1. La spirometria è ritenuta valida se le curve volume-tempo e flusso-volume, ottenute durante una manovra forzata, sono accettabili e ripetibili tra loro nella stessa sessione d'esame.
2. La valutazione trasversale consiste nel confrontare i risultati del lavoratore con quelli di una popolazione standard di riferimento sulla base dei dati antropometrici, del genere e dell'etnia. Nel referto è utile indicare il set di teorici prescelto, che dovrebbe essere il più aderente possibile alla popolazione oggetto di studio. Attualmente gli standard in uso in Italia variano molto a seconda delle disponibilità nei software in dotazione. Possono essere presenti i CECA 1971, gli ECCS1983/ERS1993, i NHANES III. Sono infine disponibili ed implementabili nei software i nuovi GLI-2012, comparsi in letteratura recentemente ed ottenuti con metodi statistici più idonei. Tali standard sembrano risolvere il problema dell'aggiustamento dei teorici per l'etnia e dell'estrapolazione oltre i parametri antropometrici e l'età del set specifico in uso, oltre che avere una migliore capacità predittiva del deficit ostruttivo.
3. È consigliabile, ribadendo quanto espresso da ATS/ERS ed ACOEM, utilizzare l'algoritmo diagnostico sequenziale sui parametri VEMS/CV (FEV_1/VC), VEMS (FEV_1) e CV (VC) che se inferiori ai LIN permettono di distinguere patologie ostruttive e non ostruttive. L'applicazione del cut-off fisso a 0,70, promosso dalle linee guida GOLD per identificare i deficit ostruttivi, seppur semplice, porta ad una sottostima nei soggetti più giovani ed una sovrastima in quelli più anziani, e pertanto il suo uso è sconsigliato. Per la corretta interpretazione del deficit ostruttivo è consigliabile usare il rapporto VEMS/CV (FEV_1/VC) con CV ottenuta da una manovra lenta inspiratoria (definibile come indice di Tiffeneau). Un deficit ostruttivo da un punto di vista funzionale viene identificato in presenza di un rapporto $FEV_1/VC < LLN$ e $FEV_1 < LLN$. Il riscontro di $FEV_1/VC < LLN$ ma con FEV_1 nella norma per soggetti esposti a sostanze tossiche ed irritanti dovrebbe indurre ad approfondimenti nel sospetto di patologia ostruttiva. Per stadiare la gravità dell'ostruzione è consigliabile utilizzare come parametro lo z-score del VEMS.

Valutazione longitudinale della funzione respiratoria

In ambito occupazionale, la valutazione trasversale ha lo scopo di identificare soggetti potenzialmente ipersuscettibili di un aggravamento delle condizioni cliniche se esposti a fattori di rischio respiratorio. Di contro, la valutazione longitudinale assume valore epidemiologico e realmente preventivo in quanto recentemente è stato dimostrato che, oltre alla riduzione del VEMS rispetto al valore predetto **(13-18)**, anche un suo accelerato ed eccessivo declino nel tempo è associato ad un aumentato rischio di morbilità e mortalità per BPCO, patologia cardiovascolare e altre cause. La valutazione longitudinale, se effettuata su test seriati qualitativamente ben condotti **(19)**, può rivelare un deterioramento funzionale prima di una singola valutazione trasversale soprattutto in lavoratori con livelli basali di funzionalità polmonare superiori ai LIN **(20)**. La diagnosi precoce di un accelerato declino della funzione polmonare può essere considerata un'opportunità per consigliare al singolo paziente degli approfondimenti diagnostici. Inoltre, un eccessivo declino longitudinale può portare a considerare interventi di prevenzione sul singolo (ad es. cambiamenti dello stile di vita) e nell'ambiente di lavoro (ad es. l'avvio di un'adeguata protezione delle vie respiratorie, o l'identificazione di nuove esposizioni pericolose). Il VEMS è il parametro più affidabile per effettuare i confronti longitudinali sia nei soggetti sani che nei soggetti con patologie croniche ostruttive. Il parametro CVF viene usato in genere come indicatore per le valutazioni longitudinali in soggetti con pattern restrittivo **(21)**. Spesso nella pratica clinica viene definito come eccessivo un calo osservato tra due misurazioni del VEMS o della CVF superiore a un certo valore critico (90 ml/annuo) **(22)**. Questo metodo di valutazione presenta dei limiti durante i primi (da 1 a 8) anni di follow-up, quando i dati sono scarsi, in quanto non tiene conto dell'intrinseca variabilità longitudinale del VEMS, che in popolazioni di lavoratori sani è principalmente legata alla fluttuazione biologica della funzione polmonare e alla qualità dei test spirometrici **(23)**. Dal 1991, l'ATS raccomanda di considerare clinicamente significativa una riduzione annua superiore al 15% in valore assoluto (e non predetto), in modo da escludere che "i cambiamenti nella funzione polmonare" siano dovuti alla variabilità nella misurazione **(21)**. Tuttavia, il cut-off fisso del 15% non garantisce la precisione dei dati e non risulta sensibile nel rilevare eventuali effetti avversi acuti in situazioni lavorative in cui è stato osservato un calo eccessivo in un breve periodo di tempo **(20,24)**. I ricercatori del NIOSH hanno, pertanto, proposto e sviluppato un software scaricabile da tutti gratuitamente, chiamato SPIROLA, per diffondere la pratica della valutazione longitudinale e per determinare il limite inferiore longitudinale di declino (LLD - Limit of Longitudinal Decline) **(25)**. Tale programma è stato sviluppato come uno strumento visivo e analitico per aiutare i professionisti a determinare le potenziali fonti di variabilità (ad esempio errori procedurali) e riconoscere quando è necessario un'intervento per migliorare la

qualità e precisione longitudinale dei dati (26). Inoltre, consente di confrontare i dati longitudinali (almeno 4 dati seriat) sia con il limite fisso del 15% ACOEM (19) che con il limite LLD suggerito dal NIOSH che considera un limite annuale di declino del 10% con un livello fisso di variazione intra-individuale del 4 % . Poiché la BPCO è una malattia prevenibile che si instaura nel corso di molti anni, il riconoscimento precoce di un eccessivo declino della funzione polmonare, seguito da un intervento efficace, è un importante strumento di prevenzione secondaria (27). Al momento attuale, appare appropriata la raccomandazione del NIOSH relativa alla valutazione longitudinale della funzione polmonare: “un decremento del FEV₁ tra il 10% e il 15% (a seconda della qualità della spirometria) rispetto al basale dovrebbe condurre ad ulteriori valutazioni mediche (28).

BIOMARCATORI PRECOCI IN MATRICI NON INVASIVE

Il concetto che l'infiammazione è implicata nell'iper-reattività bronchiale, nelle alterazioni del flusso d'aria ed iper secrezione di muco di malattie polmonari croniche, in particolare asma e bronco-pneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), ha portato alla ricerca di biomarcatori di infiammazione responsabili della cascata di eventi che collegano lo stimolo iniziale alle anomalie finali (29-30). La ricerca moderna in ambito di patologie polmonari work-related è volta a identificare e quantificare biomarcatori rappresentativi di un evento o di alterate condizioni nelle vie aeree, dando una misura dell'esposizione, dell'effetto o di suscettibilità. Le matrici utilizzate in ambito di ricerca negli ultimi decenni sono meno invasive rispetto al campionamento di liquido di lavaggio broncoalveolare (BAL) e lo sputo indotto. Nello specifico l'analisi dell'aria esalata, il campionamento del condensato dell'aria esalata (EBC) e la ricerca di marcatori di infiammazione sierici ed urinari sono uno spunto promettente da introdurre anche nell'ambito occupazionale (31), sebbene al momento attuale non sempre sia possibile ottenere un biomarcatore con buona specificità per le patologie polmonari né esiste un biomarcatore sistemico che possa sufficientemente riflettere i sottostanti processi polmonari. Il biomarcatore ideale dovrebbe avere le seguenti caratteristiche (32): identificare in fase precoce e possibilmente in modo non invasivo la patologia in fase di screening o all'esordio del primo sintomo; essere correlabile all'esposizione occupazionale. Altri biomarcatori possono essere utilizzabili per seguire l'andamento nel tempo e la risposta terapeutica.

L'analisi dell'aria esalata ha un enorme potenziale dal punto di vista della ricerca scientifica e della pratica clinica, poiché è un esame di facile esecuzione e poco invasivo per il monitoraggio dell'infiammazione nelle vie aeree (33). L'analisi dell'aria esalata può essere effettuata sia tramite metodica online, il cui esito è immediatamente disponibile, che offline, mediante la raccolta e lo stoccaggio del campione. Solitamente viene utilizzata la metodica online per la misura della

frazione di monossido di azoto nell'aria esalata (FeNO), semplicemente facendo respirare il paziente in un boccaglio direttamente collegato allo strumento di misurazione. NO è un importante vasodilatatore, broncodilatatore, neurotrasmettitore e mediatore dell'infiammazione a livello delle vie respiratorie, dove è prodotto sia dalle cellule in condizioni fisiologiche che dalle cellule infiammatorie; viene sintetizzato ad opera delle ossido nitrico sintetasi (NOS) a partire dalla L-arginina, un aminoacido essenziale. NO ha una breve emivita in vivo, poiché reagisce con l'emoglobina e con altre molecole tra cui i radicali dell'ossigeno e alcuni metalli di transizione. L'attività dell'enzima NOS, che è presente in tre isoforme (nNOS neuronale, eNOS endoteliale ed iNOS inducibile), viene stimolata da alcune citochine proinfiammatorie, come TNF- α , INF- γ e IL-1 β . Oltre a svolgere un'importante azione vasodilatatoria e broncodilatatoria, a livello dell'albero respiratorio l'NO agisce stimolando la clearance ciliare e impedendo la replicazione virale; inoltre, attraverso la formazione di specie reattive dell'azoto (RNS), interviene nei meccanismi di difesa contro la crescita tumorale e contro i microrganismi esogeni, tra cui anche il *Mycobacterium tuberculosis*, tuttavia questi meccanismi contribuiscono all'aumento dello stress ossidativo. Infatti è noto che le specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto, attraverso il danneggiamento del DNA, dei lipidi e delle proteine promuovono un persistente stato infiammatorio, giocando un importante ruolo nella patogenesi di diverse patologie polmonari. L'analisi dei livelli di NO presenti nell'aria esalata è una metodica validata e standardizzata per la diagnosi di infiammazione delle vie aeree, iperreattività bronchiale e asma. I livelli di NO nell'aria esalata dipendono dalla produzione di diverse cellule nelle vie aeree e nel parenchima polmonare, dalla diffusione alveolo capillare e dalla ventilazione alveolare (34). Diversi studi hanno dimostrato che sia nei pazienti affetti da bronchite asmatica che nei soggetti asintomatici i livelli di FeNO risultano essere maggiori negli atopici rispetto ai non atopici. E' stato dimostrato che i livelli di FeNO sono un buon indicatore della gravità della patologia asmatica e sono utili nel monitorare la risposta alla terapia steroidea, soprattutto nei bambini. Un recente studio condotto sulla popolazione indiana ha confrontato i valori di FeNO e di NO nasale (nNO) in 4 gruppi di persone: soggetti affetti da asma bronchiale (BA), rinite allergica (AR), asma + rinite allergica (BA-AR) e controlli sani. I livelli di FeNO erano significativamente più alti nei gruppi BA e BA-AR, i livelli di nNO erano maggiori nei gruppi AR e BA-AR, e, all'interno dello stesso gruppo di appartenenza, i soggetti atopici mostravano 22 valori di FeNO più elevati; tuttavia quest'ultima differenza non è stata rilevata nel gruppo dei controlli sani. Inoltre è stata dimostrata una correlazione significativa tra valori di FeNO e numero di prick test positivi nei pazienti del gruppo BA-AR. Questi dati supportano l'ipotesi che negli atopici esista uno stato infiammatorio subclinico delle basse vie aeree che possa predisporre allo sviluppo dell'asma bronchiale. Pertanto potrebbe risultare estremamente importante il ruolo di questa

metodica diagnostica per la medicina occupazionale, non tanto per porre una diagnosi certa di malattia, ma piuttosto per far emergere quei soggetti ancora asintomatici ma con maggiore suscettibilità allo sviluppo della patologia polmonare (35). Modena e colleghi, attraverso l'identificazione di più di 500 geni la cui espressione correla con i valori di FeNO, hanno portato alla luce l'esistenza di cinque diversi clusters fenotipici di asma, che potrebbero spiegare nuove vie patogenetiche per lo sviluppo della malattia e potrebbero contribuire alla diagnosi precoce e alla scoperta di nuovi target terapeutici (36).

La raccolta del condensato dell'aria esalata (exhaled breath condensate, EBC) è un'ulteriore tecnica non invasiva per studiare i processi infiammatori delle vie aeree. Nell'EBC sono stati evidenziati diversi composti chimici, sia volatili che non, come proteine, lipidi, ossidanti e nucleotidi. La tecnica di raccolta è piuttosto semplice e consiste nel far respirare per circa 15 minuti il paziente a volume corrente attraverso un boccaglio sterile dotato di una doppia valvola per la separazione dei flussi inspiratorio ed espiratorio direttamente collegato allo strumento (che di fatto è un condensatore che mantiene la temperatura costante a -5°C); in questo modo è possibile raccogliere circa 3-4 ml di condensato dell'aria esalata e stoccarlo a -80°C per poi essere analizzato in un secondo momento. In questo modo parte delle sostanze non volatili presenti nel lining delle vie aeree possono essere catturate nel vapore acqueo emesso con l'espirazione, che, attraverso il fenomeno fisico della condensazione, a contatto con una superficie esterna fredda si trasforma da fase aeriforme a fase liquida. È stato dimostrato che la concentrazione di alcune sostanze tossiche escrete nell'EBC, come ad esempio alcuni metalli, è ben correlata alla concentrazione urinaria e a marcatori di danno polmonare, essendo in tal modo una valida matrice biologica su cui effettuare un efficace monitoraggio biologico dei lavoratori esposti. L'analisi del condensato dell'aria esalata può essere utilizzata per quantificare il grado di infiammazione e di stress ossidativo delle vie aeree, non solo nell'asma e nella BPCO ma anche nella fibrosi cistica e nelle interstiziopatie, e per il monitoraggio della terapia (37). Uno dei più importanti sistemi antiossidanti endogeni è basato sui tioli, di cui il glutatione è il predominante a livello polmonare; i metaboliti dell'NO interagiscono con i gruppi tiolici dei tioli producendo S-nitrosotioli, che sono stati rilevati in concentrazioni elevate nel condensato dell'aria esalata di persone affette da infiammazione delle vie aeree, motivando in tal modo l'elevato grado di stress nitrosativo presente (38). Concentrazioni elevate di leucotrieni, 8-isoprostano e perossido di idrogeno (H_2O_2), nitriti e 3-nitrotirosina sono stati rilevate nell'EBC di soggetti asmatici o affetti da altre broncopneumopatie (33). Un altro parametro utile per studiare il livello di infiammazione delle vie aeree è il pH dell'EBC che esprime il grado di acidificazione di tale matrice, che risulta infatti ridotto nei soggetti con asma, BPCO, bronchiectasie e danno polmonare acuto (39). A livello polmonare le cellule infiammatorie attivate, soprattutto

eosinofili ma anche macrofagi e neutrofilo generano diverse specie reattive dell'ossigeno provocando un danno alle cellule epiteliali e aumentando l'iperreattività bronchiale. L'anione superossido (O_2^-) viene rapidamente metabolizzato dalla superossido dismutasi in perossido di idrogeno (H_2O_2) che tende ad evaporare nell'aria esalata. Pertanto H_2O_2 nell'esalato è un marcatore biologico di stress ossidativo polmonare ed, inoltre, si accumula maggiormente nelle vie respiratorie poiché la catalasi, enzima deputato alla sua rimozione, è ivi presente in concentrazioni minori (40).

Nel surfactante, sostanza tensioattiva prodotta dagli pneumociti di tipo II con la funzione di impedire il collasso delle vie aeree durante l'espiazione, sono presenti diverse proteine, dette pneumoproteine associate al surfactante (surfactant protein, SP), di cui tre sono presenti anche nel siero (SP-A, SP-B e SP-D) mentre una (SP-C) è stata rilevata solo a livello polmonare. Diversi studi hanno dimostrato che la loro concentrazione sierica è alterata nei soggetti affetti da patologie polmonari oppure nei soggetti esposti professionalmente a sostanze tossiche per l'apparato respiratorio; questo dato è supportato dal fatto che in corso di flogosi vi è un'alterazione dell'epitelio polmonare che diventa maggiormente permeabile e facilita il passaggio di queste proteine attraverso la barriera alveolo-capillare nel torrente ematico. Deb e colleghi hanno dimostrato che SP-A e SP-D sono implicate nella risposta allergica a diversi inalanti; infatti, esse competono con alcuni allergeni volatili per le IgE, inibendo la degranolazione dei mastociti e la conseguente reazione allergica (41). Questa scoperta ha rappresentato un nuovo approccio metodologico per la valutazione dell'integrità dell'epitelio bronchiale in corso di diverse pneumopatie. SP-A è la proteina associata al surfactante maggiormente rappresentata, costituendo fino al 50% del pool proteico presente nel surfactante, e con il peso molecolare maggiore; è presente negli pneumociti di II tipo, nelle cellule di Clara e nei macrofagi alveolari, tuttavia può essere secreta in piccole quantità anche a livello intestinale, nella prostata e nel mesentero. La regolazione della concentrazione alveolare di surfactante e la promozione della fagocitosi spiegano l'importanza di SP-A per i meccanismi di difesa polmonari. I valori fisiologici della concentrazione di SP-A nel BAL sono circa 0.18-0.7 mg/ml, mentre nel siero sono compresi tra 20 e 200 ng/mL. Livelli ridotti di SP-A sono stati documentati nel fluido di lavaggio broncoalveolare (BAL) di pazienti con ARDS, con lesioni traumatiche polmonari o sottoposti a radiazioni toraciche ad alte dosi e in diverse interstiziopatie; livelli aumentati sono stati rilevati in pazienti HIV positivi affetti da TBC e polmonite da *Pneumocystis carinii*, in pazienti con fibrosi cistica in presenza di infezioni polmonari e in pazienti affetti da sarcoidosi, asbestosi e polmonite da ipersensibilità. Cheng e colleghi hanno riportato un aumento significativo della concentrazione di SP-A e SPD nel BAL di soggetti asmatici, mentre Erpenbeck ha mostrato risultati opposti (42,43). SP-B, pneumoproteina presente in minor quantità rispetto alle altre, è sintetizzata dagli pneumociti di tipo II e dalle cellule

di Clara; non sembra essere coinvolta nei meccanismi di immunomodulazione ma riduce la tensione sulla superficie alveolare. Vi sono scarse evidenze scientifiche che l'alterazione di SP-B possa essere correlata a diverse patologie polmonari. Valori della concentrazione di SP-B nel BAL ritenuti nella norma sono compresi tra 0.07 e 0.14 mg/ml, mentre nel siero variano da 1.7 a 60 ng/mL. Anche SP-D è prodotta dagli pneumociti di tipo II e dalle cellule di Clara, tuttavia, anche se il polmone è il principale sito di sintesi, essa è presente in modo ubiquitario; sembra che intervenga nella difesa dai microrganismi esterni comportandosi come un'opsonina. Un recente studio condotto in vivo su topi ha mostrato che SP-D riveste un ruolo protettivo verso lo sviluppo di diatesi allergiche attraverso l'inibizione dell'interazione antigene-IgE, della produzione di IgE specifiche e del rilascio di istamina da parte delle cellule sensibilizzate; inoltre, SP-D provoca uno shift della risposta immunitaria da Th-2 a Th-1. I topi con deficit genico di SP-D mostrano un fenotipo caratterizzato dalla sovraespressione di IL-13, citochina coinvolta nello sviluppo dell'asma allergico, che, insieme ad IL-4, stimola la produzione di SP-D; tuttavia l'esposizione ad allergeni volatili esercita un feedback negativo su questo meccanismo, stimolando la produzione di IL-13 e IL-4 (44). La concentrazione di SP-D nel BAL ha un range compreso tra 0.14 e 0.28 mg/ml, mentre nel siero è di circa 60 ng/mL. Ridotti livelli della concentrazione di SP-D sono stati riportati nel BAL di soggetti fumatori, mentre concentrazioni aumentate sono state osservate negli animali con infiammazione polmonare indotta da esposizione a silice, LPS e infezione da *Pneumocystis carinii*. Koopmans e colleghi hanno studiato 50 pazienti allergici concludendo che la loro concentrazione sierica di SP-D era significativamente più elevata rispetto ai controlli sani e che rappresentava un ottimo indicatore del grado di infiammazione bronchiale (45). CC16 è una pneumoproteina essenzialmente localizzata sulle cellule di Clara nei bronchioli terminali, ma presente anche nell'epitelio tracheobronchiale, nel tratto urogenitale e nella prostata. La sua funzione è ancora poco chiara, ma sembra giocare un ruolo importante come immunosoppressore e antinfiammatorio a livello polmonare, inibendo sia l'attività della fosfolipasi A2 che la produzione di IFN- γ . Strutturalmente presenta una cavità centrale idrofobica che permette di sequestrare xenobiotici o sostanze dannose depositate a livello del tratto respiratorio. La concentrazione sierica di CC16 è compresa tra 5 e 50 ng/mL. Alcuni studi hanno dimostrato una concentrazione ridotta di CC16 sia nel BAL che nel siero di soggetti fumatori e di pazienti affetti da tumore del polmone e BPCO; livelli sierici ridotti sono stati osservati sia in soggetti affetti da asma che da rinite allergica (46). Al contrario la concentrazione di CC16 nel BAL sembra essere aumentata nei lavoratori esposti ad asbesto (47).

SCOPO DELLA TESI

In questo lavoro di tesi vengono proposti due approcci con la finalità di evidenziare in ambito di sorveglianza sanitaria modificazioni precoci prima delle fasi conclamate di broncopneumopatie work-related. In un primo lavoro verranno analizzati biomarcatori non invasivi in matrici quali siero e aria esalata per la sorveglianza sanitaria delle allergopatie respiratorie (rinite ed asma). In un secondo studio verrà invece valutata l'efficacia della valutazione trasversale e longitudinale dei parametri di funzionalità respiratoria nell'evidenziare patologie conclamate (pattern ostruttivi/restrittivi) o condizioni meritevoli di approfondimenti quali l'eccessivo decremento longitudinale del FEV₁ in una popolazione di soggetti a rischio per esposizione a silice libera cristallina (in assenza di segni radiografici evidenti di silicosi polmonare).

PRIMO STUDIO

INTRODUZIONE

L'allergia ad animali da laboratorio (LAA) è una patologia occupazionale che colpisce prevalentemente individui suscettibili esposti in ambiente di lavoro ad antigeni animali ad alto peso molecolare, presenti soprattutto in urina, pelo, forfora e saliva. Tale patologia è caratterizzata dalla presenza di immunoglobuline di tipo E (IgE) specifiche dirette contro alcune proteine animali **(48)**. La via di esposizione principale per lo sviluppo di tale patologia è quella inalatoria, seguono con minore frequenza il contatto diretto con la cute e con gli occhi e per ultima la via percutanea (ad esempio attraverso il morso dell'animale oppure la puntura con ago) **(49)**. La maggior parte degli allergeni animali ha un diametro inferiore a 5 micron, pertanto si colloca nella frazione delle particelle respirabili e perciò viene depositata nel tratto respiratorio più distale; inoltre queste particelle rimangono nell'aria ambiente per un lungo periodo di tempo. Queste peculiarità, insieme alla suscettibilità individuale, contribuiscono all'insorgenza dell'allergopatia. Poiché nel mondo ci sono circa due milioni di individui esposti per motivi professionali ad animali da laboratorio e di questi quasi la metà sviluppa sintomi correlabili alla mansione svolta, l'impatto socio-sanitario risulta essere piuttosto pesante **(50)**.

Epidemiologia

Negli Stati Uniti il NIOSH (National Institute of Occupational Safety and Health) ha riconosciuto formalmente la LAA come rischio occupazionale nel 1989. A partire dal 1950, anno in cui è stato riportato il primo caso di allergia ad animali da laboratorio, numerosi sono stati gli studi epidemiologici che hanno cercato di stimare la prevalenza di tale patologia **(51)**. Il range di prevalenza della LAA è compreso tra l'11% e il 44%, con un'incidenza tra il 9% e il 30% **(52, 53)**. L'asma causato da LAA ha una prevalenza che varia dal 4% al 22% negli addetti ad animali da laboratorio e si può sviluppare nel 20-30% dei lavoratori sensibilizzati **(54-56)**. Dei soggetti sintomatici più del 10% sviluppa asma che persiste anche dopo la cessazione dell'esposizione lavorativa **(50)**. La variabilità nei dati di incidenza e prevalenza è motivata dalla non univoca definizione del concetto di LAA; infatti per alcuni studi si intende la sola comparsa di sintomi allergici, per altri si definisce la presenza di IgE specifiche. I dati di prevalenza, inoltre, possono essere influenzati dal fatto che il lavoratore sintomatico possa aver abbandonato la mansione a rischio (healthy worker effect phenomenon) **(57)**. I sintomi riconducibili a tale patologia compaiono solitamente entro circa 6 mesi dalla prima esposizione e raramente dopo i 3 anni; nel 70% dei casi il periodo di latenza per lo sviluppo di sintomi nasali è inferiore rispetto a quello per l'insorgenza di

asma (58,59). Tra i lavoratori a rischio per LAA sono presenti ricercatori, tecnici di laboratorio, veterinari, manutentori e addetti alle pulizie negli stabulari. Il fattore di rischio più importante per lo sviluppo di LAA è il livello di esposizione agli allergeni animali, determinato sia quantitativamente (inteso sia come numero di ore settimanali di esposizione sia come numero di animali con cui avviene il contatto, a seconda degli studi), sia qualitativamente (ad esempio manipolazione delle lettiere contaminate). In uno studio epidemiologico condotto da Gordon e colleghi sono state misurate le concentrazioni ambientali di aeroallergeni urinari di ratto (RUA) a cui venivano esposte diverse categorie di lavoratori occupati presso un'industria farmaceutica; è stato evidenziato che la mansione esposta a maggiori concentrazioni ambientali di RUA (23 microgrammi/m³) era costituita da personale tecnico addetto alla cura e alla pulizia degli animali (60). E' stato dimostrato, inoltre, che il rischio di sensibilizzazione alle proteine urinarie di ratto aumenta proporzionalmente all'intensità e alla durata dell'esposizione per i soggetti non atopici, mentre per i soggetti atopici questa relazione dose-risposta non è così marcata (61). Nel corso degli anni sono stati eseguiti diversi tentativi per monitorare la concentrazione ambientale di aeroallergeni animali, ma nessuno di questi viene eseguito attualmente come prassi standardizzata (62). Alcuni studi hanno stabilito che il soggetto si sensibilizza a concentrazioni antigeniche ambientali più basse rispetto a quelle necessarie per indurre la LAA, infatti concentrazioni antigeniche < 3 ng/m³ e < 5 ng/m³ sono rispettivamente associate ad un basso rischio di sensibilizzazione e di LAA (63).

Diversi studi scientifici hanno dimostrato che l'atopia, cioè la propensione individuale, geneticamente determinata, a sviluppare IgE, è uno dei principali fattori di rischio per LAA (53, 64-66). Alcuni studi genetici hanno rivelato un'associazione tra LAA e genotipo HLA-B16 e HLADR4 (67, 68). Uno studio americano trasversale condotto nel 1996 su un campione di lavoratori esposti ad animali da laboratorio ha verificato che il fumo di sigaretta era correlato con sintomi respiratori lavoro-correlati nei soggetti esposti, ma non con la positività agli skin prick test (69). Il rischio di ammalarsi di LAA è strettamente correlato al tipo di animale con cui il lavoratore entra in contatto; le diverse specie animali hanno un differente potere allergizzante (i roditori sono quelli maggiormente responsabili di LAA) e, all'interno della stessa specie, esistono differenze a seconda del sesso e dell'età dell'animale e del materiale biologico aerodisperso. Si ritiene che i roditori di sesso maschile abbiano un'escrezione urinaria di allergeni maggiore rispetto a quelli di sesso femminile, probabilmente a causa della nefropatia cronica con proteinuria che i primi sviluppano con l'età (53, 70). Le varie componenti allergeniche sono classificate in diverse famiglie di proteine (IUIS Allergen Nomenclature Sub Committee. Allergen nomenclature. <http://www.allergen.org>.) e allergeni all'interno della stessa famiglia di proteine spesso mostrano cross-reattività tra loro (definita come la produzione di anticorpi IgE originariamente sviluppati nei confronti di molecole

omologhe antigeniche provenienti da una fonte diversa di allergene tabella 1). Ciò è particolarmente evidente per le albumine (71) e alcune lipocaline (72) di animali con pelo. Molti degli allergeni animali responsabili dello sviluppo di LAA, come ad esempio proteine urinarie di ratto e topo, appartengono alla famiglia delle lipocaline, proteine deputate al trasporto di composti a basso peso molecolare e che hanno sequenze aminoacidiche omologhe a quelle di alcuni parassiti; questo spiega in parte la capacità degli allergeni animali di stimolare la risposta anticorpale IgE negli individui suscettibili (73).

Tabella 1 Allergeni animali purificati e caratterizzati mediante component-specific IgE assays o attraverso Immuno Solid-phase Allergen Chip (ISAC Thermo Fisher Scientific, Uppsala Sweden) (Modificata da Konradsen JR, et al. Allergy to furry animals: New insights, diagnostic approaches, and challenges. J Allergy Clin Immunol. 2015;135(3):616-25 (74) e <http://www.allergen.org/>).

Animale	Allergeni maggiori †	Altri allergeni
Gatto	Feld1(uteroglobina) 14 + 4 kDa	Feld2(albumina) Feld4(lipocalina) Feld7(VEGP) Feld3(cistatina) Feld5w(IgA felina) Feld8 (latherin-like)
Cane	Canf1(lipocalina) 23-25 kDa	Canf2(lipocalina) Canf4(lipocalina) Canf6(lipocalina) Canf3(albumina) Canf5 (arginina esterasi)
Cavia	Cavp1(lipocalina) 20kDa Cavp2(lipocalina) 17 kDa	Cavp3 (lipocalina) Cavp 4 (albumina)
Topo	Mus m 1 (lipocalina; prealbumina urinaria) 17 kDa	
Ratto	Ratn1 (lipocalina; alfa-2u-globulina) 17 kDa	
Coniglio	Oryc1(lipocalina) 17-18 kDa	Oryc3(lipofilina) 19-21 kDa

I principali antigeni animali responsabili di LAA sono stati identificati; Mus m 1 è una proteina urinaria prodotta dalle cellule epatiche ed escreta in quantità 4 volte superiore nei maschi rispetto alle femmine e si trova nel pelo, nella forfora e nelle lettiere degli animali; Rat n 1B è prodotta dalle ghiandole esocrine in modo androgeno dipendente; Ory c1 e altri allergeni appartengono alla famiglia delle lipocaline. (Tabella 2) Gross, in uno studio del 1980, ha valutato la frequenza di associazione tra specifici allergeni animali e sintomi di LAA: il 72% dei lavoratori sintomatici risultava sensibilizzato ad allergeni del coniglio, il 66% ad allergeni di topo, il 65% ad allergeni di

ratto e il 33% ad allergeni di cavia. Lo stesso studio affermava che nel 45% dei casi i sintomi nasali precedevano quelli delle basse vie aeree, mentre nel 55% dei casi tali sintomi comparivano contemporaneamente (75). Oltre alle caratteristiche intrinseche degli antigeni animali e alla predisposizione genetica dell'individuo, vi sono altri fattori esterni che favoriscono l'insorgenza di LAA, come, ad esempio, l'ambiente secco che rende gli allergeni più volatili.

Tabella 2. Principali allergeni animali (Modificata da Konradsen JR, et al. Allergy to furry animals: New insights, diagnostic approaches, and challenges. J Allergy Clin Immunol. 2015;135(3):616-25 (74) e <http://www.allergen.org/>).

Animale	Allergene	Peso molecolare	Fonte	Funzione biologica
Topo (Mus musculus)	Mus m 1	17	Pelo, urina e forfora	Lipocalina/pralbumina urinaria
Ratto (Rattus norvegicus)	Rat n 1	18,7	Pelo, forfora	Lipocalina (alfa-2u globulina)
Cavia (Cavia porcellus)	Cav p 1	20	Pelo, urina e siero	Lipocalina
	Cav p 2	17	Pelo, urina e forfora	Lipocalina
	Cav p 3	18	Epitelio	Lipocalina
	Cav p 4	66		Albumina
	Cav p6	18		Lipocalina
Coniglio (Oryctolagus cuniculus)	Ory c1	17-18	Pelo, urina, forfora e saliva	Lipocalina
	Ory c3	19-21		Lipofilina
	Ory c4	24		Lipocalina

Clinica dell'allergia ad animali da laboratorio

I sintomi della LAA sono dovuti al rilascio di mediatori biochimici, tra cui istamina, leucotrieni, bradichinina e prostaglandine, in conseguenza dello stato infiammatorio indotto dalla risposta immunitaria IgE-mediata. L'istamina, dopo essere stata liberata e aver attivato i recettori H1 è in grado di indurre sia la contrazione della muscolatura liscia presente nei bronchi, nei vasi sanguigni di piccolo calibro e nel tratto digerente, che l'aumento della permeabilità vascolare, con conseguente broncospasmo, ipotensione ed edema. La natura e l'intensità dei sintomi dipendono dal grado di esposizione ad animali da laboratorio; solitamente, una volta che l'individuo si è sensibilizzato agli allergeni animali, sono necessari pochi minuti di esposizione prima che compaiano i sintomi allergici. Le più comuni manifestazioni cliniche riguardano le vie aeree superiori e la congiuntiva e si manifestano con congestione nasale, sensazione di naso chiuso, starnuti, prurito nasale e oculare, arrossamento congiuntivale e lacrimazione. Fino all'80% dei soggetti affetti da LAA presenta sintomi di rinite allergica. Meno frequenti sono le manifestazioni cutanee, come orticaria e lesioni maculopapulose, che si manifestano all'incirca nel 40% degli individui sintomatici e sono localizzate nel sito di contatto con l'allergene animale. Una percentuale variabile tra il 4 e il 22% dei lavoratori sintomatici può sviluppare asma allergico, che si manifesta con tosse, dispnea e senso di oppressione toracica. L'asma bronchiale è una malattia cronica caratterizzata da infiammazione delle vie aeree, iperreattività e ostruzione bronchiale reversibile, episodi ricorrenti di dispnea, respiro sibilante e da progressivo declino della funzionalità respiratoria; all'esame anatomopatologico è presente infiltrato di cellule infiammatorie tra cui eosinofili, mastociti, macrofagi e linfociti T attivati, edema della mucosa, iperplasia delle ghiandole sottomucose con ipersecrezione di muco, ipertrofia della muscolatura liscia, desquamazione dell'epitelio, ipervascolarizzazione, ispessimento della membrana basale con rimodellamento strutturale delle vie aeree. Questo quadro istopatologico si mantiene ed evolve nel tempo indipendentemente dalla persistenza dell'agente causale che lo ha causato. Quando la crisi di asma insorge in relazione all'attività lavorativa (work-related asthma) ci si può trovare di fronte a due situazioni patologiche: asma occupazionale oppure asma aggravato dal lavoro. Nel primo caso la sintomatologia è scatenata dall'inalazione di agenti eziologici presenti sul luogo di lavoro e può essere classificata in asma immunologico (o con periodo di latenza) e non immunologica (senza periodo di latenza); nel secondo caso una condizione di asma preesistente viene aggravata da fattori presenti sul posto di lavoro, come ad esempio l'esposizione a temperature fredde, polveri, agenti chimici o sforzi eccessivi (75). La LAA è un tipico caso di asma occupazionale con periodo di latenza, caratterizzata quindi da un intervallo di tempo tra la prima esposizione lavorativa all'agente eziologico e la comparsa della malattia (tempo necessario perché il sistema immunitario si

sensibilizzi alla sostanza). Le reazioni allergiche sistemiche, conosciute come anafilassi, possono verificarsi, seppur raramente, in caso di morso da parte dell'animale o puntura accidentale con aghi o strumenti contaminati; si manifestano con orticaria e prurito generalizzato, angioedema alle labbra, agli occhi e alle estremità, distress respiratorio con edema della laringe e asma acuto ed ipotensione fino allo shock potenzialmente fatale (52).

Diagnosi

In caso di sospetto di LAA, l'inizio dell'iter diagnostico prevede un'accurata anamnesi al fine di verificare se la storia occupazionale sia compatibile con la sintomatologia riferita dal lavoratore; questo può essere facilitato dalla compilazione di un questionario specifico che indaga l'anamnesi fisiologica e farmacologica, l'anamnesi patologica remota e prossima con particolare attenzione ad eventuali sintomi allergici e/o respiratori, la storia lavorativa corredata dai rischi occupazionali a cui è stato esposto il lavoratore ed eventuali fattori di rischio extralavorativi, come hobbies o attività voluttuarie. Molto importante è indagare il timing della comparsa e dell'eventuale miglioramento della sintomatologia; si ritiene fortemente suggestiva di LAA la scomparsa dei sintomi nel weekend o dopo l'allontanamento dal laboratorio (fenomeno arresto-ripresa) (55, 76). Tuttavia, quando i sintomi diventano più intensi, non vi è il classico miglioramento dopo la cessazione dell'esposizione, a causa dell'infiammazione tissutale cronica (77). E' necessario, inoltre, identificare altri fattori di rischio presenti nell'ambiente di lavoro che possano scatenare reazioni simili a quelle dovute ad LAA, come esposizione a basse temperature, ad irritanti chimici o ad altri allergeni. Per completezza diagnostica è opportuno considerare altre patologie respiratorie che entrano in diagnosi differenziale con LAA, ad esempio la BPCO e le polmoniti da ipersensibilità (78). A completamento della visita medica è indicato eseguire un accurato esame obiettivo, soprattutto dell'apparato respiratorio e cutaneo, per repertare eventuali segni precoci di malattia o condizioni che richiedano maggiori precauzioni durante l'attività lavorativa.

Nella fase iniziale della sorveglianza sanitaria, è possibile indagare la presenza di uno stato di sensibilizzazione attraverso test cutanei chiamati skin prick test; solitamente viene testato un pannello standard (serie Europa) che comprende vari pollini e muffe, acari (maggiori quali *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae* a cui vengono aggiunti allergeni occupazionali specifici come gli acari minori *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor* e *Tyrophagus putrescentiae*) che negli stabulari si trovano nelle lettiere e nelle granaglie e gli epiteli di animali sia di laboratorio che domestici (79,80). Questi vengono eseguiti posizionando sulla superficie volare dell'avambraccio alcune gocce di allergene purificato, che viene fatto penetrare nella cute attraverso la scarificazione con una lancetta monouso. Dopo circa 20 minuti si valuta la reazione cutanea in

corrispondenza di ogni allergene testato e la si confronta con le reazioni avvenute nella sede di inoculazione di un controllo positivo (solitamente istamina) ed un controllo negativo (glicerina o soluzione salina). Il test è considerato positivo, cioè indicativo di sensibilizzazione, se si osserva la comparsa di un pomfo pruriginoso in corrispondenza dell'allergene inoculato. In alternativa agli skin prick test è possibile eseguire la ricerca sierologica di immunoglobuline E (IgE) specifiche per allergeni animali. Attualmente il dosaggio delle IgE specifiche viene eseguito attraverso il test ematico ImmunoCAP IgE specifico, che ha sostituito il precedente test RAST (Radio Allergo Sorbent Test); questa nuova versione utilizza una metodica fluoroenzimatica anziché radioimmunologica. L'esecuzione del test RAST prevede che l'allergene sospetto sia prima associato ad un substrato insolubile che poi si lega alle IgE specifiche presenti nel siero del paziente; successivamente vengono addizionati anticorpi anti-IgE radiomarcanti che si legano al complesso. La quantità di radioattività misurata è direttamente proporzionale al contenuto di IgE sieriche specifiche. Nel test immunoCAP invece che anticorpi radiomarcanti vengono aggiunti al siero del paziente anticorpi anti-IgE legati ad enzimi (solitamente viene utilizzata la fosfatasi alcalina) di cui viene misurata la fluorescenza attraverso la spettrofotometria al termine della reazione di incubazione (81). Il dosaggio sierico delle IgE, essendo in vitro e non in vivo come i prick test, ha il vantaggio di poter essere eseguito anche se il paziente sta assumendo farmaci antistaminici oppure in caso di lesioni cutanee generalizzate (82). I test in vitro possono dar luogo a falsi positivi in caso di livelli elevati di IgE sieriche dovute ad altre cause, come ad esempio le parassitosi o alcune malattie autoimmuni.

In caso di sintomatologia compatibile con asma occupazionale la diagnosi deve essere supportata dall'evidenza di ostruzione bronchiale reversibile all'esame spirometrico. La spirometria rappresenta il gold standard per la valutazione della funzionalità polmonare e dovrebbe prevedere la misurazione del volume di aria espirata nel primo secondo di un'espiazione forzata (FEV_1), della capacità vitale forzata (FVC) e del flusso espiratorio forzato fra il 25 e il 75% della FVC (FEF25-75). E', inoltre, un utile test diagnostico per identificare un'asma subclinico in quei lavoratori che hanno sintomi esclusivamente di tipo rino-congiuntivite. E' stato dimostrato che le variazioni dei parametri di funzionalità polmonare nel corso della vita lavorativa di un soggetto sono direttamente proporzionali al livello di esposizione ad allergeni animali o ad agenti sensibilizzanti (83). Le attuali linee guida ATS/ERS suggeriscono di confrontare il valore misurato del rapporto FEV_1/FVC con il limite inferiore di normalità (LLN, lower limit of normal) basato sull'intervallo di confidenza al 5° percentile della popolazione di riferimento (si considera quindi indicativo di ostruzione delle vie aeree un valore di FEV_1/FVC inferiore al LLN) (6). La spirometria può essere utile alla diagnosi di asma quando vi sia un incremento maggiore del 12% e di 200 ml di FEV_1 dopo inalazione di 400 µg

di salbutamolo (test di broncoreversibilità). Alcuni autori hanno sottolineato come la valutazione del picco di flusso espiratorio (PEF) durante la giornata lavorativa sia utile a diagnosticare o ad escludere una condizione di asma occupazionale; tuttavia questo metodo, essendo il PEF una variabile sforzo-dipendente, risente della compliance del paziente e della volontà di falsificare i risultati. Si considera rilevante una variazione del PEF all'interno della stessa giornata lavorativa o tra giorni lavorativi differenti (lavoro/non lavoro) di almeno il 20%. Un altro test, conosciuto come test di provocazione bronchiale aspecifica (TPBA), condotto con metacolina o istamina, può essere utile per confermare la presenza di asma in soggetti sintomatici con spirometria normale; inoltre, individui che hanno IgE specifiche verso allergeni di animali da laboratorio e un test alla metacolina positivo hanno un'elevata probabilità di una risposta positiva al test di provocazione bronchiale specifica (TPBS). Questo esame, gold standard per confermare la diagnosi di asma occupazionale dovuta all'esposizione ad animali da laboratorio, viene eseguito facendo inalare dosi crescenti di allergene animale e misurando la funzionalità polmonare ad intervalli di 10-15 minuti dopo ogni dose. Il test risulta positivo se si ha una riduzione $\geq 20\%$ del FEV₁ o $\geq 25\%$ del PEF. Il monitoraggio di questi parametri dovrebbe continuare per almeno 12 ore, per identificare un'eventuale risposta tardiva, anche se ciò non è frequente in caso di asma da LAA e deve essere eseguito in regime ospedaliero (55).

SCOPO

Questo studio, impostato come studio trasversale caso-controllo, si propone di valutare la prevalenza di sintomi allergici (manifestazioni dermatologiche, rinocongiuntivite ed asma) in ricercatori Universitari e di una nota Azienda Farmaceutica Italiana (valutata attraverso la somministrazione di un questionario specifico), esposti in ambito occupazionale ad antigeni di animali da laboratorio, la loro associazione con markers immunologici (sensibilizzazione ad aeroallergeni ubiquitari come acari maggiori e minori e derivati epidermici di animali e allergeni specifici professionali determinata attraverso skin prick test cutanei e/o dosaggio delle IgE specifiche sieriche) ed eventuali modificazioni precoci degli indici di funzionalità respiratoria (FVC, FEV₁, FEV₁/FVC) e dei markers infiammatori polmonari (H₂O₂ nel condensato dell'aria esalata, monossido d'azoto nell'aria espirata e pneumoproteine sieriche). Un ulteriore obiettivo di questo studio è stato quello di validare l'utilizzo di nuovi biomarcatori e metodiche non invasive e di basso costo utili per la sorveglianza sanitaria dei lavoratori esposti ad animali da laboratorio.

METODI

Popolazione

Lo studio ha coinvolto 63 operatori a contatto con animali da laboratorio (LA) (27 uomini e 36 donne; età media $39,2 \pm 11,3$ anni) per un periodo medio di 84 mesi [range interquartile (IQR): 48-240]. Di questi, 27 soggetti lavorano presso l'Università di Parma, 25 presso l'Università di Ferrara e 11 in un'azienda farmaceutica, come ricercatori o tecnici di laboratorio. La variabilità di esposizione agli allergeni è sul tipo di animale (principalmente ratto e nel topo, cavia e coniglio in misura minore e raramente maiale, cavallo e scimmia) e durata dell'esposizione (da un minimo di 3 ore / mese ad un massimo di 120 ore / mese, il 33,3% sono esposti per più di 50 ore / mese).

Un gruppo di controllo di 64 volontari è stato arruolato durante le visite di sorveglianza sanitaria tra gli studenti e dipendenti dell'Università di Parma. Questo gruppo è stato diviso sulla base dello stato atopico in un sottogruppo di allergici e sani. 27 hanno una storia nota di atopia, accertata con SPT positivo, ma non hanno sintomi né eseguono alcuna terapia (steroidi o antistaminici) al momento dell'arruolamento; 37 sono sani.

La tabella 3 mostra le principali caratteristiche dei due gruppi. Non ci sono differenze statisticamente significative di età e parametri di funzionalità polmonare tra i due gruppi.

Tabella 3: caratteristiche della popolazione in studio

	Lavoratori a contatto con animali di laboratorio (AL)	Controlli
Numero (M/F)	63 (27/36)	64 (30/34)
Età mediana (min-max)	35 (24-70)	31 (21-58)
Fumo (no/ex/si)	47/8/8	33/12/19
Fumatori, numero di pacchi/anno mediana (IQR 25-75)	3,75 (1-16)	11,5 (6,2-23,1)
Tempo di esposizione in mesi, mediana (IQR 25-75 pct)	84 (48-240)	NA
Possiede animali domestici (si/no)	28/35 (44/56%)	30/34 (47/53%)

Test immunologici positivi (SPT o RAST)	33 (52%)	27 (42%)
FEV₁ %pred mediana (IQR 25-75 pct)	101.7 (93.7-110.5)	100.2 (94.2-108.0)
FVC %pred mediana (IQR 25-75 pct)	104.8 (96.4-111.0)	102.7 (93.9-107.9)
FEV₁/FVC mediana (IQR 25-75 pct)	0.81 (0.77-0.84)	0.80 (0.76-0.84)

Tutti i soggetti hanno dato il loro consenso informato scritto per partecipare allo studio, che è stato approvato dal Comitato Etico locale (numero di protocollo 16984 / 2013/05/16). Il materiale biologico è stato campionato nel rispetto della Dichiarazione dei principi di Helsinki.

Disegno dello studio

Un questionario specifico che indaga le caratteristiche dell'esposizione e sintomi respiratori è stato somministrato a tutti i partecipanti. Questi, inoltre, sono stati sottoposti a spirometria, analisi della frazione di ossido nitrico esalato (FeNO), prelievo di sangue e raccolta del condensato dell'aria esalata (CAE) durante la visita di routine di sorveglianza sanitaria.

I prick test sono stati eseguiti nella coorte di lavoratori dell'Università di Parma, mentre i RAST sono stati eseguiti presso l'Università di Ferrara. Questa differenza è dovuta al diverso protocollo di sorveglianza sanitaria applicato nelle due Università.

Questionario

E' stato somministrato da personale medico qualificato. E' stato adattato un questionario da Bush et al (48,52,55) e raccolti i dati demografici e le informazioni relative al fumo, anamnesi personale e familiare di malattie allergiche. Un'attenta registrazione della anamnesi lavorativa è stata eseguita sulla mansione, la durata dell'esposizione agli animali, la presenza di sintomi respiratori, nasali o oculari legati al lavoro, (con particolare attenzione alla tempistica di insorgenza). E' stata inoltre valutata l'esposizione domestica ad animali.

IgE totali e specifiche

La ricerca delle IgE totali (TIgE), Phadiatop ® e IgE specifiche di un mix di allergeni (più comuni in Italia) è stata eseguita in 26 esposti (Università di Ferrara) mediante ImmunoCAP100 (Phadia, Svezia). Un livello di IgE specifiche sopra 0,35 KUA / L è stato considerato positivo.

Skin prick test (SPT)

SPT sono stati eseguiti sul lato volare dell'avambraccio con lancette usa e getta (Stallergenes, Anthony, Francia).

I partecipanti sono stati sottoposti a SPT utilizzando estratti standardizzati, disponibili in commercio (Alk-Abellò A / S Horsholm, Danimarca) di aeroallergeni comuni, tra cui pollini di alberi, erbe, piante infestanti e ambrosia, acari della polvere (dust mites DM –D. farinae e D. pteronyssinus), spore di muffe (Alternaria, Cladosporium e Aspergillus fumigatus), acari delle derrate (storage mites SM- L. destructor, T. putrescentiae, A. Siro). Come allergeni occupazionali sono stati testati epiteli di gatto, cane, criceto, cavia, ratto, topo, coniglio.

Test con istamina 10 mg / mL e soluzione salina, rispettivamente, sono stati usati come controlli positivo e negativo. Le letture sono state effettuate dopo 15 min e pomfi con un diametro medio di > 3 mm sono stati considerati positivi (**84**).

Spirometria

La funzione polmonare è stata valutata mediante spirometro portatile (KOKO spirometer, SensorMedics, Yorba Linda, California, USA) secondo le attuali linee guida (**85, 21**) e valori di riferimento multietnici [(global lung initiative GLI- 2012 (**86**)]. I valori migliori su 8 misure sono stati utilizzati per la capacità vitale forzata (FVC), volume espiratorio forzato in 1 secondo (FEV₁), il rapporto FEV₁ / FVC e flusso espiratorio forzato al 25-75% della capacità vitale (FEF 25-75%).

Frazione esalata di ossido nitrico (FeNO)

La frazione bronchiale dell'ossido nitrico (FeNO) è stata misurata secondo le raccomandazioni ATS / ERS (**87**), al di fuori della stagione pollinica, e circa alla stessa ora del giorno. Le misurazioni

sono state effettuate utilizzando uno strumento portatile (Hypair FENO) facendo rimanere il paziente in posizione seduta. Al soggetto veniva fatta eseguire una inalazione in aria ambiente seguita da un'espirazione in un boccaglio ad un flusso costante di 50 ml / sec (FENO50) per almeno 10s. Nessuno dei partecipanti al momento del campionamento assumeva farmaci anti-infiammatori e nessuno aveva infezione delle vie respiratorie in atto e nelle due settimane precedenti.

Raccolta e analisi dei biomarcatori nel CAE

Il CAE è stato raccolto utilizzando un condensatore TURBO-DECCS portatile (ItalChill, Parma, Italia).

I soggetti sono stati invitati a respirare a volume corrente attraverso un boccaglio per 15 minuti quando la temperatura del condensatore era -5°C , rispettando tutte le norme pratiche raccomandate per la raccolta pubblicate da ATS / ERS (88) e i principi di decontaminazione. I campioni (1-2 ml) sono stati quindi conservati a -80°C fino all'analisi. H_2O_2 è stata misurata come descritto in precedenza (89) utilizzando un kit di test di perossido di idrogeno Amplex Red commerciale (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) con un limite di rilevabilità (LOD) di 0,01 μM . L'analisi è stata effettuata entro 1 mese dalla raccolta EBC dopo che era stato congelato a -80°C per evitare l'instabilità relativa di H_2O_2 .

Pneumoproteine sieriche

Il sangue è stato prelevato durante la visita medica, quindi centrifugato per ottenere il siero e conservato a -80°C .

SP-A, SP-D e le concentrazioni di CC16 sono state misurate utilizzando una tecnica immunologica con kit disponibile in commercio secondo il protocollo del produttore (BioVendor, Brno, Repubblica Ceca) (46).

Analisi statistica

La dimensione del campione è stata calcolata considerando i livelli di FeNO attesi, basando il calcolo sugli effetti minimi osservati in letteratura (90-92) e considerando due fattori: esposizione (A) e sensibilizzazione (B).

Considerando una deviazione standard relativa all'interno del gruppo di circa il 33% (1/3 del valore medio) e un effetto in A del 20% e in B fino al 50%, il disegno fattoriale (a due fattori e con 2 livelli) ha 4 celle. Un totale di 120 soggetti è necessario per fornire 30 soggetti per cella. Questo disegno raggiunge il 91% di potenza quando il test F è usato per testare il fattore A ad un livello di significatività del 5% e la deviazione standard effettiva del 10% (dimensione dell'effetto 0,303) e ha raggiunto il 100% di potenza quando un test F è stato utilizzato per fattore di controllo B ad un livello di significatività del 5% e la deviazione standard effettiva del 25% (dimensione dell'effetto 0,758). Un livello inferiore al 10% di tolleranza è stato considerato accettabile nella composizione dei gruppi, sulla base del fatto che non è stato possibile definire a priori il numero di soggetti sensibilizzati in entrambi i gruppi esposti e non. Pertanto, sono stati arruolati complessivamente $n = 127$ soggetti suddivisi in quattro gruppi.

Le variabili qualitative sono state espresse come frequenza (prevalenza). La normalità delle variabili quantitative è stata testata utilizzando il test di Kolmogorov-Smirnov. In caso di variabili log-normali, il confronto tra due gruppi è stato eseguito con il t-test per dati indipendenti; i logaritmi delle variabili vengono riportati come media geometrica (DS geometrico). Nel caso di variabili con valori <LOD, i dati sono stati espressi come mediana (range interquartile) e test non parametrici sono stati eseguiti: Test Kruskal-Wallis + test post hoc di Dunn. Nel caso di variabili normalmente distribuite o log-normalmente distribuite, 2-way ANOVA è stato utilizzato per testare gli effetti separati di due predittori categoriali e la loro interazione; modelli di regressione multipla / ANCOVA sono stati utilizzati quando predittori quantitativi erano presenti.

Correlazioni semplici sono state eseguite utilizzando test parametrici (Pearson) o non parametrici (Spearman) secondo la normalità dei residui. Odds ratio sono stati calcolati utilizzando tabelle di contingenza e test esatto di Fisher a causa della dimensione del campione. IBM SPSS software v. 22 (IBM, Armonk, NY, USA) e GraphPad Prism v. 5.0 (Graphpad, La Jolla, CA, USA) sono stati utilizzati. $P = 0.05$ è stato impostato come livello di significatività.

RISULTATI

Questionario

Dall'analisi dei questionari è emerso che 37 lavoratori (59%) su 63 esposti ad animali di laboratorio (AL) lamentavano sintomi simil-allergici. 19/63 soggetti (30%) avevano sintomi legati al lavoro di cui 8 occupazionali (con fenomeno di arresto-ripresa), 11 avevano sintomi esacerbati in ambiente di lavoro. In 18 lavoratori i sintomi non erano correlati al lavoro.

In 18 lavoratori il sintomo di riferimento era rino-congiuntivite e 15 soggetti avevano sia sintomi asma-like che rino-congiuntivite. 2 lavoratori lamentavano eczema, e 2 asma, rino-congiuntivite e asma.

33 soggetti (86,8%) avevano una storia di esposizione al ratto, 28 (73,6%) a topi, 16 (42,1%) a cavia e 14 (36,8%) al coniglio. L'esposizione ad altri animali, come criceti, gerbilli, scimmia, maiale, cavallo, cane e gatto era sporadica.

Nel gruppo dei soggetti a contatto con animali di laboratorio 28 avevano anche animali domestici (gatto, cane, roditori).

Test immunologici

Gli skin prick test sono stati eseguiti in 64 controlli e 38 addetti di laboratorio. In 25 lavoratori addetti ad AL sono stati eseguiti RAST. I risultati sono in tabella 4.

Tra 19 lavoratori che lamentano sintomi legati al lavoro 11 hanno avuto un risultato positivo per l'animale al quale erano effettivamente esposti, in 3 restanti lavoratori sintomatici l'antigene in causa potrebbero essere acari delle derrate (SM) e muffe. Solo tre pazienti sintomatici presento una prick test positivo esclusivamente per allergeni pollinici.

Tra i 26 lavoratori asintomatici, 12 hanno un test immunologico negativo, mentre 12 sono sensibilizzati a pollini, acari della polvere e peli di animali (cane o gatto); solo 2 soggetti asintomatici sono sensibilizzati ad animali da laboratorio. (Tabella 5)

Tabella 4: risultati dei test immunologici

	Pollini	DM	SM	Muffe	Animali domestici	AL
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Esposti (33)	22 (66%)	20 (61%)	9 (27%)	3 (9%)	20 (61%)	16 (48%)
Controlli (27)	20 (74%)	14 (52%)	7 (26%)	4 (15%)	8 (30%)	1 (4%)

Legenda: AL animali di laboratorio; SM storage mites; DM dust mites

Tabella 5: relazione dei test immunologici con i sintomi nei lavoratori esposti ad animali di laboratorio

Esposti	AL n (%)	Animali domestici n (%)	SM n (%)	DM n (%)	Pollini n (%)	Muffe n (%)
Sintomi occupazionali (8)	4 (50 %)	4 (50 %)	3 (37 %)	4 (50 %)	4 (50 %)	1 (12,5 %)
Sintomi work-exacerbated (11)	7 (63 %)	8 (72 %)	4 (36 %)	6 (54 %)	5 (45 %)	2 (18 %)
Sintomi non lavoro-correlati (18)	3 (16 %)	6 (33 %)	2 (11 %)	7 (38 %)	6 (33 %)	0 (0 %)
Asintomatici (26)	2 (7 %)	2 (7 %)	0 (0 %)	3 (11 %)	7 (26 %)	0 (0 %)

Legend: AL animali di laboratorio; SM storage mites; DM dust mites

La prevalenza di allergopatie occupazionali nel nostro studio è del 17,5% (11/63) considerando la sensibilizzazione agli epiteli di animali di laboratorio; questa aumenta al 25,4% (16/63) se si considera la sensibilizzazione agli acari delle derrate e muffe. La prevalenza di lavoratori sensibilizzati a epiteli di AL, indipendentemente dalla presenza di sintomi è del 25,4% (16/63). Questa prevalenza aumenta al 39,7% se consideriamo anche la sensibilizzazione agli acari delle derrate (25/63). La prevalenza di sensibilizzazione per AL è più alta (16/63) rispetto al gruppo di controllo (1/64), con un OR di 21.44 (3,06-913)

10 lavoratori sintomatici sensibilizzati a AL hanno riferito sintomi simili all'asma e rinocongiuntivite, mentre solo rinocongiuntivite è riportata in 2 soggetti; nessuno riferiva eczema.

Nel gruppo a contatto con gli AL la sensibilizzazione per gli animali domestici è meno frequente nei proprietari di animali domestici che in chi non ha un animale da compagnia (test esatto di 15 vs 5 p = 0,034 di Fisher).

Il possesso di animali domestici è stato utilizzato come un possibile fattore di confondimento per tutti i biomarcatori misurati (t-test sui valori Log), ma non è stata osservata alcuna differenza statistica. Per questo motivo, nello sviluppo del modello non è indicato questo fattore.

Spirometria

I valori spirometrici, interpretati secondo i criteri ATS / ERS con valori di riferimento GLI-2012, non hanno mostrato differenze statisticamente significative tra il gruppo dei lavoratori a contatto con AL e controlli (Tabella 3).

Secondo i criteri interpretativi ATS / ERS nel gruppo di lavoratori a contatto con AL non ci sono anomalie ostruttive, 1 soggetto presenta variante borderline ostruttiva ($FEV_1 / FVC < LLN$ e $FEV_1 > 100\%$ pred) e 1 un pattern restrittivo ($FEV_1 / FVC > LLN$ e $FEV_1 < LLN$). Nel gruppo di controllo vi è 1 pattern ostruttivi, 1 variante borderline, e 1 pattern restrittivo.

FeNO

I valori di FeNO nei lavoratori a contatto con AL e controlli, a seconda dei risultati di sensibilizzazione sono presentati nella Tabella 6 e Figura 1. Per quanto riguarda i valori di FENO bronchiale, esposizione ($p = 0,002$), sensibilizzazione ($p = 0,000$) ed età ($p = 0,001$) hanno un effetto su questa variabile ($p = 0,024$), ma nessuna interazione tra esposizione e sensibilizzazione è stata dimostrata prendendo in considerazione nel modello l'età ($p = 0,146$) (ANCOVA) (Tabella 7).

I valori di FeNO sono significativamente correlati a quelli di H_2O_2 (Spearman rho 0,2 $p = 0,024$) e SP-D (Spearman rho 0,22 $p = 0,013$).

Tabella 6: biomarcatori in lavoratori a contatto con AL e controlli sulla base del lotro stato atopico

	Lavoratori a contatto con AL		Controlli	
	Sensibilizzati	Non-sensibilizzati	Sensibilizzati	Non-sensibilizzati
FeNO₅₀(ppb) media geometrica [GSD]	36.18 [±2,38]	19.34 [±1,87]	18.25 [±1,63]	16.32 [±1,66]
H₂O₂ (uM) mediana [IQR]	0.14 [0.08-0.29]	0.09 [0.04-0.27]	0.07 [0.05-0.12]	0.11 [0.04-0.22]
SP-A (ng/mL) Media geometrica [GSD]	72.97 [±3,71]	43.76 [±2,28]	42.01 [±2,18]	40.99 [±1,73]
SP-D (ng/mL) Media geometrica [GSD]	56.34 [±1,75]	51.60 [±1,58]	39.76 [±1,96]	40.32 [±2,21]
CC-16 (ng/mL) media geometrica [GSD]	6.93 [±1,81]	8.60 [±1,53]	5.80 [±2,10]	9.19 [±1,87]

H₂O₂ nel condensato

I valori di H₂O₂ nel CAE di lavoratori a contatto con AL e controlli, a seconda dei risultati di sensibilizzazione sono presentati nella Tabella 6 e Figura 2. I valori di H₂O₂ nel CAE non erano statisticamente differenti tra esposti e controlli (p = 0,085). Tuttavia, confrontando sensibilizzati esposti rispetto ai controlli (sensibilizzati Kruskal-Wallis + hoc post-Dunn test) i valori di H₂O₂ erano significativamente più alti nei soggetti esposti (p <0,05).

Pneumoproteine sieriche

I valori sierici di pneumoproteine nei lavoratori a contatto con AL e nei controlli a seconda dei risultati di sensibilizzazione sono presentati nella tabella 6 e Figure 3a,4,5.

I valori di SPA in entrambi i gruppi non sono influenzati dall'esposizione ad AL né dalla sensibilizzazione o dall'età (tabella 8). Nel gruppo di lavoratori esposti, la presenza di sintomi (rino-congiuntivite) è associata a livelli più elevati di SP-A sia nell'analisi univariata (p <0.01) che multivariata correggendo per la sensibilizzazione e la presenza di asma (p <0.05) (Figura 3b).

Riguardo i valori di SP-D la sensibilizzazione non ha alcun effetto, al contrario l'esposizione ha un effetto su questa variabile (p = 0,024) così come l'età (p = 0,022) (tabella 9).

I valori di CC16 sono significativamente correlati al FEV₁% pred (Pearson r 0,2 p = 0,023). Così i valori di FEV₁ sono stati aggiunti come variabile nel modello statistico utilizzato. L'esposizione non ha alcun effetto, al contrario sensibilizzazione ed età ha un effetto su questa variabile (p = 0,027 e p = 0,019, rispettivamente) (tabella 10).

Tabella 7: Test degli effetti tra soggetti per FeNO50 come variabile dipendente

	Sig.
Age	,001*
Exposure	,002*
Sensitization	,000*
Exp* Sen	,146

Tabella 8: Coefficienti Log SP-A

Modello	Coefficienti non standardizzati		Sig.
	B	Errore Std.	
Esposizione	,126	,072	,083
Sensibilizzazione	,122	,076	,108
Età	,001	,003	,775

Legenda B: slope; in grassetto* valori di significatività statistica

Tabella 9: Coefficienti Log SP-D

Modello	Coefficienti non standardizzati		Sig.
	B	Errore Std.	
Esposizione	,112	,049	,024*
Sensibilizzazione	,061	,052	,236
Età	,005	,002	,022*

Legenda B: slope; in grassetto* valori di significatività statistica

Tabella 10: Coefficienti Log CC-16

Modello	Coefficienti non standardizzati		Sig.
	B	Std. Error	
Esposizione	-,001	,045	,989
Sensibilizzazione	-,107	,047	,027*
Età	,005	,002	,019*
Sesso	-,088	,045	,052
FEV%predGLI	,003	,002	,081

Legenda B: slope; in grassetto* valori di significatività statistica

DISCUSSIONE

Una alta percentuale della nostra popolazione di lavoratori a contatto con AL lamenta sintomi allergici (59% 37/63) e questo è in linea con i risultati di un ampio studio europeo (40%) (93) e con

l'osservazione che le allergopatie occupazionali sono in aumento in tutto il mondo per ragioni che non sono ancora state completamente spiegate (94). La percentuale di lavoratori esposti ad AL per più di 50 ore / mese è superiore ad altri studi presenti in letteratura (33,3%) (95).

La prevalenza di allergie occupazionali nel nostro studio (sintomi clinici associati a sensibilizzazione immunologica positiva) è del 17,5% (11/63) considerando la sensibilizzazione agli epiteli di AL; la prevalenza aumenta al 25,4% (16/63) se si considera anche la sensibilizzazione ad acari delle derrate e muffe. Questi risultati sono in linea con i dati della letteratura più recente (1980-2015) per cui la prevalenza varia tra il 6% e il 44%, a seconda del fatto che siano utilizzati per la diagnosi questionari o anche test immunologici specifici (50,56,90). Lavoratori sintomatici in ambiente di lavoro ma non sensibilizzati ad AL hanno mostrato una sensibilizzazione agli acari, che si trovano di solito nelle lettiere, come riportato in un articolo di Ruoppi et al (80).

I principali sintomi lamentati sono rinocongiuntivite e asma. In particolare rinocongiuntivite occupazionale è presente nel 19% dei lavoratori (12/63), mentre il 15,9% (10/63) lamenta asma oltre a sintomi di rinocongiuntivite (94,96,97).

Come dimostrato dai test immunologici, il possesso di animali domestici non crea interferenze per la sensibilizzazione a AL. Tuttavia, i soggetti professionalmente esposti ad AL hanno maggiori probabilità di avere una sensibilizzazione ad altri animali, nonostante non possiedano un animale domestico. Tradizionalmente, la sensibilizzazione o allergia ai gatti o cani è stata considerata un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di AAL (66,96,98-101). Il nostro risultato potrebbe essere spiegato dalla cross-reazione antigenica tra allergeni proteici (lipocaline, albumine). I dati riportati suggeriscono che i meccanismi di cross-reazione potrebbero giocare un ruolo importante in una percentuale significativa di sensibilizzazioni allergiche ad animali con pelo (animali domestici e mammiferi insoliti / esotici), soprattutto in assenza di qualsiasi possibile contatto diretto / indiretto (72,102). In questo contesto, la valutazione delle IgE specifiche con la tecnica micro-array ImmunoCAP ISAC per lipocaline e albumine potrebbe essere molto utile per valutare la possibilità di cross-reazione tra allergeni di animali diversi. Nel nostro studio non abbiamo eseguito ImmunoCAP ISAC diagnostico, ma questo potrebbe essere interessante implementare la sorveglianza sanitari con tale metodica nei soggetti professionalmente esposti (74).

I dati spirometrici non dimostrano la presenza di deficit ostruttivi, sebbene vengano segnalati sintomi asma-like. Tuttavia, le anomalie ostruttive possono essere difficili da rilevare durante l'esecuzione di screening in ambito occupazionale a causa della variabilità intrinseca dell'ostruzione asma-correlata. Il gold standard per la diagnosi di asma professionale è il challenge

test (SIC specific inhalation challenge) o il test metacolina in modalità arresto / ripresa (dopo 2 settimane di lavoro e 2 settimane di riposo). I risultati spirometrici della maggior parte dei soggetti (anche quelli con sintomi simili all'asma) rientrano nei limiti della norma (**103**). Abbiamo quindi cercato un marker precoce di alterazioni che suggeriscano infiammazione delle vie aeree. Il FeNO prodotto a livello polmonare e presente nel respiro esalato (**104**) è riconosciuto come un mezzo sicuro e utile per valutare l'infiammazione delle vie aeree (**105**). La European Respiratory Society (ERS) e l'American Thoracic Society (ATS) hanno dimostrato che i livelli di FeNO sono elevati in molte malattie polmonari, tra cui l'asma e atopia (**106**), e molti studi epidemiologici hanno usato il FeNO per valutare l'esposizione (**107,108**) nelle popolazioni lavorative. Alti livelli di FeNO sono stati riscontrati in soggetti sensibilizzati dopo challenge specifico con isocianati per via inalatoria (**105,106**) e lattice (**107**), in soggetti sensibilizzati esposti ad AL (**108**), in fornai, agricoltori, operatori sanitari (**109**) e lavoratori esposti a nanomateriali (**110**).

Vari fattori demografici e biologici, compreso genere, altezza, età, fumo di sigaretta, atopia, livelli di IgE, possono causare variazioni nei livelli di FeNO (**111,112**). In questo studio, abbiamo esplorato l'influenza del genere, del fumo storia e dell'età sui livelli di FeNO. Non si osservano effetti del genere e della storia di fumo, mentre abbiamo dimostrato che i livelli di FeNO sono influenzati dall'aumentare dell'età. L'effetto dell'età sui livelli di FeNO è stato a lungo dibattuto ed i risultati sono controversi. L'età ha un effetto sui valori di FeNO nei soggetti <18 anni, e questo può essere dovuto ad un aumento della superficie della mucosa totale che produce ossido nitrico (**113**). Tra gli adulti, risultati contrastanti sono stati riportati sul legame età-valori di FeNO (**114-117**), rimanendo poco chiaro il motivo per cui il FeNO aumenta con l'aumentare dell'età. Fattori che possono essere correlati all'età, come la presenza di infiammazione delle vie aeree subclinica, la dieta (**118**), e una maggiore esposizione cumulativa all'inquinamento atmosferico (**119**), possono avere un ruolo in questo senso. È stato anche dimostrato che l'ostruzione delle vie aeree, che aumenta con l'età, è associata con infiammazione delle vie aeree (**120**). È stato a lungo discusso se FeNO può identificare l'atopia o l'infiammazione delle vie aeree (**121**). Nel nostro studio abbiamo evidenziato che i livelli di FeNO in soggetti sintomatici sono positivamente influenzati dalla presenza di allergia IgE-mediata (sensibilizzazione). FeNO è generalmente accettato come indicatore di infiammazione delle vie aeree perché riflette il processo infiammatorio eosinofilo che si verifica nelle vie aeree dei pazienti asmatici (**122**). In particolare, in pazienti con asma atopico l'attivazione di ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS) è stata descritta nell'epitelio delle vie aeree, a spese della via STAT-6 tramite l'azione di citochine proinfiammatorie Th2 quali interleuchine (IL) -4 e -13, che porta al rilascio di alti livelli di NO nell'aria espirata (**121, 123**). Diversi studi suggeriscono che FeNO può essere un marcatore diretto dell'infiammazione Th2 mediata (**81**). Il

riscontro di un effetto dell'esposizione sui valori di FeNO suggerisce che i valori più elevati FeNO possono non solo indicare infiammazione delle vie aeree IgE-mediata, ma forse anche una risposta infiammatoria generica. In ambito professionale valori FeNO superiore dovrebbero essere monitorati per la possibile insorgenza futura di sensibilizzazione o per l'esecuzione di esami di secondo livello (metacolina) in presenza di sintomi. Anche il fumo può spiegare la nostra osservazione: soggetti esposti non sensibilizzati hanno livelli più elevati rispetto al FeNO dei controlli non sensibilizzati, e questo potrebbe essere causato da un'abitudine al fumo più marcata e inveterata (P / Y) di questi ultimi.

Il perossido di idrogeno è il prodotto della trasformazione dell'anione superossido da parte della superossido dismutasi durante lo stress ossidativo. Questo stress può essere avviato da cellule infiammatorie polmonari in particolare eosinofili ma anche macrofagi e neutrofili, che generano diverse specie reattive dell'ossigeno che a loro volta causano danni alle cellule epiteliali aumentando l'iperreattività bronchiale. L'anione superossido (O_2^-) viene rapidamente metabolizzato dalla superossido dismutasi in perossido di idrogeno (H_2O_2), che tende ad evaporare nell'aria espirata. Pertanto H_2O_2 nell'esalato viene considerato un marcatore biologico dello stress ossidativo polmonare (124). Elevati livelli di H_2O_2 sono stati documentati in diverse popolazioni di pazienti con asma (125,126), fibrosi polmonare (127), cancro polmonare primitivo (128), e asbestosi (129) rispetto ai soggetti di controllo. Diversi studi hanno dimostrato elevati livelli di H_2O_2 in soggetti esposti professionalmente, quali operatori delle pulizie in ambiente ospedaliero, (130) saldatori, (131), ma anche soggetti sani esposti all'ozono (89). Le concentrazioni riscontrate nei nostri lavoratori a contatto con AL non erano significativamente superiori a quelle misurate nei controlli. Questo risultato è in linea con fatto che entrambe le nostre popolazioni di studio comprendono soggetti sensibilizzati. Inoltre, H_2O_2 sembra essere molto più legato alla risposta neutrofila che all'infiammazione eosinofila (132). Tutti i soggetti al momento del loro arruolamento non hanno alcun sintomo flogistico acuto. Tuttavia, confrontando sensibilizzati esposti rispetto ai controlli sensibilizzati valori H_2O_2 erano significativamente più alti nei soggetti esposti ($p < 0,05$). Attribuiamo questo risultato al fatto che il sottogruppo nei lavoratori a contatto con AL è più vecchio e meno numeroso.

L'aumento della permeabilità della barriera epiteliale broncoalveolare indotta dall'infiammazione eosinofila dovrebbe causare una perdita di pneumoproteine con aumento delle concentrazioni sieriche di tali biomarcatori. Le proteine del surfactante (SP) -A e SP-D (SP-A / -D) appartengono alla famiglia delle collectine (lectine collagene-like). SP-A, la proteina più rappresentata nel

surfactante, è sintetizzata e riciclata dalle cellule alveolari di II tipo (AT II) nelle vie aeree distali. Può anche essere secreta nel colon, nella prostata e nel mesentero. SP-D è sintetizzata e secreta costitutivamente dalle cellule ATII, e prodotta anche dalle cellule non ciliate di Clara nelle vie aeree superiori (**133-140**). Esse svolgono un ruolo importante in numerose malattie eosinofile (tra cui l'asma e rinite allergica): SP-A / -D modulano la chemiotassi degli eosinofili, inibiscono il rilascio di mediatori eosinofili, macrofagi e mediano la clearance di eosinofili apoptotici. Le alterazioni nei livelli sierici di SP-A / -D sono associati con la gravità della rinite allergica e di patologie ostruttive croniche polmonari. Inoltre, l'oligomerizzazione di SP-A / -D, necessaria per il loro corretto funzionamento, può essere perturbata da specie reattive, aumentate nella patologie eosinofile (**140**).

CC-16 è una proteina secreta dalle cellule non ciliate dei bronchioli, studiata come indicatore di danno epiteliale nelle vie aeree inferiori. E' prodotta anche dalle cellule epiteliali della mucosa nasale e degli organi urogenitali, ma i livelli sierici non sembra essere influenzati dal rilascio di questi ultimi (**141,142**). I livelli sierici dipendono dalla sua produzione, dalle possibili perdite attraverso la barriera epiteliale danneggiata e dalla clearance renale. Molteplici fattori possono influenzare la concentrazione finale di CC16 nel siero (variazione circadiana, età, etnia, condizioni atmosferiche, esposizione ad allergeni, esercizio fisico). CC16 si pensa abbia proprietà immunomodulatorie e antinfiammatorie, proteggendo il tratto respiratorio dallo stress ossidativo (**143**), inibendo sia l'attività della fosfolipasi A2 che la produzione di IFN- γ e influenzando anche la risposta in corso di infezione. Le concentrazioni sieriche fisiologiche di SP-A e SP-D sono 20-200 ng / ml e 60 ng / mL, rispettivamente. La concentrazione sierica di CC16 è compresa tra 5 e 50 ng / mL.

I valori SPA in entrambi i gruppi non sono influenzati dall'esposizione ad AL né dalla sensibilizzazione o età. Questo risultato è in accordo con altri autori, che hanno affermato che non si osservano differenze statisticamente significative nei livelli sierici di SP-A tra soggetti sani, fumatori, asmatici e che soffrono di BPCO (**144**). Tuttavia in diversi studi in patologie allergiche, sono stati riportati livelli di proteine del surfactante sia aumentati che diminuiti (**140, 145**), ma queste differenze possono essere dovute alla diversa matrice utilizzata per il dosaggio o al diverso momento della raccolta. Considerando il gruppo di sensibilizzati a contatto con AL (Figura 3b) abbiamo notato che il 28,1% dei valori erano al di sopra del cut-off per la SP-A e abbiamo associato questo alla presenza di sintomi (rino-congiuntivite). Ciò è in linea con la letteratura in cui i valori di SP-A dipendono dalla gravità della rinite allergica (**140**).

Nel nostro studio l'aumento dei valori sierici SP-D negli esposti potrebbe essere attribuito all'alterata permeabilità della membrana alveolo-capillare. Ciò può essere indotto da meccanismi di immunità innata attraverso opsonizzazione SP-D-mediata di allergeni, come dimostrato anche da studi in vitro (44). SP-D non è né influenzato dallo stato atopico, né dall'abitudine tabagica. Pertanto, in base ai risultati ottenuti nel nostro studio, SP-D potrebbe essere considerato come un marker di esposizione corrente per aero-allergeni. L'effetto dell'età dovrebbe essere considerato nel valutare questo biomarker (146), anche se altri studi non hanno osservato alcuna differenza in considerazione dell'età (147).

I valori di CC16 sono influenzati dall'età e dalla sensibilizzazione, mentre l'esposizione non ha alcun effetto. L'effetto dell'età è in linea con osservazioni precedenti: i cambiamenti legati all'età si pensa possano essere correlati ad un aumento delle perdite della barriera alveolo-capillare e ad un deterioramento aspecifico del polmone (148,149). La nostra osservazione di una correlazione tra i valori CC16 e FEV₁% pred è in linea con dati in letteratura osservati in popolazioni di asmatici (150). Inoltre il nostro risultato è in una popolazione non selezionata per malattia, indicando che questo biomarker potrebbe essere usato per predire precocemente un declino della funzione polmonare. La rinite allergica intermittente è associata a livelli di CC16 diminuiti in liquidi di lavaggio nasale rispetto ai controlli sani (151-153). È stato ipotizzato che la diminuita espressione di CC16 potrebbe essere correlata alla patogenesi della rinite allergica intermittente. I dati ottenuti nel nostro studio sembrano essere in linea con quelli negli studi summenzionati, che mostrano valori di CC16 diversi in base al momento di campionamento in soggetti allergici. Nel nostro studio abbiamo eseguito l'analisi su una matrice diversa (siero), ma possiamo supporre che i livelli sierici CC16 ottenuti hanno un modello sincrono con la fase della malattia in soggetti sensibilizzati.

Figura 1: valori di FeNO (media geometrica); * $p < 0,05$

Legenda: A: controlli sensibilizzati; B: controlli non sensibilizzati; C lavoratori a contatto con AL sensibilizzati; D: lavoratori a contatto con AL non sensibilizzati.

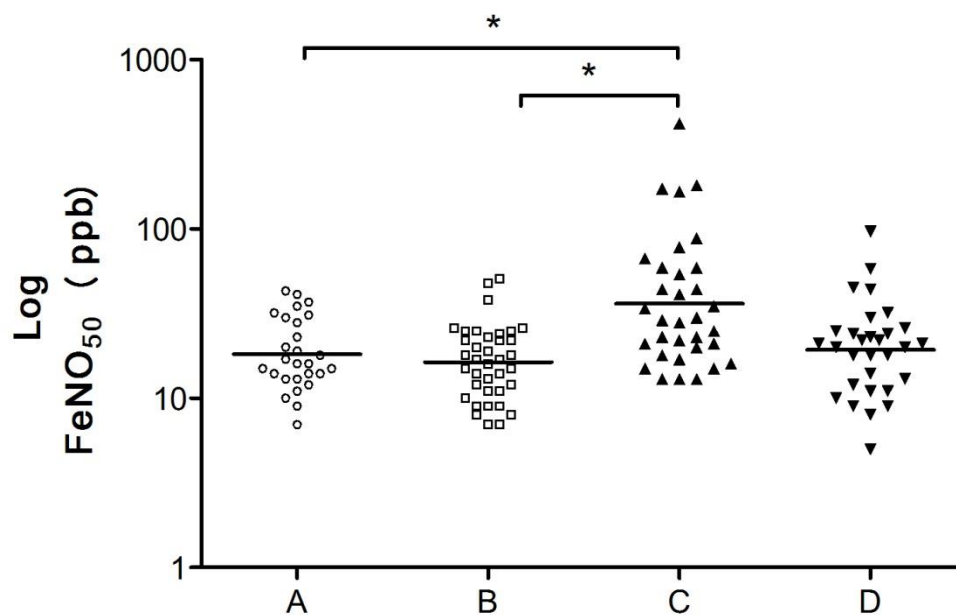


Figura 2: EBC- H₂O₂ (mediana); * p<0,05

Legenda: A: controlli sensibilizzati; B: controlli non sensibilizzati; C lavoratori a contatto con AL sensibilizzati; D: lavoratori a contatto con AL non sensibilizzati.

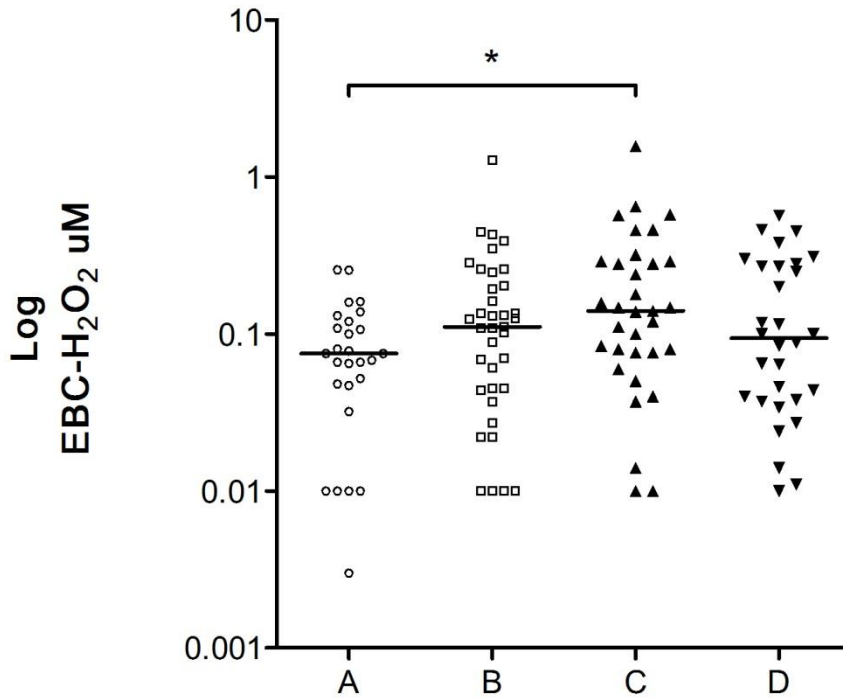


Figura 3a: valori di SP-A sierici (mediana)

Legenda: A: controlli sensibilizzati; B: controlli non sensibilizzati; C lavoratori a contatto con AL sensibilizzati; D: lavoratori a contatto con AL non sensibilizzati.

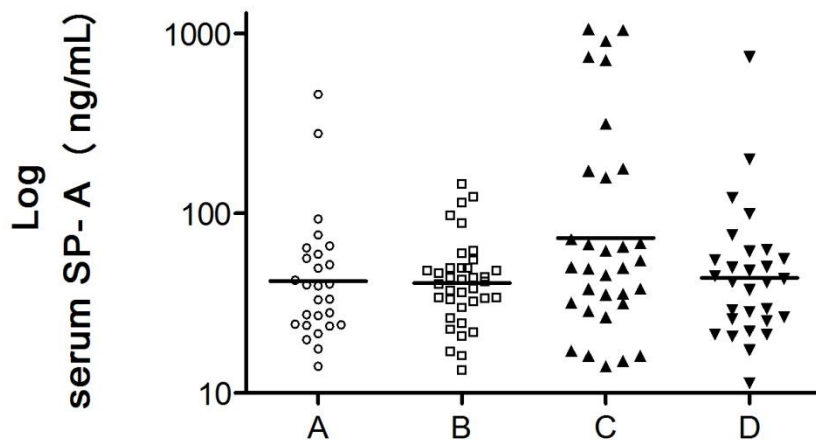


Figura 3b: valori di SP-A sierici in lavoratori a contatto con AL sulla base dei sintomi riferiti (mediana); ** p<0,01

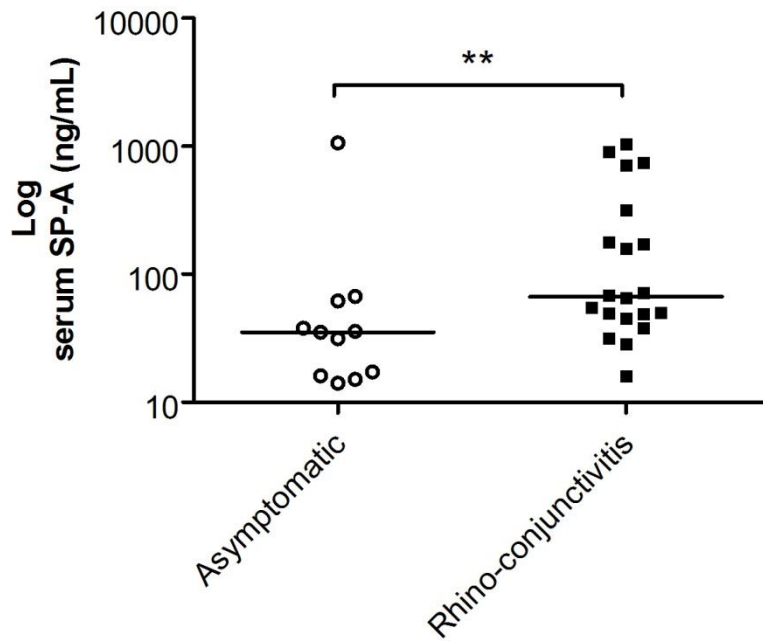


Figura 4: valori di SPD sierici (media geometrica); * p<0,05

Legenda: A: controlli sensibilizzati; B: controlli non sensibilizzati; C lavoratori a contatto con AL sensibilizzati; D: lavoratori a contatto con AL non sensibilizzati.

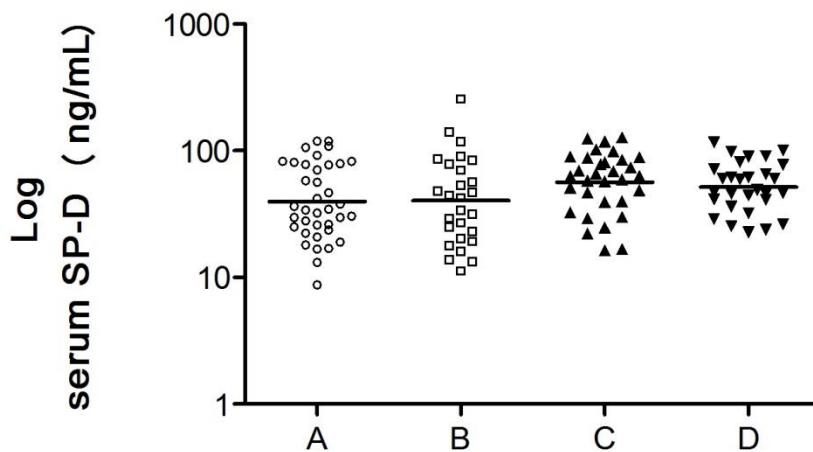
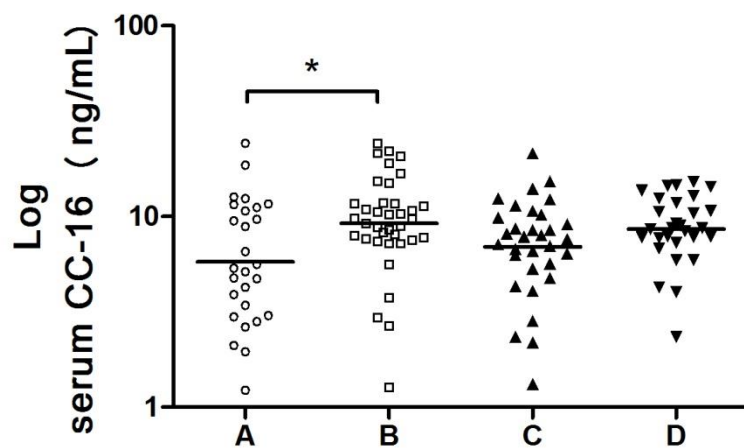


Figura 5: valori di CC-16 (media geometrica); * $p < 0,05$

Legenda: A: controlli sensibilizzati; B: controlli non sensibilizzati; C lavoratori a contatto con AL sensibilizzati; D: lavoratori a contatto con AL non sensibilizzati.



SECONDO STUDIO

INTRODUZIONE

I risultati dei test spirometrici sono di fondamentale importanza in ambito occupazionale sia nei programmi di screening per la diagnosi precoce di malattie respiratorie lavoro-correlate che in quelli di sorveglianza sanitaria per l'intera popolazione lavorativa al fine di monitorare gli effetti a breve ed a lungo termine dell'esposizione ad inalanti e il mantenimento di efficaci misure di prevenzione. I risultati della spirometria sono altamente affidabili nella diagnosi del pattern ostruttivo utilizzando le linee guida dell'American Thoracic Society e della European Respiratory Society (ATS/ERS). Tuttavia, diversi studi epidemiologici (154-157) hanno evidenziato che una parte consistente della popolazione presenta pattern spirometrici anomali, non di tipo ostruttivo con una prevalenza variabile in base all'età della popolazione in studio (158), al gruppo etnico (155) all'uso di diversi set teorici di riferimento e criteri interpretativi per la diagnosi (159,160). La prevalenza di tali pattern non ostruttivi (dal 5,4 al 22,6%), genericamente definiti come pattern restrittivi (rapporto FEV₁/VC normale con una riduzione della VC), è superiore rispetto alla prevalenza delle patologie interstiziali (restrittive pure) nella popolazione generale. La sola spirometria in effetti è utile per escludere patologie restrittive (NPV>98%) ma non è in grado di diagnosticarle in modo attendibile per il basso PPV (<60%). La diagnosi di certezza richiede infatti ulteriori accertamenti di secondo livello (pletismografia corporea e DLCO) spesso di difficile esecuzione in ambito di sorveglianza sanitaria per la popolazione lavorativa esposta ad inalanti. Nel corso degli anni sono stati proposti vari algoritmi per identificare con il solo uso dei dati spirometrici i soggetti da indirizzare ad esami di secondo livello, in quanto a maggior probabilità di avere una reale patologia restrittiva. Quest'ultima è diagnosticabile, secondo il gold-standard ATS/ERS, in presenza di TLC <LLN alla pletismografia corporea (161-167).

E' nota da tempo l'associazione tra esposizione a silice libera cristallina e patologia polmonare restrittiva (silicosi nodulare e fibrosi massiva progressiva), sebbene è riportato che l'esposizione a silice possa determinare anche alterazioni di tipo ostruttivo (168-170). E' stato osservato come la maggiore profusione radiografica ILO (silicosi nodulare) sia proporzionale ad un aumento della prevalenza di pattern restrittivi, mentre un aumento statisticamente significativo del pattern ostruttivo e misto sia associato alla fibrosi massiva progressiva (171). In letteratura non ci sono risultati univoci riguardo alla riduzione dei parametri respiratori spirometrici conseguente all'esposizione a silice, in assenza di silicosi radiograficamente evidente. Studi su lavoratori nell'escavazione del granito a Singapore (171) e Svezia (172), su addetti alla smerigliatrice nella lavorazione dell'agata in India (173), su lavoratori nella produzione di laterizi in Cina (174), su

cercatori d'oro in Sud Africa (175), hanno trovato un'associazione tra livelli di esposizione di silice al di sopra del limite di esposizione consentito OSHA (Occupational Safety and Health Administration) (0,10 mg/m³, superiore al valore accettato NIOSH di 0,025 mg / m³) e la perdita della funzione polmonare in individui senza silicosi. In uno studio su lavoratori di fonderia in USA (176) gli autori hanno trovato una perdita/anno di 1,1 mL del FEV₁ e di 1.6 ml di FVC per mg/m³ di esposizione media alla silice libera cristallina.

Silice

La silice (Si) è un elemento ampiamente diffuso su tutta la crosta terrestre, rappresentando il 25% del peso complessivo. Si presenta come un tetraedro con un atomo centrale di silicio legato a 4 atomi di ossigeno, a loro volta legati ad altri atomi di silicio e la si può ritrovare sotto forma di silice “libera” (costituita da ioni Si e O) o di silice “combinata” (in combinazione con cationi in varie forme di silicati) come l’asbesto. In particolare la SiO₂ (silice libera) può complessarsi in strutture cristalline (quarzo) o in complessi amorfi (177).

Si distinguono le seguenti forme mineralogiche:

- Silice cristallina: quarzo, tridimite, cristobalite, coesite, stishovite
- Silice amorfa anidra: pietra pomice, silice fusa o vetro di quarzo (di natura vulcanica)
- Silice amorfa idrata: farina fossile o terra di diatomee (di origine organica)

La silice cristallina è la forma maggiormente dotata di potere sclerogeno per il polmone e il quarzo è la forma più diffusa in natura. La varietà di silice cristallina termodinamicamente stabile sulla Terra è il quarzo- α , altre varietà di silice cristallina (tridimite- α e cristobalite- α), pur essendo instabili alle condizioni di temperatura e pressione dell’atmosfera terrestre, si trovano in natura in quanto ritornano lentamente in fase stabile. Riguardo le caratteristiche chimico fisiche, il quarzo- α (trigonale) alla temperatura di 573°C si trasforma in quarzo- β (esagonale) che a 867°C si trasforma in tridimite (esagonale), la quale si trasforma in cristobalite (tetragonale) a 1470°C. Quest’ultima alla temperatura di 1713°C passa allo stato liquido. Lasciando raffreddare rapidamente, la silice liquida si trasforma in silice amorfa, non cristallizzabile, stabile a temperatura ambiente e tipica delle farine fossili e delle diatomee.

Il quarzo è un minerale piezoelettrico, trigonale nella forma α ed esagonale nella forma β , ha durezza 7 e densità 2.65 g/cm³. È un componente delle rocce magmatiche acide, sia plutoniche che vulcaniche (tra cui il granito, l'ardesia e l'arenaria).

Tossicità

La tossicità delle varie specie di silice cristallina dipende dalla cristallinità, dall'origine della polvere, dall'idrofilia, dalla freschezza di taglio e dalla contaminazioni delle superfici. La silice cristallina è caratterizzata da una struttura spaziale regolare e presenta un'elevata tossicità cellulare, a tal proposito le diverse forme (quarzo, tridimite e cristobalite) sono riconosciute come sicuramente responsabili di silicosi, in particolare Tridimite e Cristobalite hanno tossicità superiore a quella del quarzo.

La silice amorfa, caratterizzata da una struttura spaziale irregolare, sembra non essere tossica; mentre ancora discussa è la tossicità di coesite e terra di diatomee.

Patogenesi

L'inalazione di polvere di silice cristallina può causare la silicosi, la bronchite, o il cancro (**178-180**). La silicosi è caratterizzata da infiammazione cronica e cicatrici nei lobi superiori dei polmoni che possono essere classificate in base alla quantità inalata, il periodo di tempo, e la durata dell'esposizione (**179-181**). La silicosi cronica semplice è la forma più comune, che si verifica dopo 15-20 anni di bassa-moderata esposizione a silice cristallina respirabile. La forma accelerata si verifica dopo 5-10 anni di elevate esposizioni a silice cristallina respirabile, e la silicosi acuta, o silicoproteinosi, si verifica dopo un paio di mesi o fino a 5 anni a seguito di esposizioni a concentrazioni estremamente elevate di silice cristallina respirabile. La forma acuta è la forma più grave di silicosi. La fisiopatologia della silicosi comporta la deposizione di particelle a livello alveolare. L'ingestione di queste particelle da parte dei macrofagi alveolari avvia una risposta infiammatoria, che stimola i fibroblasti a proliferare e produrre collagene. Le particelle di silice sono avvolte da collagene e ciò conduce a fibrosi e lesioni nodulari caratteristiche della malattia. Studi in animali da laboratorio hanno rivelato differenze nelle risposte infiammatorie indotte da silice e silicosi (**182-184**), sostenendo che le interazioni gene-ambiente sono importanti per la gravità della malattia.

Condizioni associate

La silicosi è associata con un incremento del rischio di:

- Tumore al polmone. La IARC nella monografia n°100c del 2012 classifica la silice cristallina come cancerogeno di classe 1, ovvero sostanze certamente cancerogene per l'uomo. Stabilisce, inoltre che la silice cristallina inalata sotto forma di quarzo o cristobalite da fonti occupazionali risulta cancerogena per l'uomo. Specifica però che la cancerogenicità non è stata rilevata in tutte le realtà industriali esaminate e che è considerata prioritaria l'associazione cancerogeno-attività industriale. Le attività industriali individuate dalla IARC sono: miniere di minerali metalliferi; cave e lavorazioni del granito ed altri lapidei; ceramica, sanitari, terraglia, mattoni refrattari; fonderie.
- Tubercolosi. Il 25% dei pazienti affetti da silicosi sviluppa tubercolosi polmonare. Deve essere sempre sospettata quando compaiono sintomi quali, febbre, astenia, peggioramento della dispnea associati a cambiamenti alla radiografia/TAC del torace. In particolare i reperti radiologici includono, noduli asimmetrici, consolidazioni e cavitazioni. Quest'ultime rappresentano i più forti indicatori di silicotubercolosi, tuttavia non sono specifiche in quanto possono anche essere dovute a fenomeni ischemici all'interno delle masse silicotiche, possono essere ritrovate infatti anche ai radiogrammi della silicosi accelerata.
- Patologie del tessuto connettivo. Molto forte è l'associazione silicosi-sclerodermia denominata sindrome di Erasmus, in quanto descritta per la prima volta da Erasmus nel 1957 in minatori d'oro del Sud Africa. Dal punto di vista clinico è possibile distinguere 3 fasi:
 1. fase iniziale, con lesioni sclero-atrofiche digitali generalmente precedute da lesioni vasomotorie simil-Raynaud.
 2. fase di cronicizzazione, nella quale le suddette lesioni si estendono al polso, all'avambraccio al viso e al torace. Si associano in genere alterazioni articolari e muscolari e può insorgere interessamento esofageo.
 3. fase tardiva, con evoluzione verso l'exitus. Caratterizzata dal progressivo sviluppo di insufficienza renale, comparsa di ipertensione essenziale maligna, sclerosi miocardia, iposistolia tardiva, fibrosi interstiziale polmonare con grave dispnea a riposo.

La diagnosi si avvale della radiografia del torace che mostrerà le caratteristiche tipiche della pneumoconiosi associate ad ispessimenti pleurici; delle prove di funzionalità respiratoria che metteranno in evidenza un quadro restrittivo; del BAL che mostrerà ipercellularità costante, alveolite e neutrofilia.

Altre possibili associazioni sono silicosi e artrite reumatoide, LES, connettivite mista, vasculite sistemica, nefropatie glomerulari. La sindrome di Caplan-Colinet è la combinazione di molteplici noduli polmonari periferici ben definiti nei pazienti esposti a polveri inorganiche e l'artrite reumatoide. Anche se è stata descritta per la prima volta nei minatori, la prevalenza sembra essere maggiore in individui esposti a silice e nei pazienti con silicosi. Si tratta di una poliartrite cronica evolutiva associata a immagini radiologiche suggestive di pneumoconiosi.

- Bronchite cronica. L'esposizione a silice anche in assenza di alterazioni radiografiche caratteristiche è associata con un eccessivo declino della performance spirometrica. Sintomi quali tosse e catarro sono abbastanza frequenti nei lavoratori con esposizione professionale a polvere di silice.

Epidemiologia

La silicosi è particolarmente diffusa nei paesi con basso livello socio economico, dove la patologia è spesso sottostimata a causa della scarsa sorveglianza sanitaria. La silicosi è diffusa anche nei paesi sviluppati. Circa 600000 lavoratori nel Regno Unito e più di 3 milioni di lavoratori in Europa sono stati esposti a silice cristallina dal 1990 al 1993. Nel Regno Unito tra il 1996 e il 2009 sono stati segnalati meno di 100 casi ogni anno e le morti per silicosi si sono ridotte da 28 nel 1993 a 10 nel 2008. Negli Stati Uniti nel 1993, più di 121000 lavoratori sono stati esposti a concentrazioni $\geq 0,05$ mg/m³ di silice cristallina respirabile; dal 1987 al 1996 sono stati registrati da 3600 a 7300 casi di silicosi all'anno; il tasso di mortalità corretto per l'età globale è sceso da 8,9 per milione nel 1968, a 0,7 nel 2004.

Esposizione professionale

Le lavorazioni che possono comportare un'esposizione a silice con conseguente rischio di silicosi sono: l'industria estrattiva, lo scavo di gallerie, la lavorazione delle pietre (macinatori di quarzite, scalpellini di granito), l'industria della ceramica (miscelazione, macinazione, smaltatura) e degli abrasivi, lavori nelle fonderie, la sabbiatura, la demolizione e il rifarcimento dei forni di fusione delle acciaierie, le industrie del vetro e dei refrattari (nella fase di preparazione e di macinazione delle sabbie e delle quarziti utilizzate) e i cicli tecnologici che utilizzano cristalli di quarzo. Tuttavia, nonostante la silicosi in tali attività sembra in riduzione, sono stati descritti negli ultimi anni casi di silicosi per esposizioni inusuali, quali la produzione di gioielli, la sabbiatura per lo scolorimento dei jeans, l'uso e la produzione di materiale per la pulizia dentale.

Misure di prevenzione

Le misure di prevenzione suggerite dal NIOSH includono misure di prevenzione primaria, secondaria e terziaria.

Le misure di prevenzione primaria riguardano: il controllo dell'esposizione a silice alla fonte, mediante sostituzione dei materiali, modificazioni dei processi e delle attrezzature; il controllo dell'emissione della polvere di silice tramite isolamento della sorgente di emissione, meccanismi di ventilazione per lo scarico, cabine chiuse, sistema di alimentazione dell'aria; il controllo delle polveri di silice a livello della zona attorno al lavoratore mediante informazione e formazione del lavoratore, protezione ed igiene personale, promozione della salute.

Le misure di prevenzione secondaria riguardano: la sorveglianza dell'ambiente di lavoro con valutazione della concentrazione di polvere di silice e valutazione dei rischi per la salute dei lavoratori esposti; sorveglianza della salute dei lavoratori mediante visita preventiva e periodica che includa l'esame obiettivo, la spirometria e la radiografia del torace.

Le misure di prevenzione terziaria attuate qualora siano stati riconosciuti dei rischi o si presentino dei casi di silicosi, includono l'allontanamento dall'ambiente di lavoro, prevenzione delle complicanze e la modificazione dei processi lavorativi.

Valore limite di esposizione

In particolare il TLV ACGIH (Conferenza Americana degli Igienisti Industriali) per la SLC è stato abbassato da $0,1 \text{ mg/m}^3$ al valore di $0,050 \text{ mg/m}^3$ nel 2000 e nel 2006 è stato ridotto a $0,025 \text{ mg/m}^3$.

Inoltre:

- il NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health, ndr) raccomanda un diverso valore: "REL = $0,050 \text{ mg/m}^3$ (dal 1974)";
- "lo SCOEL europeo (Scientific Committee on Occupational Exposure Limit Values, ndr) ha indicato un VLE < $0,050 \text{ mg/m}^3$ per la SLC (2002);
- in Europa e in Italia le varie forme di SLC non sono classificate".

COMPARTO LAVORATIVO ANALIZZATO

Il comparto analizzato è quello dell'estrazione di argille da cava a cielo aperto in giacimenti collinari e la successiva lavorazione per arrivare al prodotto finito impacchettato o sfuso (Argilla espansa). Le argille vengono estratte mediante escavazione con le normali macchine da movimento terra. Sono poi lasciate all'aperto, a stagionare, per diversi mesi. Caldo, freddo, pioggia e gelo compiono una prima "lavorazione". Successivamente l'argilla viene omogeneizzata, inumidita e sbriciolata con molazze e laminatoi.

Il processo industriale

Essiccazione, cottura ed espansione

Questa fase della lavorazione avviene in forni rotanti lunghi un centinaio di metri. L'argilla entra nel forno da una estremità e ne percorre tutta la lunghezza aumentando gradualmente la sua temperatura. All'estremità opposta del forno la temperatura raggiunge i 1200 °C circa; a questo punto l'argilla raggiunge lo stato pastoso (di incipiente fusione) ed inizia il processo di espansione. Il rotolamento dei granuli all'interno del forno conferisce loro la forma rotondeggiante e provoca la formazione della scorza esterna, compatta e resistente. Il ciclo produttivo è completamente monitorato ed i fumi vengono depurati con un elettrofiltro.

I premiscelati

Un reparto dello stabilimento è riservato alla produzione dei premiscelati a base di argilla espansa. Vi si trovano i sili dei leganti, le apparecchiature di dosaggio e miscelazione nonché il reparto di insaccaggio.

I laboratori

Annessi agli stabilimenti vi sono i laboratori per il controllo chimico – fisico – prestazionale, sia delle materie prime che dei prodotti.



SCOPO

I lavoratori del comparto produttivo dell'argilla espansa preso in esame, in virtù delle varie fasi di lavorazione (specifici per ogni mansione), sono esposti a silice libera cristallina nota per causare alterazioni di tipo restrittivo/ostruttivo.

Sono stati analizzati trasversalmente e longitudinalmente i parametri di funzionalità respiratoria di un gruppo di 58 lavoratori del comparto produttivo (56M, 2F) a rischio di esposizione inalatoria a silice libera cristallina. In tutti i lavoratori era disponibile una RX del torace recente (2014-2015) che dimostrava l'assenza di lesioni pneumoconiotiche (ILO-BIT 0/0).

I parametri spirometrici sono poi stati confrontati con i dati di monitoraggio ambientale della silice libera cristallina, e con i dati antropometrici disponibili dalle cartelle sanitarie e di rischio.

METODI

La popolazione in studio comprende 58 lavoratori (56 M 2 F) su un totale di 93 dipendenti che comprendono 51 soggetti la cui attività si svolge esclusivamente nei reparti produttivi e 7 con attività di tipo tecnico o di laboratorio e che pertanto lavorano saltuariamente nei reparti produttivi. La popolazione in studio ha un'età di 48 anni (mediana 27-62 min-max) con un numero minimo di

osservazione nell'arco degli anni 2001-2015 di 3 osservazioni fino ad un massimo di 8 osservazioni (mediana di anni di osservazione 12; 2-13 min-max).

Sono stati valutati i risultati delle spirometrie eseguite in azienda direttamente dal medico competente con strumentazione portatile (spirometro Pony Cosmed) nel periodo dal 2001 al 2015.

Tale periodo è stato scelto in quanto i dati spirometrici disponibili risultavano di buona qualità ed eseguiti tutti con la stessa strumentazione e dallo stesso operatore.

E' stata eseguita valutazione trasversale per evidenziare la presenza di pattern ostruttivi/restrittivi secondo i criteri interpretativi ATS/ERS 2005 con teorici GLI-2012 sull'ultimo dato disponibile del 2015. E' stata poi eseguita valutazione longitudinale del decremento longitudinale con il programma SPIROLA (NIOSH) per i parametri FEV₁ e FVC (European equation).

Sono stati inoltre raccolti i dati antropometrici (razza, altezza, BMI) e di abitudine tabagica (si/no), i risultati di monitoraggio ambientale (polverosità totale mg/m³ e silice libera cristallina mg/m³) e i risultati della RX torace semplice dalle cartelle sanitarie e di rischio. Questi sono stati correlati con i parametri spirometrici.

I dati di monitoraggio ambientale sono stati raccolti nell'arco di vari anni da vari laboratori e attraverso diverse metodologie. L'esposizione a silice libera cristallina è stata considerata sulla base dei dati di monitoraggio ambientale compiuto in diversi anni dall'azienda e forniti. Nello specifico sono stati forniti i dati della campagna 2003, 2008, 2014 e 2015. I dati riportati derivano da campionamenti d'area e personali. I dati della campagna 2003 non sono stati considerati attendibili in quanto fornivano esclusivamente dati di campionamento con postazione fissa mediante separatore Lippman. Nelle successive campagne invece sono state eseguite determinazioni mediante campionatori personali dotati di separatore di tipo Dorr-Oliver e campionamento in postazioni tramite separatore Lippmann per le mansioni successivamente descritte.

La mansione di riferimento è stata considerata quella prevalente nell'arco degli anni analizzati nell'arco di tempo 2004-2015 come fornito dalla dirigenza aziendale e dal medico competente.

Per ogni lavoratore è stata attribuita un'esposizione media cumulativa sulla base della mansione prevalente dichiarata.

Da un colloquio con il responsabile di produzione, il medico competente aziendale e RSPP sono state individuate le mansioni omogenee dei vari dipendenti sulla base della tipologia di attività eseguita e sede prevalente della stessa (Tabella 11).

Tabella 11: area di lavoro e mansioni individuate

Area di lavoro	Mansione
Zona forno	Fuochista Aiuto fuochista
Insacco	Operatore addetto insacco prodotti speciali (premiscelati) Operatore addetto insacco argilla espansa
Piazzale carico	Operatore addetto al carico sfuso con pala Operatore addetto al carico da impianto
Piazzale frantumazione	Operatore addetto frantumato con pala meccanica Operatore addetto frantumato
Sala macchine	Addetto sala macchine
Cabina vagliatura	Operatore addetto alla vagliatura
Officina meccanica	Manutentore Elettricista
Magazzino	Magazziniere
Ufficio tecnico	Impiegato tecnico
Laboratorio	Laboratorio chimico Laboratorio tecnologico Laboratorio prove

L'esposizione media cumulativa è per polverosità totale respirabile e silice libera cristallina in unità di massa (mg / m³) calcolata secondo la seguente formula (176):

Esposizione media cumulativa = media dati di monitoraggio ambientale (campionatori d'area e personali) nel periodo analizzato 2004-2015 x durata di esposizione (anni di attività)

L'esposizione è stata poi considerata sulla base del TLV ACGIH dividendo così le mansioni in tre categorie:

- Non esposto: valori di esposizione a silice libera cristallina < ad 1/10 del TLV ACGIH (<0,0025 mg/m³).
- Bassa esposizione: valori di esposizione a silice libera cristallina tra 1/10 e TLV ACGIH (0,0025-0,025 mg/m³)
- Alta esposizione: valori di esposizione a silice libera cristallina > TLV ACGIH (> 0,025 mg/m³)

Analisi statistica

La normalità delle variabili quantitative è stata testata tramite il test di Kolmogorov-Smirnov. Nel caso in cui venisse testato più di un fattore contemporaneamente, sono stati utilizzati modelli di ANOVA a due/tre vie, riportando la significatività degli effetti principali e dell'interazione tra fattori, ANOVA per misure ripetute è stata eseguita per effettuare il confronto dei dati nell'arco degli anni di osservazione. Infine, le correlazioni sono state eseguite con test di Spearman. Sono stati utilizzati i software IBM SPSS v. 21 (IBM, Armonk, NY, USA) e Graphpad Prism v. 5.0 (Graphpad, La Jolla, CA, USA) ed è sempre stata considerata come soglia di significatività $p=0.05$.

RISULTATI

Popolazione

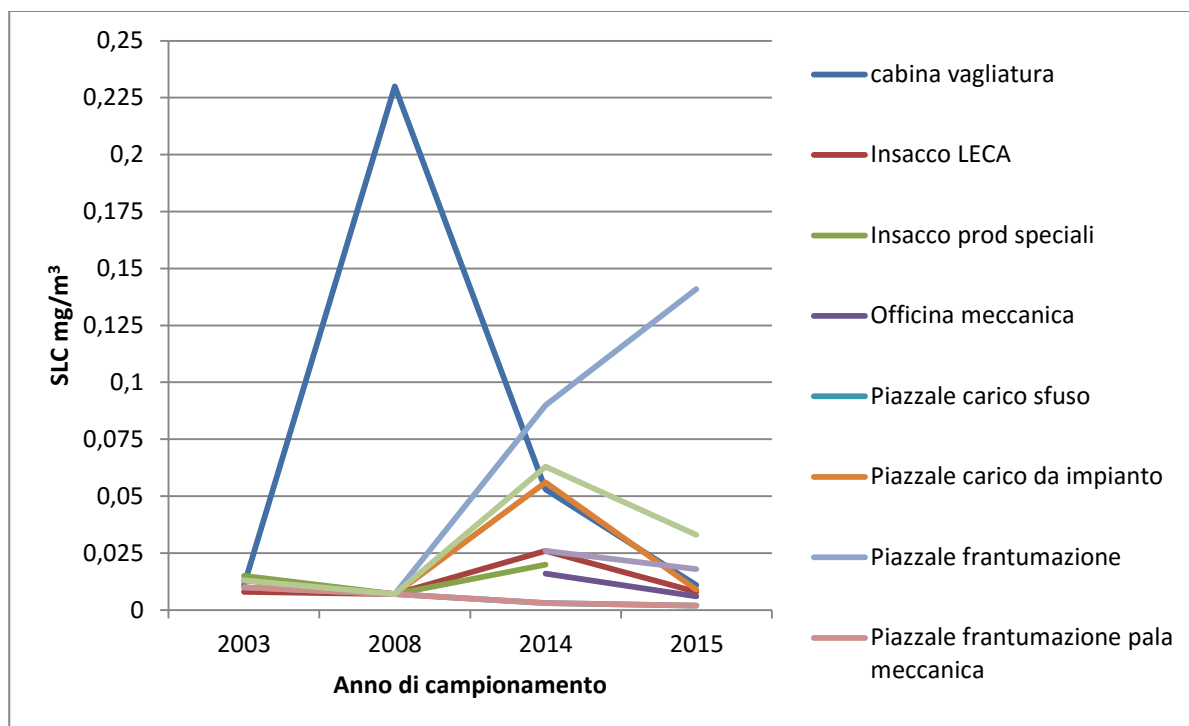
La popolazione iniziale in studio era di 58 soggetti. Sono poi stati scartati 9 soggetti in quanto non erano presenti sufficienti misurazioni o l'arco temporale di follow-up era inferiore a 3 anni per garantire l'attendibilità del dato longitudinale. Nella popolazione in esame pertanto i dati antropometrici sono riassunti in tabella 12

Tabella 12: Caratteristiche antropometriche

Sesso (M/F)	47/2
Età mediana (min-max)	51 (34-62)
Abitudine tabagica (si/no)	27/20
BMI mediana (min-max)	25,6 (20,7-43,6)

Monitoraggio ambientale e dati di esposizione media cumulativa

Figura 6: Dati di monitoraggio ambientale silice libera cristallina nel 2003, 2008, 2014 e 2015 per mansione



Sulla base dei dati di monitoraggio ambientale (Figura 6) è stata attribuita a ciascuna mansione una categoria di rischio (Tabella 13). Ad ogni soggetto è stato poi attribuito un dato di esposizione cumulativa media secondo la formula riportata nei metodi.

Tabella 13: media dei valori di monitoraggio ambientale per ciascuna mansione (in rosso mansioni categorizzate come ad alto rischio, in giallo mansioni a basso rischio, in verde non esposti).

Area di lavoro	Mansione	Media SLC mg/m ³ (2008-2015)
Zona forno	Fuochista Aiuto fuochista	0,0220
Insacco	Operatore addetto insacco prodotti speciali (premiscelati)	0,0135
	Operatore addetto insacco argilla espansa	0,0137
Piazzale carico	Operatore addetto al carico sfuso con pala	0,0040
	Operatore addetto al carico da impianto	0,0240
Piazzale frantumazione	Operatore addetto frantumato con pala meccanica	0,0040
	Operatore addetto frantumato	0,0793

Sala macchine	Addetto sala macchine	0,0343
Cabina vagliatura	Operatore addetto alla vagliatura	0,098
Officina meccanica	Manutentore	0,0040
	Elettricista	0,0040
Magazzino	Magazziniere	<0,0025
Ufficio tecnico	Impiegato tecnico	<0,0025
Laboratorio	Laboratorio chimico	<0,0025
	Laboratorio tecnologico	<0,0025
	Laboratorio prove	<0,0025

Valutazione trasversale spirometria

I dati spirometrici sono stati valutati trasversalmente sull'intera popolazione al 2015.

Alla valutazione trasversale condotta con set teorici di riferimento GLI-2012: 8/58 presentavano $FEV_1/FVC < LLN$ e di questi 4/8 presentavano quadro francamente ostruttivo ($FEV_1/FVC < LLN$ e $FEV_1 < LLN$); 2/8 presentavano pattern misto ($FEV_1/FVC < LLN$ e FEV_1 e $FVC < LLN$), 2/8 presentavano variante borderline ($FEV_1/FVC < LLN$ e $FEV_1 > LLN$). Nei restanti soggetti pattern restrittivo è stato documentato in 5/58 ($FEV_1/FVC > LLN$ e $FVC < LLN$). Il totale di soggetti francamente patologici è risultato pertanto secondo i criteri ATS/ERS di 13/58 (22,4%).

Valutazione longitudinale dei dati spirometrici

La valutazione longitudinale della popolazione in studio è stata condotta tramite programma NIOSH SPIROLA sui parametri FEV_1 e FVC (26). Il programma fornisce come risultato i time-trend dei valori medi del gruppo per FEV_1 e FVC con lo scopo di aiutare il medico ad individuare gli effetti che agiscono a livello di gruppo (a causa di esposizioni professionali o ad esempio per programmi per smettere di fumare) (Figura 7 e 8). Per valutare nel gruppo le modifiche temporali, il programma confronta i valori osservati con la media dei valori stimati dalle equazioni di riferimento standard sulla base dei dati demografici (linea in giallo nelle figure 7 e 8) e lo Z-score previsto (linea in rosso nelle figure 7 e 8). Il parametro Z-score riflette la differenza media tra i valori osservati e previsti espresse nelle unità di deviazione standard, standardizzato per la distribuzione dei dati demografici. Il programma inoltre evidenzia individui con risultati anomali nella cosiddetta lista di rischio sulla base di diversi parametri. Qui di seguito i risultati relativi alla popolazione in studio. 30 soggetti sono stati evidenziati come a rischio (30/58 51,7%); in 5 si osserva un eccessivo decremento longitudinale del $FEV_1 < LLD$ (considerando il declino per età); 7 presentano una pendenza eccessiva e 15 presentano una variazione di FEV_1 eccessiva. Per quanto riguarda il parametro FVC questo è risultato $< LLD$ in 4 (6,9%) (considerando il declino per età); 3 presentano

una pendenza eccessiva e 14 presentano una variazione di FVC eccessiva. In figura 7 e 8 i risultati per l'intero gruppo.

Figura 7: visualizzazione del programma SPIROLA NIOSH dell'andamento del decremento del FEV₁ in mL nel tempo (in verde le medie del gruppo osservate nei vari anni; in rosso le medie attese per età e caratteristiche antropometriche; in rosso z-score ossia discostamento del valore dalla media)

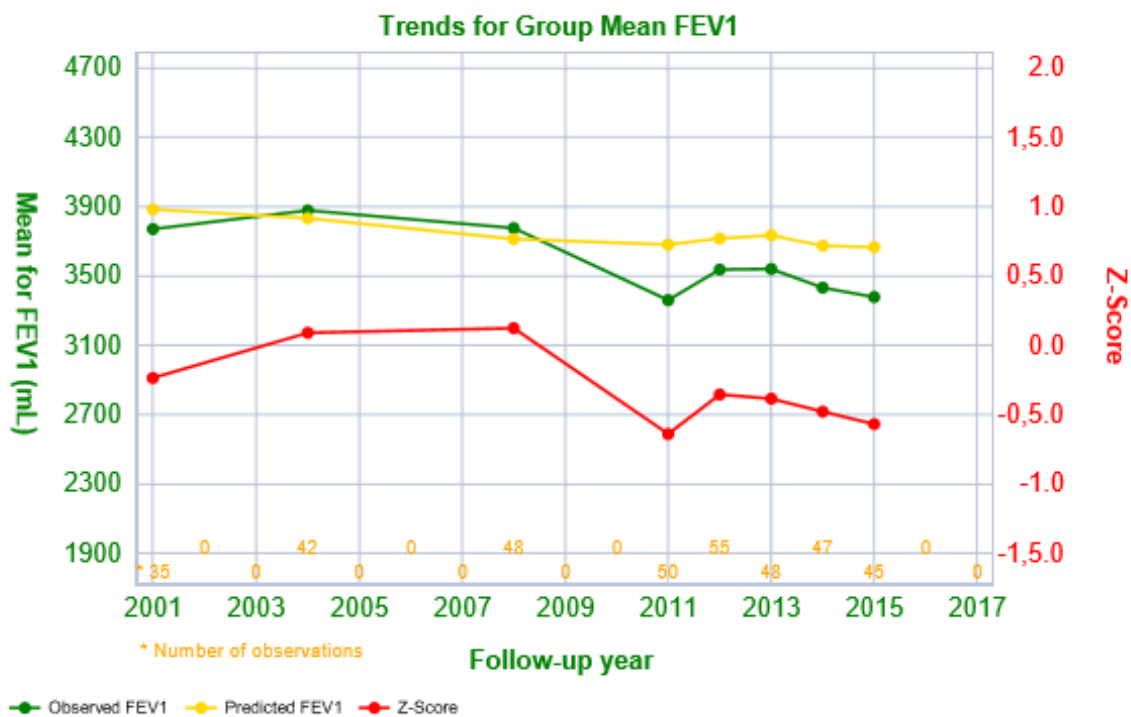
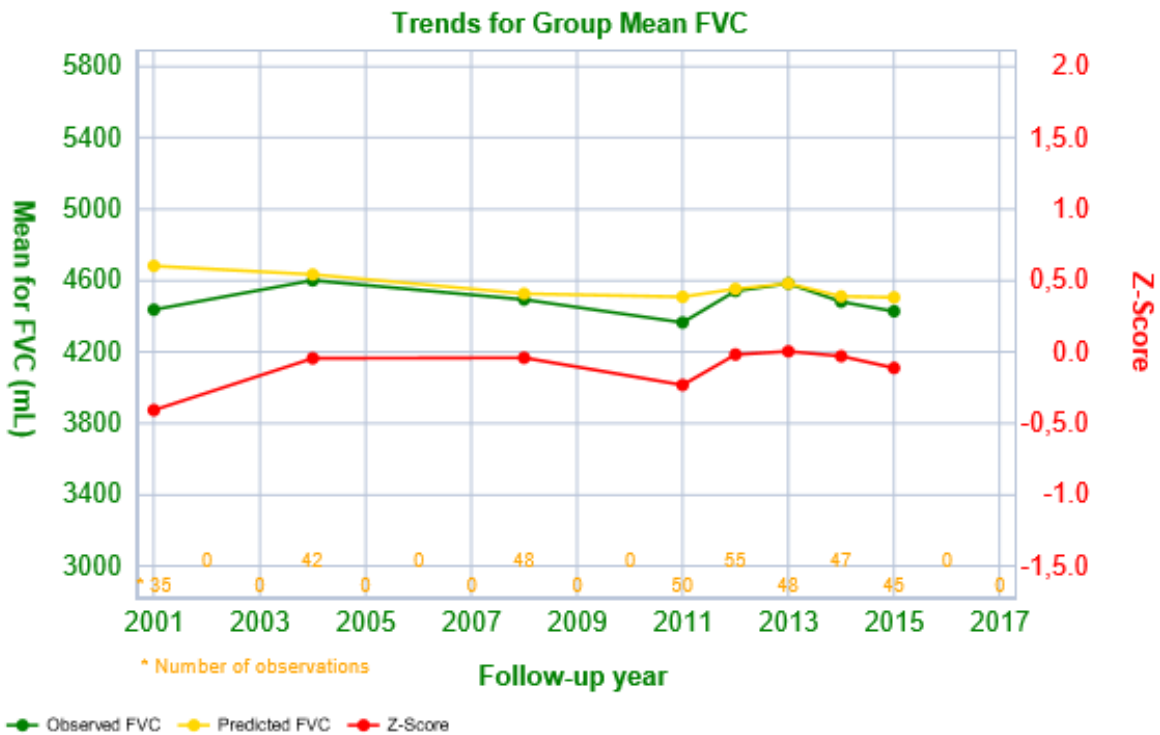


Figura 8: visualizzazione del programma SPIROLA NIOSH dell'andamento del decremento del FVC in mL nel tempo (in verde le medie del gruppo osservate nei vari anni; in rosso le medie attese per età e caratteristiche antropometriche; in rosso z-score ossia discostamento del valore dalla media)



E' stata eseguita analisi longitudinale dei parametri FEV₁, FVC e FEV₁/FVC con ANOVA per misure ripetute ed è stata evidenziata una riduzione statisticamente significativa per FEV₁ e FEV₁/FVC nel corso degli anni come evidenziato in Figura 9 e 10.

Figura 9: FEV₁ % pred GLI.-2012 espresso come mediana - CI (95 pct) per gli anni analizzati. * p<0,05.

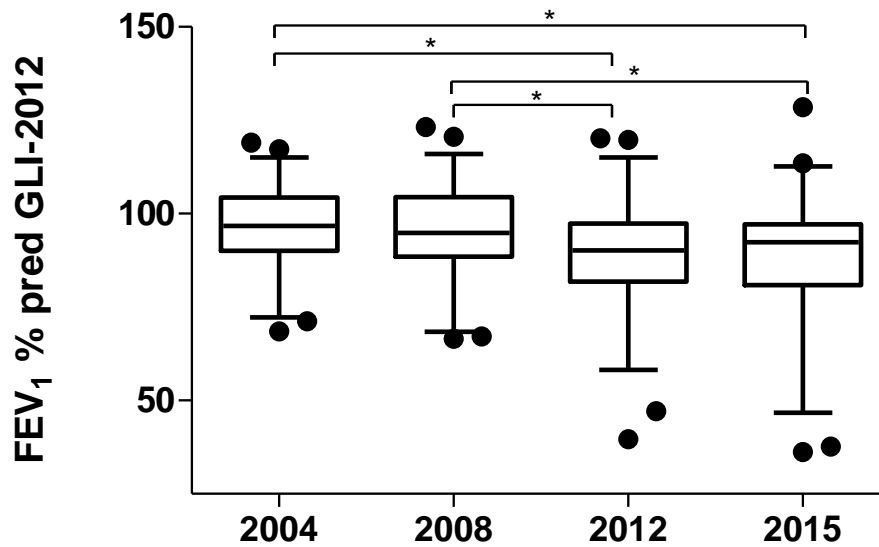
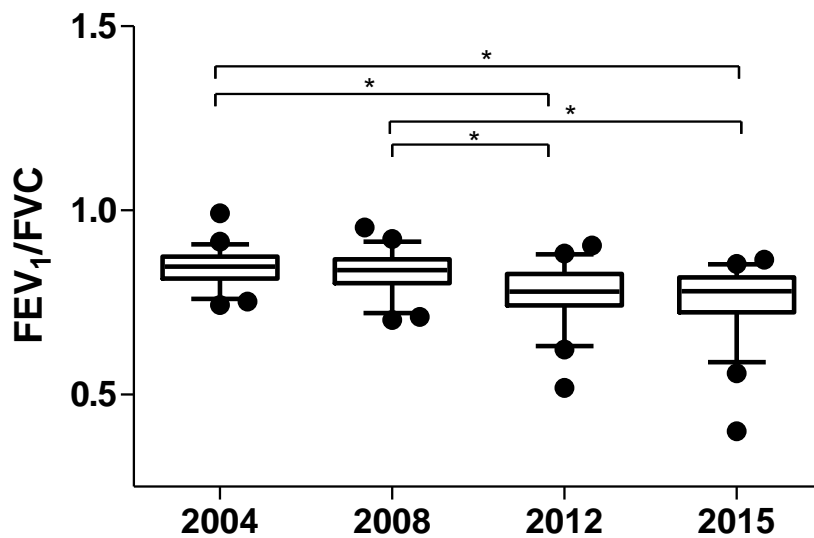


Figura 10: FEV₁/FVC espresso come mediana - CI (95 pct) per gli anni analizzati. * p<0,05.



Il decremento longitudinale si conferma anche suddividendo la popolazione lavorativa in 3 gruppi sulla base dell'entità dell'esposizione a SLC. Vengono riportati i risultati come mediana (IQR) per i vari parametri analizzati in tabella 14 (ANOVA e test Bonferroni ns per differenze tra i tre gruppi). Il calo del valore percentuale rispetto al predetto di FEV₁ si osserva in tutte e tre le categorie ma con un andamento peggiore nel gruppo ad alto rischio considerando la media cumulativa di esposizione. I valori di FVC non presentano lo stesso andamento. Il calo di FEV₁ stimato per anno è superiore a

quello che ci si aspetterebbe nei non fumatori sani in tutte le categorie (cioè, circa il 30 mL / anno) (185).

Le figure 11a, 11b, 11c mostrano il calo dei parametri FEV₁%predGLI-2012, FVC%predgLI-2012, FEV₁/FVC stratificati per mansione a rischio.

Tabella 14: caratteristiche dei dati antropometrici e spirometrici della popolazione in studio in base alla categoria di rischio di esposizione a SLC.

	Mansioni ad alta esposizione	Mansioni a bassa esposizione	Non esposti
Età all'inizio, mediana (IQR)	42 (28-48,3)	39,5 (29,3-47,5)	37 (31,5-42)
Follow-up anni, media ± SD	11,2 ± 2,3	11,8 ± 1,3	11,7 ± 2,5
Altezza cm, media ± SD	176,5 ± 5,5	172,4 ± 6,7	174,3 ± 6,3
BMI	26,6 ± 3,8	28,2 ± 4,9	25,3 ± 2,9
%pred FEV₁ baseline, mediana (IQR)	88,2(83,1-98,8)	95,3 (91,1-102,9)	101,9 (93,1-107,2)
%pred FEV₁ 2015, mediana (IQR)	84,4 (80,3-93,4)	92 (80-96,5)	94,9 (85,7-103,1)
%pred FVC baseline, mediana (IQR)	88,6 (80,9-91,6)	91,8 (87,7-100)	95,5 (90,1-102,8)
%pred FVC 2015, mediana (IQR)	90,4 (81,2-91,8)	92,7 (78,6-102,4)	93,4 (89,4-106)
FEV₁/FVC baseline, mediana (IQR)	0,84 (0,81-0,86)	0,84 (0,81-0,87)	0,87 (0,85-0,90)
FEV₁/FVC 2015,	0,76 (0,72-0,83)	0,79 (0,72-0,82)	0,77 (0,74-0,80)

mediana (IQR)			
ΔFEV₁ ml/year, mediana (IQR)	47 (34,5-60,5)	47 (39-68)	44,5 (34,5-67,25)

Figura 11a: calo del FEV₁ espresso come %pred secondo i teorici GLI-2012 stratificato per categoria di rischio (mediana-IQR)



Figura 11b: calo del FVC espresso come %pred secondo i teorici GLI-2012 stratificato per categoria di rischio (mediana-IQR)

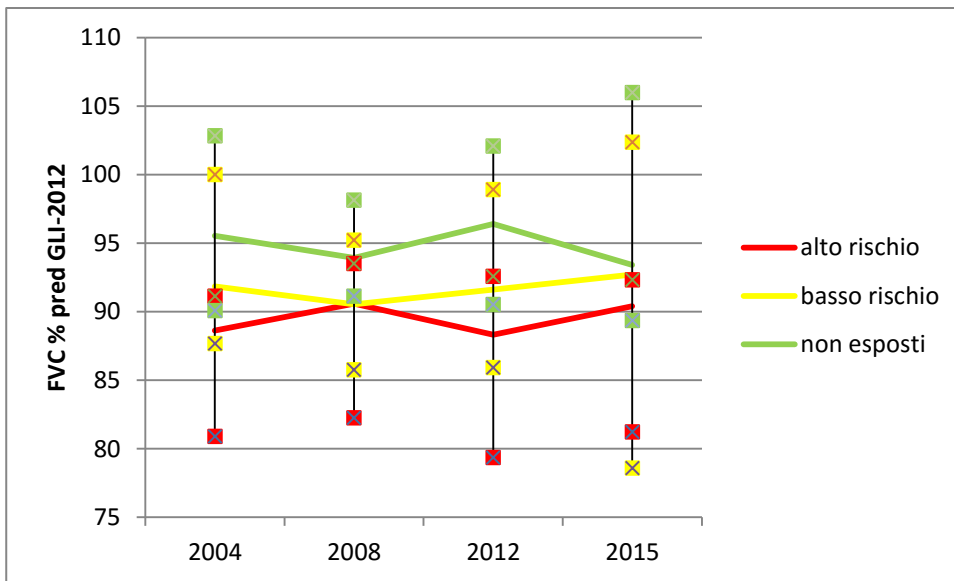
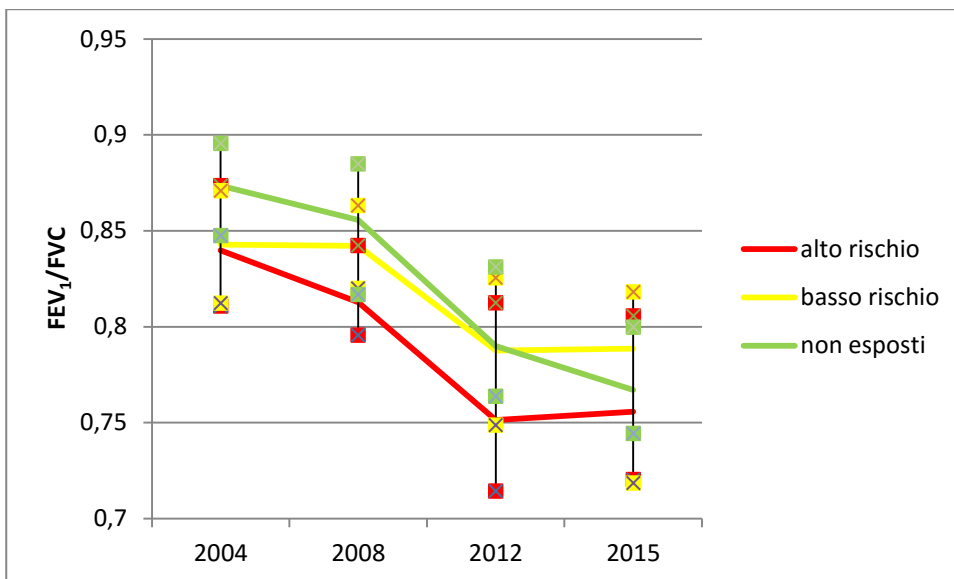


Figura 11c: andamento del parametro FEV_1/FVC stratificato per categoria di rischio (mediana-IQR)



E' stata poi eseguita una correlazione per evidenziare una possibile causa del decremento del parametro FEV_1 e FVC nel gruppo analizzato. Sono state eseguite correlazioni con il fumo, il BMI considerato come variazioni nell'arco del periodo analizzato e l'entità dell'esposizione a SLC considerata come esposizione media cumulativa. I risultati sono riportati in tabella 15. Si evidenzia come sia presente una correlazione positiva tra il decremento del FEV_1 e della FVC e l'esposizione cumulativa, come anche evidente dalle figure 12a e 12b.

Tabella 15: correlazioni tra decremento longitudinale per il parametro FEV₁ e FVC e fumo, variazioni di BMI, anzianità lavorativa ed esposizione media cumulativa

		Fumo	Δ BMI	Anzianità lavorativa	Esposizione media cumulativa (SLC)
Decremento del FEV ₁	Coefficiente Correlazione	-,070	-,063	-,015	,298*
	Sig. (2-tailed)	,634	,669	,916	,038
	N	49	49	49	49
Decremento della FVC	Coefficiente Correlazione	-,070	-,111	,026	,343*
	Sig. (2-tailed)	,632	,446	,861	,016
	N	49	49	49	49

Figura 12a: variazioni del parametro FVC (ml/year) per esposizione a SLC (rho Spearman 0,298 p=0,038)

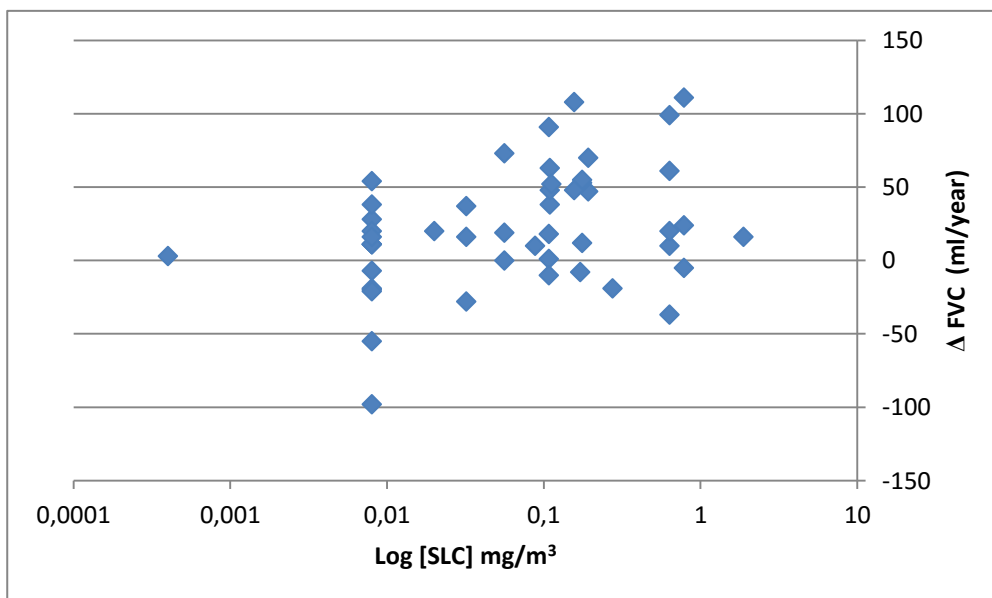
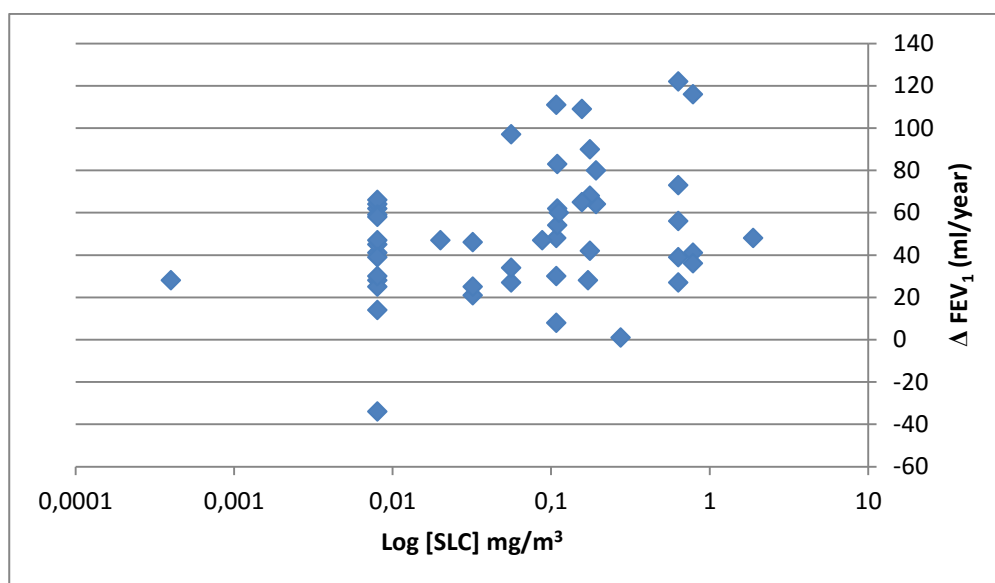


Figura 12b: variazioni del parametro FVC (ml/year) per esposizione a SLC (rho Spearman 0,343 p=0,016)



DISCUSSIONE

L'esposizione a silice libera cristallina nell'estrazione e lavorazione dell'argilla è documentata dai dati di monitoraggio ambientale. Non sono disponibili dati in letteratura per lo stesso comparto lavorativo, sebbene la movimentazione della terra e l'escavazione siano fra le attività riconosciute come possibili fonte di esposizione a SLC e cancerogene dalla IARC (186).

L'esposizione inalatoria a SLC è in grado di causare patologie ostruttive, silicosi e quest'ultima condizione appare essere correlata ad un aumentato rischio di cancro polmonare (187). Scopo della sorveglianza sanitaria pertanto è quello di informare e formare i lavoratori sui rischi da esposizione a polveri respirabili, di individuare condizioni di ipersuscettibilità per lo sviluppo di patologie respiratorie, di monitorare il livello e le variazioni nel tempo della funzione polmonare, per prevenire un peggioramento attribuibile all'esposizione lavorativa, per stabilire e mantenere la compliance dei lavoratori nell'indossare i dispositivi di protezione individuale. L'esecuzione della spirometria è un cardine dei protocolli di sorveglianza sanitaria in quanto semplice da eseguire anche in ambiente di lavoro e non invasivo. L'esecuzione corretta della manovra spirometrica non può prescindere dall'utilizzo di una strumentazione calibrata, da un adeguato training dell'operatore e da un'adeguata compliance del paziente. L'interpretazione può essere influenzata, inoltre, dal tipo di teorici usati come riferimento, dall'aggiustamento degli stessi in base all'etnia se differente dagli standard in uso e dalla selezione di algoritmi per l'identificazione dei deficit funzionali proposti da varie organizzazioni scientifiche. In ambito occupazionale, una corretta interpretazione dei dati spirometrici consente di identificare con maggiore confidenza e precocemente le modificazioni

funzionali attribuibili all'esposizione lavorativa; l'attenzione maggiore è rivolta soprattutto alla diagnosi precoce dei deficit funzionali di tipo ostruttivo ($FEV_1/FVC < LLN$ e $FEV_1 < LLN$). Il pattern restrittivo può essere evidenziato dalla spirometria eseguita con la sola curva flusso-volume, in presenza di un rapporto $FEV_1/FVC > LLN$ e $FVC < LLN$ ma è necessaria l'esecuzione di esami di secondo livello per la diagnosi definitiva.

La SLC è nota causare patologie polmonari restrittive (silicosi nodulare e fibrosi massiva progressiva), sebbene è riportato che l'esposizione a silice possa determinare anche alterazioni di tipo ostruttivo (**168-170**). Lo scenario attuale di esposizione è notevolmente ridotto, grazie anche all'uso di DPI delle vie aeree idonei e alla scelta di opportuni mezzi di confinamento delle lavorazioni polverose. Da dati americani la silicosi appare in riduzione (**187**), d'altro canto è opportuno mantenere l'attenzione sui parametri di funzionalità respiratoria. In letteratura non ci sono risultati univoci riguardo alla riduzione dei parametri respiratori spirometrici conseguente all'esposizione a silice, in assenza di silicosi radiograficamente evidente. Studi su lavoratori nell'escavazione del granito a Singapore (**171**) e Svezia (**172**), su addetti alla smerigliatrice nella lavorazione dell'agata in India (**173**), su lavoratori nella produzione di laterizi in Cina (**174**), su cercatori d'oro in Sud Africa (**175**), hanno trovato un'associazione tra livelli di esposizione di silice e la perdita della funzione polmonare in individui senza silicosi.

Nei lavoratori analizzati nel presente lavoro non vi sono evidenze radiografiche di silicosi, a fronte di uno scenario espositivo non ben documentabile nel pregresso e che evidenzia negli ultimi 8 anni il superamento dei valori di TLV ACGIH per alcune mansioni.

La valutazione trasversale dei dati spirometrici condotta secondo i criteri ATS/ERS per gli esami eseguiti nel 2015 evidenzia alterazioni solo in una percentuale di soggetti esposti (22,4%: 13/58). In 4 soggetti è evidenziabile un quadro francamente ostruttivo ($FEV_1/FVC < LLN$ e $FEV_1 < LLN$) in 2 un pattern misto ($FEV_1/FVC < LLN$ e FEV_1 e $FVC < LLN$) e in 5 lavoratori un pattern restrittivo ($FEV_1/FVC > LLN$ e $FVC < LLN$). La prevalenza dei quadri patologici sarebbe pertanto 6,9% per il deficit ostruttivo, 8,6% per il pattern restrittivo e 3,4% per il deficit misto. Queste percentuali sono in linea con quelle osservate in un ampio studio condotto sulla popolazione generale (**39**).

Diversamente una valutazione longitudinale è in grado di evidenziare precocemente alterazioni anche in una proporzione di lavoratori i cui parametri di riferimento rientrano nei limiti di normalità (**190**). La valutazione longitudinale di test spirometrici periodici può evidenziare un decremento eccessivo nei singoli parametri analizzati secondario a condizioni patologiche concomitanti o all'esposizione occupazionale. La funzionalità polmonare aumenta normalmente durante l'infanzia,

prima di raggiungere un massimo, per poi iniziare a scendere, intorno ai 20-30 anni (**23,191-193**). Una revisione sistematica della letteratura ha identificato il declino del FEV₁ nei non fumatori in circa 29 ml / anno (**194**). Il tasso di declino può essere influenzato da esposizioni professionali, dal fumo di sigaretta, aumento di peso, mancanza generale di allenamento e dal genere (**195**), e può accelerare nei soggetti anziani. Un aumento del declino della funzione polmonare, in genere circa 50-90 ml / anno, è stato associato ad un aumento di morbilità e mortalità per malattia polmonare ostruttiva cronica e malattie cardiovascolari, e con una maggiore mortalità per qualsiasi causa (**14,196-199**).

Nella popolazione in studio l'uso del software SPIROLA ha evidenziato un eccesso di riduzione dei parametri respiratori superiore all'atteso per età nel 51,7% (30/58). Nello specifico il decremento per il FEV₁ e per la FVC dell'intero gruppo sono rispettivamente di 51ml/anno e 22 mL/anno con un trend di declino per FEV₁ maggiore rispetto all'atteso per l'età. La variabilità intra-individuale per l'intero gruppo è di 182 mL ed è accettabile considerando la buona qualità degli esami eseguiti dal medico competente. L'analisi longitudinale dei parametri FEV₁, FVC e FEV₁/FVC con ANOVA per misure ripetute ha evidenziato una riduzione statisticamente significativa per FEV₁ e FEV₁/FVC nell'intero periodo analizzato (2004 vs 2015) e nel corso di alcuni anni (2004 vs 2012 e 2008 vs 2012 e 2008 vs 2015) (Figure 9 e 10). L'osservazione che il decremento si osservi nell'osservazione in un periodo di tempo più lungo (> 4 anni) giustificherebbe un aumento della periodicità dell'esecuzione della spirometria.

La stratificazione del campione in base al parametro di esposizione ha evidenziato lo stesso andamento in decremento con valori peggiori all'aumentare dell'esposizione (Figure 11 a, 11b,11c) e questo concordemente all'osservazione che esiste una correlazione tra il tasso di declino dei due parametri e l'esposizione media cumulativa del periodo osservato (Figure 12 a e 12 b). Il fatto che si osservi già nel 2004 anno di inizio del nostro studio una differenza tra i tre gruppi è spiegabile con l'esposizione pregressa impossibile da documentare con precedenti spirometrici o dati di esposizione attendibili. Peraltro nel corso degli anni vi è stato il progressivo abbassamento del limite TLV ACGIH e sicuramente nelle prime fasi di esposizione i valori di esposizione per la popolazione in studio (anzianità lavorativa media di 25,7 anni ± 8,3) erano verosimilmente maggiori a quanto oggi accettato. Inoltre nel gruppo categorizzato come non esposto ci sono diverse unità (impiegati tecnici) che hanno precedentemente svolto mansioni in produzione e questo giustificherebbe un decremento superiore a quanto atteso nella popolazione di non fumatori sani. Infine la popolazione lavorativa fotografata al 2004 ha un'anzianità lavorativa media di almeno 15±8,2 anni. Pertanto la forbice osservata già all'inizio potrebbe risentire dell'esposizione pregressa

e il fatto che nei 3 gruppi si mantenga un andamento parallelo del decremento senza osservare dei peggioramenti ulteriori potrebbe essere espressione di un dato già consolidato nel tempo ed esordito in una fase iniziale di esposizione.

Il declino che si osserva è in linea con quanto riscontrato in altri studi condotti in settori lavorativi differenti come la produzione delle ceramiche (**200**) , il settore edile (**8**), le fonderie (**176**), e dimostra un effetto della SLC sui parametri di funzionalità respiratoria anche per valori < al TLV ACGIH.

CONCLUSIONI DELLA TESI

In questo lavoro di tesi sono stati proposti due approcci per implementare la sorveglianza sanitaria svolta dal medico competente con attenzione specifica a situazioni pre-cliniche: da una parte lo stato di infiammazione delle vie aeree svelato con l'uso di metodiche non invasive su matrici quali siero ed aria esalata per la diagnosi precoce di allergopatie respiratorie (primo studio) e dall'altro un decremento longitudinale eccessivo dei parametri di funzionalità respiratoria (secondo studio) con l'uso di programmi quali SPIROLA sviluppato dal NIOSH.

Dal primo studio si evince come l'uso di un questionario ad hoc sia un utile strumento per identificare in fase precoce i soggetti sintomatici e a rischio. Inoltre, la spirometria non associata al questionario clinico-anamnestico, sembra di limitata importanza, in quanto non sono emerse differenze tra il gruppo degli esposti e il gruppo dei controlli. Il test di provocazione bronchiale aspecifica (alla metacolina) è da riservarsi come secondo livello per la valutazione dell'iperreattività bronchiale e per la diagnosi di asma in soggetti sintomatici con spirometria normale. L'esecuzione di skin prick test è da riservare ad una seconda fase, per l'accertamento del nesso causale tra segni e sintomi ed esposizione ad agente eziologico (allergene) specifico. I dati emersi dalla misura del FeNO50 dimostrano che quest'ultimo è un marker sia di esposizione che di effetto e, pertanto, potrebbe essere un utile strumento sia per l'individuazione in fase precoce di soggetti con infiammazione delle vie aeree, sia per la loro gestione nel tempo. L'analisi dell'H₂O₂ nel condensato dell'aria esalata sembra poco specifica nell'individuare i soggetti sensibilizzati, in quanto le differenze riscontrate sono da attribuirsi non solo all'esposizione ad allergeni animali ma a sostanze irritanti in genere. Per quanto riguarda il dosaggio delle principali pneumoproteine proposto nel nostro studio, possiamo concludere che esse si sono dimostrate efficaci nel rivelare in fase precoce alterazioni di tipo infiammatorio nel tratto respiratorio sia dei soggetti esposti sia dei soggetti sensibilizzati, in particolare sono stati osservati valori di CC16 inferiori nei soggetti sensibilizzati rispetto ai non sensibilizzati, e valori di SP-D incrementati sia negli esposti rispetto ai non esposti. In considerazione del fatto che i primi tre anni di esposizione ad allergeni animali rappresentano il periodo più critico per la comparsa di AAL, sarebbe opportuno monitorare i soggetti esposti con periodicità più ravvicinata durante questa prima fase di sorveglianza sanitaria. Da un lato l'utilizzo di marcatori di infiammazione bronchiale, quale il FeNO50, dall'altro l'utilizzo di biomarcatori sistemici, quali le pneumoproteine sieriche (in particolare CC16 e SP-D), possono essere validi strumenti in quanto non invasivi, ripetibili e con alta sensibilità anche per i casi subclinici asintomatici. Ampliando in futuro la casistica dei soggetti arruolati, si potrebbe auspicare che le tecniche innovative e non invasive descritte in questo studio possano diventare un utile

strumento per il monitoraggio biologico e la sorveglianza sanitaria dei soggetti esposti ad allergeni da animali da laboratorio, affiancando il tradizionale approccio diagnostico e consentendo così di monitorare nel tempo i lavoratori più suscettibili, senza la necessità di escluderli preventivamente dalla mansione a rischio.

Dal secondo studio si evince come l'esposizione a silice libera cristallina, determini pur in assenza di silicosi radiograficamente dimostrabile, alterazioni dei parametri di funzionalità respiratoria. La spirometria in questo caso oltre che essere utile per valutare trasversalmente la popolazione ed evidenziare pattern francamente patologici, ha lo scopo di evidenziare precocemente situazioni di aumentato rischio. Nello specifico è stato utilizzato il software proposto dal NIOSH per valutare longitudinalmente, in presenza di parametri entro i limiti di norma, nell'arco di un periodo di tempo di 11 anni il decremento della funzione respiratoria quando eccessivo rispetto a quello atteso per effetto dell'età. Nella popolazione complessivamente considerata si evidenzia in effetti un decremento eccessivo per i parametri FEV_1 e FEV_1/FVC non attribuibile al solo effetto dell'età o al fumo, né ad altre variazioni antropometriche (BMI). Il decremento è stato correlato con l'esposizione media cumulativa a SLC e si è potuto osservare come maggiore sia l'esposizione a silice, maggiore sia il decremento dei parametri respiratori. In questo senso la spirometria diventa uno strumento di monitoraggio costante di interventi di prevenzione svolti a livello di gruppo e di compliance all'uso scrupoloso dei DPI per le vie aeree.

BIBLIOGRAFIA

- 1.Moitra S, Puri R, Paul D, Huang YC. Global perspectives of emerging occupational and environmental lung diseases. *Curr Opin Pulm Med*. 2015 Mar;21(2):114-20.
- 2.Beckett WS. Occupational respiratory diseases. *N Engl J Med*. 2000 Feb 10;342(6):406-13. Review.
- 3.Tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro dal D.Lgs 626/94 al D.Lgs 81/08 e s.m.i : un percorso da completare e migliorare C. Romano - A. Baracco - G. Frigeri - L. Isolani - A. Ossicini - E. Ramistella - L. Soleo Linee guida per la sorveglianza sanitaria (L-Soleo) SIMLII 2004
- 4.Loepke R, Taitel M, Haufel V, et al: Health and productivity as a business strategy: a multiemployer study. *J Occup Environ Med* 2009; 51: 411-428
- 5.Loepke R, Taitel M, Richling D, et al: Health and productivity as a business strategy. *J Occup Environ Med* 2007; 49: 712-721
- 6.Tafuro F, Corradi M, Mutti A. [Interpretative strategies of lung function tests: obstructive pattern]. *Med Lav*. 2014 May-Jun;105(3):197-213.
- 7.American College of Occupational and Environmental Medicine: Spirometry in the occupational Health Setting- 2011 Update setting. *J Occup Environ Med* 2011; 53: 569-584
- 8.Hnizdo E, Berry A, Hakobyan A, et al: Worksite wellness program for respiratory disease prevention in heavy construction workers. *J Occup Environ Med* 2011; 53: 274-281
- 9.American College of Occupational and Environmental Medicine: Spirometry in the occupational setting. *J Occup Environ Med* 2000; 42: 228-245
- 10.Ferguson GT, Enright PL, Buist AS et al: Office spirometry for lung health assessment in adults: a consensus statement from the National Lung Health Education Program. *Chest* 2000; 117: 1146-1161
- 11.Miller MR, Crapo R, Hankinson J, et al: General considerations for lung function testing. *Eur Respir J* 2005; 26: 153-161
- 12.Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, et al: Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005; 26: 319-338

13. Baughman P: An epidemiological assessment of lung function decline as a predictor of morbidity and mortality, doctoral dissertation. Morgantown, WV: West Virginia University; 2011
14. Baughman P, Marott JL, Lange P, et al: Health outcomes associated with lung function decline and respiratory symptoms and disease in a community cohort. *COPD: J Chronic Obstructive Pulmonary Dis* 2011; 8: 103-113
15. Mannino DM, Buist AS, Petty TL, et al: Lung function and mortality in the United States: data from the First National Health and Nutrition Examination Survey follow-up study. *Thorax* 2003; 58: 388-393
16. Mannino DM, Davis KJ: Lung function decline and outcomes in an elderly population. *Thorax* 2006; 61: 472-477
17. Mannino DM, Reichert MM, Davis KJ: Lung function decline and outcomes in an adult population. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 985-990
18. Tockman MS, Pearson JD, Fleg JL, et al. Rapid decline in FEV₁. A new risk factor for coronary heart disease mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 390-398
19. Townsend MC: Evaluating pulmonary function change over time in the occupational setting. ACOEM evidence-based statement. *J Occup Environ Med* 2005; 47: 1307-1316
20. Hnizdo E, Sircar K, Yan T et al. Limits of longitudinal decline for the interpretation of annual changes in FEV₁ in individuals. *Occup Environ Med* 2007; 64: 701-707
21. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, et al: Interpretative strategies for lung function tests. *Eur. Respir. J* 2005; 26: 948-968
22. Hnizdo E: The value of periodic spirometry for early recognition of long-term excessive lung function decline in individuals. *J Occup Environ Med* 2012; 54: 1506-1512
23. Burrows B, Lebowitz MD, Camilli AE, Knudson RJ: Longitudinal changes in forced expiratory volume in one second in adults. Methodologic considerations and findings in healthy nonsmokers. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 974-980
24. Hnizdo E, Sircar K, Glindmeyer HW, Petsonk EL: Longitudinal limits of normal decline in lung function in an individual. *J Occup Environ Med* 2006; 48: 625- 634 52.

25. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Institute for Occupational Safety and Health. Spirometry Longitudinal (SPIROLA) Software. <http://www.cdc.gov/niosh/topics/spirometry/spirola-software.html>
26. Hnizdo E, Yan T, Hakobyan A, et al: Spirometry Longitudinal Data Analysis Software (SPIROLA) for Analysis of Spirometry Data in Workplace Prevention or COPD Treatment. *Open Med Inform J* 2010; 4: 94-102
27. Anthonisen NR, Connett JE, Murray RP: Smoking and lung function of Lung Health Study participants after 11 years. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 675-679
28. Department of Health & Human Services, Centers for Disease Control, National Institute for Occupational Safety and Health. (2007) HETA 2007-0033 Interim Report March 29, 2007. Disponible on-line all'indirizzo <http://www.cdc.gov/niosh/hhe/reports/pdfs/2007-0033-letter.pdf>
29. Corradi M, Goldoni M, Mutti A. A review on airway biomarkers: exposure, effect and susceptibility. *Expert Rev Respir Med*. 2015 Apr;9(2):205-20.
30. Baines KJ, Pavord ID, Gibson PG. The role of biomarkers in the management of airways disease. *Int J Tuberc Lung Dis* 2014;18: 1264-8
31. Cazzola M, MacNee W, Martinez FJ, et al. Outcomes for COPD pharmacological trials: from lung function to biomarkers. *Eur Respir J* 2008;31:416-69
32. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69: 89-95
33. Corradi M, Mutti A. Exhaled Breath Analysis: from Occupational to Respiratory Medicine. *Acta Biomed* 2005; 76 Suppl 2: 20-9. 87
34. Ricciardolo FL et al. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004; 84: 731-65.
35. Gupta N et al. Correlation of exhaled nitric oxide, nasal nitric oxide and atopic status: A cross-sectional study in bronchial asthma and allergic rhinitis. *Lung India* 2014; 31: 342-7.
36. Modena BD et al. Gene expression in relation to exhaled NO identifies novel asthma phenotypes with unique biomolecular pathways. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 190: 1363-72.

- 37.Kharitonov SA, Barnes PJ. Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath. *Biomarkers* 2002; 7: 1-32.
- 38.Corradi M et al. Increased nitrosothiols in exhaled breath condensate in inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 854-8.
- 39.Corradi M et al. Use of exhaled breath condensate to investigate occupational lung disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010; 10: 93-8.
- 40.Caffarelli C et al. Hydrogen peroxide in exhaled breath condensate in asthmatic children during acute exacerbation and after treatment. *Respiration* 2012; 84: 291-8.
- 41.Deb R et al. Major house dust mite allergens *Dermatophagoides pteronyssinus* 1 and *Dermatophagoides farinae* 1 degrade and inactivate lung surfactant proteins A and D. *J Biol Chem* 2007; 282: 36808-19.
- 42.Cheng G et al. Increased levels of surfactant protein A and D in bronchoalveolar lavage fluids in patients with asthma. *Eur Respir J* 2000; 16: 831-5.
- 43.ATS/ERS. Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurements of exhaled lower respiratory nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 912-930. 88
- 44.Qaseem AS et al. Linking surfactant protein SP-D and IL-13: implications in asthma and allergy. *Mol Immunol* 2013; 54: 98-107.
- 45.Koopmans JG et al. Serum surfactant protein D is elevated in allergic patients. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1827-33.
- 46.Hermans C, Bernard A. Determinants of Clara cell protein (CC16) concentration in serum: a reassessment with two different immunoassays. *Clin Chim Acta* 1998; 272: 101-110.
- 47.Hermans C, Bernard A. Lung epithelium-specific proteins: characteristics and potential applications as markers. *Am J Respir Critic Care Med* 1999; 159: 646-78
- 48.Bush RK Mechanism and epidemiology of laboratory animal allergy. *ILAR J* 2001; 42(1): 4-11.
- 49.Harrison DJ Controlling exposure to laboratory animal allergens. *ILAR J* 2001; 42: 17-35.
- 50.Corradi M et al. Allergia da animali da laboratorio. *Med Lav* 2011; 102: 428-44.

- 51.Sorrel AH, Gottesman J. Mouse allergy. A case report. *Ann Allergy* 1957; 15: 662-663.
- 52.Bush RK and Stave GM. Laboratory animal allergy: an update. *ILAR J* 2000; 44: 28-51.
- 53.Corradi M et al. The characteristics, treatment and prevention of laboratory animal allergy. *Lab Anim* 2012; 42: 26-33
- 54.Seward JP. Occupational allergy to animals. *Occup Med* 1999; 14: 285-304.
- 55.Bush RK. Assessment and treatment of laboratory animal allergy. *ILAR J* 2001; 42: 55-64.
- 56.Cauz P, Bovenzi M, Filon FL. Laboratory animal allergy: follow-up in a research centre. *Med Lav.* 2014 Jan-Feb;105(1):30-6.
- 57.Monsò E et al. Individual characteristics and quitting in apprentices exposed to high-molecular-weight agents. *Am J Respir Critic Care Med* 2000; 161: 1508-12.
- 58.Botham PA et al. Allergy to laboratory animals: a follow-up study of its incidence and of the influence of atopy and pre-existing sensitization on its development. *Occup Environ Med* 1995; 52:129-133.
- 59.Cullinan P et al. Work related symptoms, sensitisation, and estimated exposure in workers not previously exposed to laboratory rats. *Occup Environ Med* 1994; 51: 589-92. 84
- 60.Gordon S et al. Measurement of airborne rat urinary allergen in an epidemiological study. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 1070-7.
- 61.Heederik D et al. Exposure-response relationships for work-related sensitization in workers exposed to rat urinary allergens: results from a pooled study. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 678-84.
- 62.Gordon S. Laboratory animal allergy: a British perspective on a global problem.. *ILAR J* 2001; 42: 37-46.
- 63.Gordon S, Preece R. Prevention of laboratory animal allergy. *Occup Med* 2003; 53: 371-377.
- 64.Cullinan P et al. Allergen exposure, atopy and smoking as determinants of allergy to rats in a cohort of laboratory employees. *Eur Respir J* 1999; 13: 1139-43.
- 65.Bush RK et al. Laboratory animal allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 99- 112.

66. Bland et al. Occupational allergy to laboratory animals: an epidemiologic study. *J Occup Med* 1986; 28: 1151-7.
67. Sjösted L et al. Human leukocyte antigens in occupational allergy: a possible protective effect of HLA-B16 in laboratory animal allergy. *Am J Ind Med* 1996; 30: 415-20.
68. Oxelius VA et al. Development of allergy to laboratory animals is associated with particular Gm and HLA genes. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 110: 73-8.
69. Fuortes LJ et al. Epidemiologic assessment of laboratory animal allergy among university employees. *Am J Ind Med* 1996; 29: 67-74.
70. Renström A et al. Working with male rodents may increase risk of allergy to laboratory animals. *Allergy* 2002; 56: 964-970. 85
71. S. Spitzauer, B. Pandjaitan, G. Soregi, S. Muhl, C. Ebner, D. Kraft, *et al.* IgE cross-reactivities against albumins in patients allergic to animals. *J Allergy Clin Immunol*, 96 (1995), pp. 951–959
72. S. Saarelainen, M. Rytönen-Nissinen, J. Rouvinen, A. Taivainen, S. Auriola, A. Kauppinen, *et al.* Animal-derived lipocalin allergens exhibit immunoglobulin E cross-reactivity. *Clin Exp Allergy*, 38 (2008), pp. 374–381
73. Virtanen T et al. Important animal allergens are lipocalin proteins: why are they allergenic? *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 120: 247-58.
74. Konradsen JR, et al. Allergy to furry animals: New insights, diagnostic approaches, and challenges. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(3):616-25
75. Kenyon N et al. Occupational asthma. *Clin Rev Allergy Immunol* 2012; 43: 3-13.
76. Seward JP. Medical surveillance of allergy in laboratory animal handlers. *ILAR J* 2001; 42: 47-54. 86
77. Park HS, Nahm DH. Prognostic factors for toluene diisocyanate-induced occupational asthma after removal from exposure. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 1145- 50.
78. Bernstein JA. Overview of diisocyanate occupational asthma. *Toxicology* 1996; 111: 181-9.
79. Heinzerling L et al. The skin prick test – European standards. *Clin Transl Allergy* 2013; 3: 3.

80. Ruoppi P et al. Sensitisation to mites in laboratory animal workers with rhinitis. *Occup Environ Med* 2005; 62: 612-5.
81. Wood RA et al. Accuracy of IgE antibody laboratory results. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007; 99: 34-41.
82. Gallmeier K et al. Prediction of new-onset asthma and nasal allergy by skin prick test and RAST in a cohort of adults. *Eur Respir J* 2014; 43:92-102.
83. Enarson DA, Yeung M. Determinants of changes in FEV₁ over a workshift. *Br J Ind Med* 1985; 42: 202-4.
84. Antunes J, Borrego L, Romeira A, Pinto P. Skin prick tests and allergy diagnosis. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2009 May-Jun;37(3):155-64.
85. Laszlo G. Standardisation of lung function testing: helpful guidance from the ATS/ERS Task Force. *Thorax* 2006;61:744-6.
86. Quanjer PH, Stanojevic S, Cole TJ et al. Multi-ethnic reference values for spirometry for the 3-95-yr age range: the global lung function 2012 equations. *Eur Respir J* 2012;40:1324-43.
87. American Thoracic Society, European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:912-30.
88. Horváth I et al; ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J*. 2005 Sep;26(3):523-48.
89. Corradi M, Alinovi R, Goldoni M, Vettori M, Folesani G, Mozzoni P, Cavazzini S, Bergamaschi E, Rossi L, Mutti A. Biomarkers of oxidative stress after controlled human exposure to ozone. *Toxicol Lett*. 2002 Aug 5;134(1-3):219-25.
90. Palmberg L, Sundblad BM, Lindberg A, Kupczyk M, Sahlander K, Larsson K. Long term effect and allergic sensitization in newly employed workers in laboratory animal facilities. *Respir Med*. 2015 Sep;109(9):1164-73.
91. Tafuro F, Ridolo E, Goldoni M, Montagni M, Mutti A, Corradi M. Work-related allergies to storage mites in Parma (Italy) ham workers. *BMJ Open*. 2015 May 19;5(5):e007502.

- 92.Linhares D, Jacinto T, Pereira AM, Fonseca JA. Effects of atopy and rhinitis on exhaled nitric oxide values - a systematic review. *Clin Transl Allergy*. 2011 Aug 17;1(1):8.
- 93.Bauchau V, Durham SR. Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe *Eur Respir J*. 2004;24(5):758-64.
- 94.Greiner AN, Hellings PW, Rotiroti G et al. Allergic rhinitis. *Lancet*. 2011;378(9809):2112-22.
- 95.Larese Filon F, Siracusa A, Rui F, Matteucci G, Pace ML, Fiorito A, Morucci P, Marabbini A. [Prevalence of occupational allergy to laboratory animals in two towns of northern and central Italy]. *Med Lav*. 2002 Mar-Apr;93(2):87-94. Italian. Erratum in: *Med Lav*. 2002 Jul-Aug;93(4):359.
- 96.Suarthana E, Meijer E, Heederik D, Ghezzi H, Malo JL, Gautrin D. The Dutch diagnostic model for laboratory animal allergen sensitization was generalizable in Canadian apprentices. *J Clin Epidemiol* 2009;62:542-549.
- 97.Pacheco KA, McCammon C, Liu AH, Thorne PS, O'Neill ME, Martyny J, Newman LS, Hamman RF, Rose CS. Airborne endotoxin predicts symptoms in non-mouse-sensitized technicians and research scientists exposed to laboratory mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Apr 1;167(7):983-90.
- 98.Hollander A, Doekes G, Heederik D. Cat and dog allergy and total IgE as risk factors of laboratory animal allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:545-554.
- 99.Gautrin D, Infante-Rivard C, Ghezzi H, Malo JL. Incidence and host determinants of probable occupational asthma in apprentices exposed to laboratory animals. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:899-904.
- 100.Hook WA, Powers K, Siraganian RP. Skin tests and blood leukocyte histamine release of patients with allergies to laboratory animals. *J Allergy Clin Immunol* 1984;73:457-465.
- 101.Krakowiak A, Wiszniewska M, Krawczyk P, et al. Risk factors associated with airway allergic diseases from exposure to laboratory animal allergens among veterinarians. *Int Arch Occup Environ Health* 2007;80:465-475.
- 102.Liccardi G, Bilò MB, Manzi F, Piccolo A, Di Maro E, Salzillo A. What could be the role of molecular-based allergy diagnostics in detecting the risk of developing allergic sensitization to furry animals? *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2015 Sep;47(5):163-7.

- 103.Szram J, Cullinan P. Medical surveillance for prevention of occupational asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2013;13(2):138-44.
- 104.Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 163(7):1693-1722.
- 105.American Thoracic Society Workshop. ATS Workshop Proceedings: Exhaled nitric oxide and nitric oxide oxidative metabolism in exhaled breath condensate: Executive summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006;173:811–13.
- 106.Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC et al. An official ATS clinical practice guideline: Interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*2011;184:602–15.
- 107.Eckel SP, Berhane K, Salam MT et al. Residential traffic-related pollution exposures and exhaled nitric oxide in the children’s health study. *Environ. Health Perspect.* 2011;119:1472–77.
- 108.Berhane K, Zhang Y, Linn WS et al. The effect of ambient air pollution on exhaled nitric oxide in the Children’s Health Study. *Eur. Respir. J.*2011;37:1029–1036.
- 105.Barbinova L, Baur X. Increase in exhaled nitric oxide (eNO) after work-related isocyanate exposure. *Int Arch Occup Environ Health.* 2006;79:387–95.
- 106.Baur X, Barbinova L. Latex allergen exposure increases exhaled nitric oxide in symptomatic healthcare workers. *Eur Respir J.* 2005;25:309–16.
- 107.de Broucker V, Hulo S, Cherot-Kornobis N et al. Interest of exhaled biomarkers in occupational asthma to latex: a case report. *Arch Environ Occup Health.* 2012;67(3):170-6
- 108.Hewitt RS, Smith AD, Cowan JO et al. Serial exhaled nitric oxide measurements in the assessment of laboratory animal allergy. *J Asthma.* 2008;45:101–7.
- 109.Swierczyńska-Machura D, Krakowiak A, Wiszniewska M et al. Exhaled nitric oxide levels after specific inhalatory challenge test in participants with diagnosed occupational asthma. *Int J Occup Med Environ Health* 2008;21:219–25.
- 110.Wu WT, Liao HY, Chung YT et al. Effect of nanoparticles exposure on fractional exhaled nitric oxide (FENO) in workers exposed to nanomaterials. *Int J Mol Sci.* 2014;15(1):878-94.

- 111.Olin AC, Rosengren A, Thelle DS, Lissner L, Bake B, Torén K. Height, age, and atopy are associated with fraction of exhaled nitric oxide in a large adult general population sample. *Chest*. 2006 Nov;130(5):1319-25.
- 112.Olivieri M, Talamini G, Corradi M, Perbellini L, Mutti A, Tantucci C, Malerba M Reference values for exhaled nitric oxide (reveno) study. *Respir Res*. 2006 Jun 30; 7():94.
- 113.Pedroletti, M Högman, P Merilainen, *et al*. Nitric oxide airway diffusing capacity and mucosal concentration in asthmatic schoolchildren *Pediatr Res*, 54 (2003), pp. 496–501
- 114.PJ Franklin, SM Stick, SW Turner, *et al*. Measuring exhaled nitric oxide levels in adults: the importance of atopy and airway responsiveness *Chest*, 126 (2004), pp. 1540–1545
- 115.PJ Franklin, SW Turner, PN Le Souef, *et al*. Exhaled nitric oxide and asthma: complex interactions between atopy, airway hyperresponsiveness, and symptoms in a community population of children *Thorax*, 58 (2003), pp. 1048–1052
- 116.A Avital, K Uwyied, N Berkman, *et al*. Exhaled nitric oxide is age-dependent in asthma *Pediatr Pulmonol*, 36 (2003), pp. 433–438
- 117.LP Malmberg, H Turpeinen, P Ryttilä, *et al*. Determinants of increased exhaled nitric oxide in patients with suspected asthma *Allergy*, 60 (2005), pp. 464–468
- 118.AC Olin, A Aldenbratt, A Ekman, *et al*. Increased nitric oxide in exhaled air after intake of a nitrate rich meal *Respir Med*, 95 (2001), pp. 153–158
- 119.G Adamkiewicz, S Ebel, M Syring, *et al*. Association between air pollution exposure and exhaled nitric oxide in an elderly population *Thorax*, 59 (2004), pp. 204–209
- 120.E D'Angelo, M Pecchiari, P Della Valle, *et al*. Effects of mechanical ventilation at low lung volume on respiratory mechanics and nitric oxide in normal rabbits *J Appl Physiol*, 99 (2005), pp. 433–444
- 121.Wenzel S, Wilbraham D, Fuller R *et al* (2007) Effect of an interleukin-4 variant on late phase asthmatic response to allergen challenge in asthmatic patients: results of two phase 2a studies. *Lancet* 370(9596):1422–1431
- 122.K. Alving, E. Weitzberg, J.M. Lundberg Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics *Eur Respir J*, 6 (1993), pp. 1368–1370

- 123.Suresh V, Mih JD, George SC (2007) Measurement of IL-13- induced iNOS-derived gas phase nitric oxide in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37(1):97–104
- 124.Chérot-Kornobis N, Hulo S, de Broucker V, Hassoun S, Lepage N, Edmé JL, Sobaszek A. Induced sputum, exhaled NO, and breath condensate in occupational medicine. *J Occup Environ Med.* 2012 Aug;54(8):922-7.
- 125.Antczak A, Nowak D, Shariati B, et al. Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid–reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. *Eur Respir J.* 1997;10:1235–1241.
- 126.Horvath I, Donnelly LE, Kiss A, et al. Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158:1042–1046.
- 127.Psathakis K, Mermigkis D, Papatheodorou G, et al. Exhaled markers of oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur J Clin Invest.* 2006;36:362– 367.
- 128.Stolarek RA, Potargowicz E, Seklewska E, et al. Increased H₂O₂ level in exhaled breath condensate in primary breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010;136:923–930.
- 129.Chow S, Campbell C, Sandrini A, et al. Exhaled breath condensate biomarkers in asbestos-related lung disorders. *Respir Med.* 2009;103:1091–1097.
- 130.Corradi M, Gergelova P, Di Pilato E, et al. Effect of exposure to detergents and other chemicals on biomarkers of pulmonary response in exhaled breath from hospital cleaners: a pilot study. *Int Arch Occup Environ Health.* doi: 10.1007/s00420–011-0686–8.
- 131.Gube M, Ebel J, Brand P, et al. Biological effect markers in exhaled breath condensate and biomonitoring in welders: impact of smoking and protection equipment. *Int Arch Occup Environ Health.* 2010;83:803–811.
- 132.Fireman E, Lerman Y, Stark M, Schwartz Y, Ganor E, Grinberg N, Frimer R, Landau DA, Zilberberg M, Barenboim E, Jacovovitz R. Detection of occult lung impairment in welders by induced sputum particles and breath oxidation. *Am J Ind Med.* 2008 Jul;51(7):503-11.
- 133.Fisher AB, Dodia C, Ruckert P, Tao JQ, Bates SR. Pathway to lamellar bodies for surfactant protein A. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010;299:L51–L58.
- 134.Williams MC, Hawgood S, Hamilton RL. Changes in lipid structure produced by surfactant proteins SP-A, SP-B, and SP-C. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1991;5:41–50.

135. Poulain FR, Allen L, Williams MC, Hamilton RL, Hawgood S. Effects of surfactant apolipoproteins on liposome structure: implications for tubular myelin formation. *Am J Physiol.* 1992;262:L730–L739.
136. Froh D, Ballard PL, Williams MC, Gonzales J, Goerke J, Odom MW, Gonzales LW. Lamellar bodies of cultured human fetal lung: content of surfactant protein A (SP-A), surface film formation and structural transformation in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1052:78–89.
137. Madsen J, Tornøe I, Nielsen O, Koch C, Steinhilber W, Holmskov U. Expression and localization of lung surfactant protein A in human tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29:591–597
138. Wong CJ, Akiyama J, Allen L, Hawgood S. Localization and developmental expression of surfactant proteins D and A in the respiratory tract of the mouse. *Pediatr Res.* 1996;39:930–937.
139. Crouch EC. Collectins and pulmonary host defense. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;19:177–201.
140. Ledford JG, Addison KJ, Foster MW, Que LG. Eosinophil-associated lung diseases. A cry for surfactant proteins A and D help? *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014 Nov;51(5):604-14.
141. Lakind JS, Holgate ST, Ownby DR, Mansur AH, Helms PJ, Pyatt D, Hays SM. A critical review of the use of Clara cell secretory protein (CC16) as a biomarker of acute or chronic pulmonary effects. *Biomarkers.* 2007 Sep-Oct;12(5):445-67. Review.
142. Shijubo N, Kawabata I, Sato N, Itoh Y. 2003. Clinical aspects of Clara cell 10-kDa protein/uteroglobin (secretoglobin 1A1). *Current Pharmaceutical Design* 9:1139-1149.
143. Broeckaert F, Arsalane K, Hermans C, Bergamaschi E, Brustolin A, Mutti A, Bernard A. 2000b. Serum clara cell protein: a sensitive biomarker of increased lung epithelium permeability caused by ambient ozone. *Environmental Health Perspectives* 108:533537.
144. Mutti A et al. Exhaled metallic elements and serum pneumoproteins in asymptomatic smokers and patients with COPD and asthma. *Chest* 2006; 129: 1288- 97.
145. Erpenbeck VJ, Krug N, Hohlfeld JM. Therapeutic use of surfactant components in allergic asthma. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2009 Mar;379(3):217-24. Epub 2008 Oct 15. Review.

146. Akiki Z, Fakih D, Jounblat R, Chamat S, Waked M, Holmskov U, Sorensen GL, Nadif R, Salameh P. Surfactant protein D, a clinical biomarker for chronic obstructive pulmonary disease with excellent discriminant values. *Exp Ther Med*. 2016 Mar;11(3):723-730.
147. Ilumets H, Mazur W, Toljamo T, Louhelainen N, Nieminen P, Kobayashi H, Ishikawa N, Kinnula VL. Ageing and smoking contribute to plasma surfactant proteins and protease imbalance with correlations to airway obstruction. *BMC Pulm Med*. 2011 Apr 19;11:19.
148. Hermans C, Dong P, Robin M, Jadoul M, Bernard A, Bersten AD, Doyle IR. 2003. Determinants of serum levels of surfactant proteins A and B and Clara cell protein CC16. *Biomarkers* 8:461471.
149. Carbonnelle S, Francaux M, Doyle I, Dumont X, de Burbure C, Morel G, Michel O, Bernard A. 2002. Changes in serum pneumoproteins caused by short-term exposures to nitrogen trichloride in indoor chlorinated swimming pools. *Biomarkers* 7:464478.
150. Ye Q, Fujita M, Ouchi H, Inoshima I, Maeyama T, Kuwano K, Horiuchi Y, Hara N, Nakanishi Y. 2004. Serum CC-10 in inflammatory lung diseases. *Respiration* 71:505510.
151. Benson M, Jansson L, Adner M, Luts A, Uddman R, Cardell LO. 2005. Gene profiling reveals decreased expression of uteroglobin and other anti-inflammatory genes in nasal fluid cells from patients with intermittent allergic rhinitis. *Clinical and Experimental Allergy* 35:473478.
152. Benson M, Fransson M, Martinsson T, Naluai AT, Uddman R, Cardell LO. 2007. Inverse relation between nasal fluid Clara Cell Protein 16 levels and symptoms and signs of rhinitis in allergen-challenged patients with intermittent allergic rhinitis. *Allergy* 62:17883.
153. Johansson S, Keen C, Stahl A, Wennergren G, Benson M. 2005. Low levels of CC16 in nasal fluid of children with birch pollen-induced rhinitis. *Allergy* 60:638642
154. Mannino DM, Ford ES, Redd SC. Obstructive and restrictive lung disease and functional limitation: data from the Third National Health and Nutrition Examination. *J Intern Med*. 2003;254(6): 540-547.
155. Vaz Fragoso CA, McAvay G, Gill TM, Concato J, Quanjer PH, Van Ness PH. Ethnic differences in respiratory impairment. *Thorax*. 2014 Jan;69(1):55-62

156. Burney P, Jithoo A, Kato B, et al. Chronic obstructive pulmonary disease mortality and prevalence: the associations with smoking and poverty—a BOLD analysis. *Thorax*. 2014;69(5):465-473.
157. Mannino DM, McBurnie MA, Tan W, et al. Restricted spirometry in the Burden of Lung Disease Study. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2012; 16(10):1405-1411.
158. Scarlata S, Pedone C, Conte ME, Incalzi RA. Accuracy of spirometry in diagnosing pulmonary restriction in elderly people. *J Am Geriatr Soc*. 2009;57(11):2107-11.
159. Stansbury R. Diseases associated with restrictive lung function impairment. *Eur Respir Monograph* (2009)
160. Godfrey MS, Jankowich MD. The Vital Capacity Is Vital: Epidemiology and Clinical Significance of the Restrictive Spirometry Pattern. *Chest*. 2016 Jan;149(1):238-51.
161. Aaron SD, Dales RE, Cardinal P. How accurate is spirometry at predicting restrictive impairment. *Chest* 1999; 115:869-873
162. Gladly CA, Aaron SD, Lunau M, Clinch J, Dales RE. A spirometry-based algorithm to direct lung function testing in the pulmonary function laboratory. *Chest*. 2003 Jun;123(6):1939-46.
162. Swanney MP, Beckert LE, Frampton CM, Wallace LA, Jensen RL, Crapo RO. Validity of the American Thoracic Society and other spirometric algorithms using FVC and forced expiratory volume at 6 s for predicting a reduced total lung capacity. *Chest*. 2004 Dec;126(6):1861-6.
163. Boros PW, Franczuk M, Wesolowski S. Value of spirometry in detecting volume restriction in interstitial lung disease patients. *Spirometry in interstitial lung diseases*. *Respiration*. 2004 Jul-Aug;71(4):374-9.
164. Venkateshiah SB, Ioachimescu OC, McCarthy K, Stoller JK. The utility of spirometry in diagnosing pulmonary restriction. *Lung*. 2008 Jan-Feb;186(1):19-25.
165. Khalid I, Morris ZQ, Khalid TJ, Nisar A, Digiovine B. Using spirometry to rule out restriction in patients with concomitant low forced vital capacity and obstructive pattern. *Open Respir Med J*. 2011;5:44-50.
166. Mehrparvar AH, Sakhvidi MJ, Mostaghaci M, Davari MH, Hashemi SH, Zare Z. Spirometry values for detecting a restrictive pattern in occupational health settings. *Tanaffos*. 2014;13(2):27-34.

- 167.de Matteis S, Iridoy-Zulet AA, Aaron S, Swann A, Cullinan P. A new spirometry-based algorithm to predict occupational pulmonary restrictive impairment. *Occup Med (Lond)*. 2016 Jan;66(1):50-3.
- 168.Cohen RA, Patel A, Green FH. Lung disease caused by exposure to coal mine and silica dust. *Semin Respir Crit Care Med*. 2008 Dec;29(6):651-61.
- 169.Rosenman KD, Reilly MJ, Kalinowski DJ, Watt FC. Silicosis in the 1990s. *Chest*. 1997; 111:779–786.
- 170.Rosenman KD, Reilly MJ, Gardiner J. Results of spirometry among individuals in a silicosis registry. *J Occup Environ Med*. 2010 Dec;52(12):1173-8.
- 171.Ng TP, Chan SP Lung function in relation to silicosis and silica exposure in granite workers *Eur Respir J*, 5 (1992), pp. 986–991
- 172.Malmberg P, Hedenstrom H, Sundblad BM. Changes in lung function of granite crushers exposed to moderately high silica concentrations: a 12 years follow up *Br J Ind Med*, 50 (1993), pp. 726–731
- 173.Rastogi SK, Gupta BN, Neeraj M, et al. Pulmonary function study in female grinders exposed to agate dust *Toxicol Ind Health*, 6 (1990), pp. 145–154
- 174.Liou SH, Chen YP, Shih WY, et al. Pneumoconiosis and pulmonary function defects in silica-exposed fire brick workers *Arch Environ Health*, 51 (1996), pp. 227–233
- 175.Irwig LM, Rocks P. Lung function and respiratory symptoms in silicotic and non-silicotic gold miners *Am Rev Respir Dis*, 17 (1978), pp. 429–435
- 176.Hertzberg VS, Rosenman KD, Reilly MJ, Rice CH: Effect of occupational silica exposure on pulmonary function. *Chest* 2002;122(2):721-728.
- 177.Lezioni di medicina del lavoro di Antonio Mutti, Massimo Corradi
- 178.Pollard KM. Silica, Silicosis, and Autoimmunity. *Front Immunol*. 2016 Mar 11;7:97.
- 179.Leung CC, Yu IT, Chen W.. Silicosis. *Lancet* (2012) 379:2008–18.
- 180.Mossman BT, Glenn RE.. Bioreactivity of the crystalline silica polymorphs, quartz and cristobalite, and implications for occupational exposure limits (OELs). *Crit Rev Toxicol* (2013) 43:632–60.

- 181.Castranova V, Vallyathan V.. Silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Environ Health Perspect*(2000) 108(Suppl 4):675–84.
- 182.Callis AH, Sohnle PG, Mandel GS, Wiessner J, Mandel NS.. Kinetics of inflammatory and fibrotic pulmonary changes in a murine model of silicosis. *J Lab Clin Med* (1985) 105:547–53.
- 183.Davis GS, Leslie KO, Hemenway DR.. Silicosis in mice: effects of dose, time, and genetic strain. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* (1998) 17:81–97.
- 184.Ohtsuka Y, Wang XT, Saito J, Ishida T, Munakata M.. Genetic linkage analysis of pulmonary fibrotic response to silica in mice. *Eur Respir J* (2006) 28:1013–9.
- 185.Sherrill DL, Lebowitz MD, Knudson RJ, Burrows B. Continuous longitudinal regression equations for pulmonary function measures. *Eur Respir J*. 1992;5:452–462
- 186.IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS Volume 100C (2012) Arsenic, Metals, Fibres and Dusts
- 187.Piolatto G, Pira E. The opinion of the Italian Society of Occupational Medicine and Industrial Hygiene (SIMLII) on silica-exposure and lung cancer risk. *Med Lav*. 2011 Jul-Aug;102(4):336-42.
- 188.Bang KM, Mazurek JM, Wood JM, White GE, Hendricks SA, Weston A; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Silicosis mortality trends and new exposures to respirable crystalline silica - United States, 2001-2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2015 Feb 13;64(5):117-20.
- 189.Vaz Fragoso CA, McAvay G, Van Ness PH, Casaburi R, Jensen RL, MacIntyre N, Yaggi HK, Gill TM, Concato J. Phenotype of Spirometric Impairment in an Aging Population. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Apr 1;193(7):727-35.
- 190.Hankinson JL, Wagner GR. Medical screening using periodic spirometry for detection of chronic lung disease. *Occup Med*. 1993 Apr-Jun;8(2):353-61.
- 191.Hankinson JL, Odencrantz JR, Fedan KB. Spirometric reference values from a sample of the general U.S. population. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:179–187
- 192.Kohansal R, Martinez-Camblor P, Agustí A, Buist AS, Mannino DM, Soriano JB. The natural history of chronic airflow obstruction revisited: an analysis of the Framingham offspring cohort. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:3–10.

193. Sherrill DL, Enright P, Cline M, Burrows B, Lebowitz MD. Rates of decline in lung function among subjects who restart cigarette smoking. *Chest* 1996;109:1001–1005
194. Lee PN, Fry JS. Systematic review of the evidence relating FEV₁ decline to giving up smoking. *BMC Med* 2010;8:84
195. Redlich CA, Tarlo SM, Hankinson JL, Townsend MC, Eschenbacher WL, Von Essen SG, Sigsgaard T, Weissman DN; American Thoracic Society Committee on Spirometry in the Occupational Setting. Official American Thoracic Society technical standards: spirometry in the occupational setting. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Apr 15;189(8):983-93.
196. Beeckman LA, Wang ML, Petsonk EL, Wagner GR. Rapid declines in FEV₁ and subsequent respiratory symptoms, illnesses, and mortality in coal miners in the United States. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:633–75.
197. Ryan G, Knuiaman MW, Divitini ML, James A, Musk AW, Bartholomew HC. Decline in lung function and mortality: the Busselton Health Study. *J Epidemiol Community Health* 1999;53:230–234.
198. Sircar K, Hnizdo E, Petsonk EL, Attfield M. Decline in lung function and mortality: implications for medical monitoring. *Occup Environ Med* 2007;64:461–466.
199. Wang ML, Avashia BH, Wood J, Petsonk EL. Excessive longitudinal FEV₁ decline and risks to future health: a case–control study. *Am J Ind Med* 2009;52:909–915.
200. Mehrparvar AH, Mirmohammadi SJ, Mostaghaci M, Davari MH, Hashemi SH. A 2-year follow-up of spirometric parameters in workers of a tile and ceramic industry, Yazd, southeastern Iran. *Int J Occup Environ Med*. 2013 Apr;4(2):73-9.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BRESCIA



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI MILANO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

DOTTORATO IN SCIENZE DELLA PREVENZIONE

Coordinatore: Prof. Antonio Mutti

Federica Tafuro

Nata a Galatina (LE) il 27/02/1983, consegue la maturità scientifica nel 2001 e si laurea in Medicina e Chirurgia con lode e menzione accademica nell'ottobre 2007 presso l'Università degli Studi di Parma e consegue la specializzazione in Medicina del Lavoro con lode presso la medesima Università nell'aprile 2012 discutendo una tesi sull'allergopatia respiratoria nel comparto dei prosciuttifici di Parma. Dall'agosto del 2012 all'agosto 2013 ha vinto una borsa di studio FORST AIRC per lo studio "Efficacy of thermal treatment for respiratory airways". Dal 2012 a tutt'ora è medico competente libero professionista dell'Università degli Studi di Parma col compito di effettuare visite mediche preventive e periodiche nell'ambito della sorveglianza sanitaria a personale dipendente dell'Università degli studi di Parma. E' anche medico competente libero-professionista di altre piccole-medie imprese del Nord Italia.

Dal gennaio 2013 è Dottoranda in Scienze della Prevenzione, sotto il tutoraggio del Prof. Massimo Corradi, direttore della Scuola di specializzazione in Medicina del Lavoro dell'Università di Parma. Il dottorato è stato prorogato per maternità da settembre 2014 a febbraio 2015 con recupero da gennaio a giugno 2016. Il progetto di dottorato riguarda la valutazione di biomarcatori nella sorveglianza sanitaria di esposti ad allergeni di animali di laboratorio. L'uso di matrici campionate in modo non invasivo quali condensato dell'aria esalata, sangue ed urine durante la sorveglianza sanitaria di soggetti esposti è un approccio promettente per indagare a scopo prognostico e diagnostico l'esposizione delle vie aeree e patologie polmonari. In tal senso è stato valutato uno spettro di possibili biomarcatori per evidenziare effetti precoci con lo scopo di implementare la sorveglianza sanitaria di soggetti esposti ad allergeni di animali di laboratorio. Interesse di ricerca secondario è la validità ed il corretto uso per la diagnosi di pattern ostruttivi e restrittivi delle metodiche diagnostiche tradizionali (spirometria) nell'ambito della sorveglianza sanitaria di soggetti esposti a sostanze tossiche per l'apparato respiratorio.

Nel corso del dottorato ha pubblicato 2 articoli su riviste scientifiche peer-reviewed e 1 è al momento submitted, oltre a 3 contributi in atti di convegni nazionali. La valutazione bibliometrica eseguita con Scopus evidenzia 4 documenti con 16 citazioni ed un H-index di 1.

Il Collegio unanime esprime un giudizio positivo sull'attività svolta, caratterizzata dalla piena integrazione nel gruppo di ricerca e dal costante impegno ed entusiasmo per la ricerca.

Il Coordinatore
(Prof. A. Mutti)

Parma, 11 Maggio 2016