

Il laboratorio di medicina del lavoro

10

Nicola Sannolo, Maria Pieri, Monica Lamberti e Nadia Miraglia

RIASSUNTO

La valutazione dei rischi nei luoghi di lavoro è uno dei principali strumenti di tutela della salute del lavoratore; il processo di valutazione può avvalersi di indagini di monitoraggio finalizzate a valutare il livello di esposizione a diversi agenti di rischio, tra cui gli agenti chimici; per questo, è necessario disporre di dati analitici indicanti la concentrazione delle sostanze presenti negli ambienti di lavoro e/o di indicatori biologici.

Visti i numerosi metodi analitici attualmente disponibili in grado di quantificare una stessa sostanza chimica (l'acido *trans,trans*-muconico urinario, ad esempio, è determinato in HPLC/UV per quantità nell'ordine di 20 mg/l ma anche in LC/MS, se si prevedono concentrazioni intorno a 0,20 mg/l), è preliminarmente indispensabile orientarsi nella scelta della tecnica analitica ottimale da richiedere nelle indagini di monitoraggio, così come accertarsi dell'affidabilità del dato fornito dal laboratorio. La scelta deve basarsi sull'analisi di vantaggi e svantaggi di ciascuna tecnica, in termini di specificità e sensibilità necessarie, senza prescindere da un'attenta valutazione di tempi e costi analitici complessivi. L'affidabilità del dato è garantita dall'utilizzo di procedure analitiche validate e dai criteri di qualità adottati dal laboratorio nell'organizzazione dell'attività svolta, in tutte le fasi operative e gestionali, coinvolte nella produzione del dato.

Introduzione

Il crescente sviluppo delle tecnologie analitiche originariamente nate per la ricerca di base e le straordinarie applicazioni in svariati ambiti, compreso quello della tutela della salute nei luoghi di lavoro, rendono indispensabile poter disporre di uno strumento di orientamento nella scelta della più adeguata metodologia analitica, di comune utilizzo o all'avanguardia, tra quelle attualmente disponibili nello scenario scientifico internazionale.

Nell'ambito della medicina del lavoro, l'uso di adeguate tecniche analitiche in grado di fornire informazioni quantitative inerenti il livello di inquinamento, e gli effetti sulla salute dovuti alla grande varietà di agenti di rischio presenti negli ambienti di vita e di lavoro, è uno dei principali interessi delle diverse figure professionali coinvolte nel compito di tutela della salute dei lavoratori.

Da qui, l'obiettivo di questo capitolo: fornire ai soggetti professionalmente interessati strumenti di conoscenza e valutazione per orientarsi nella scelta delle prestazioni da richiedere ad un laboratorio analitico, in termini di "qualità del dato" e "tipologia di analisi".

Nella prima parte del capitolo ("qualità del dato"), verranno illustrate le modalità organizzative e gestionali che devono caratterizzare il "laboratorio di medicina del lavoro" al fine di garantire gli indispensabili requisiti di attendibilità e qualità del dato analitico nell'ambito di un sistema integrato di gestione di qualità e sicurezza. L'obiettivo consiste nel fornire un orientamento circa le prestazioni essenziali da richiedere ad un moderno laboratorio di medicina del lavoro e a tale scopo, in particolare, saranno trattati argomenti inerenti il controllo della qualità del dato in termini di validazione delle procedure analitiche, certificazione di qualità, grado di competenza del personale e flussi informativi.

Nella parte successiva del capitolo, ai fini della scelta della "tipologia di analisi" da richiedere in relazione alla quantificazione dell'agente o del prodotto di biotrasformazione, si illustreranno le principali tecniche strumentali utilizzate per le determinazioni analitiche degli indicatori adoperati per la valutazione dei livelli di esposizione e di assorbimento degli agenti di rischio, indicando per ogni tecnica vantaggi e svantaggi in termini di accuratezza, sensibilità, specificità e costi.

Data la vastità dell'argomento, l'attenzione sarà focalizzata essenzialmente sulle analisi di laboratorio volte alla valutazione del rischio chimico, lasciando ad ulteriori approfondimenti le attività di campionamento (raccolta dei campioni) e gli aspetti analitici connessi con la valutazione dei rischi per la salute dovuti ad agenti fisici e biologici.

Come accertare la qualità delle analisi

Il "laboratorio di medicina del lavoro" deve garantire la qualità del dato analitico prodotto, sia in relazione alle

procedure d'analisi adoperatè (a) sia in termini di organizzazione e gestione dell'attività svolta (b).

È auspicabile che le figure professionali, la cui attività implichi l'utilizzo di dati provenienti da laboratori analitici, si accertino che il laboratorio scelto per la conduzione delle indagini sia qualificato: (a) le metodologie analitiche devono essere validate, in modo da garantire l'affidabilità e la riproducibilità del dato analitico mediante il rispetto dei parametri di validazione (sensibilità, specificità, accuratezza, ecc.) richiesti in ambito internazionale (1-3); (b) il laboratorio deve essere munito di certificazione di qualità secondo la norma ISO 9001 o, comunque, essere gestito secondo i principi dei *quality assurance programme* o del *total quality management*, i quali garantiscono il rispetto delle buone pratiche di laboratorio (GLP, *good laboratory practice*) in tutte le fasi, operative e gestionali, coinvolte nella produzione del dato (3-6) (per approfondimenti, vedere capitolo 51 *Modelli di organizzazione e gestione*).

Validazione delle tecniche analitiche

In generale, per ogni fase analitica implicata nella determinazione di un agente chimico presente in matrice complessa (ambientale o biologica), sono disponibili più metodiche; una volta definite le tecniche da adoperare in ciascuna fase, e cioè il metodo di campionamento, di pretrattamento (estrazione/concentrazione dell'analita dalla matrice complessa) e di analisi, l'insieme di tali tecniche costituisce la procedura analitica *in toto*, adoperata per la conduzione dell'analisi. Attualmente, in ambito internazionale, ad ogni procedura analitica è richiesto, assieme a studi di stabilità degli analiti nelle condizioni di conservazione e manipolazione indicate dalla metodica stessa, il rispetto di numerosi parametri di validazione, quali specificità, sensibilità, accuratezza, precisione, percentuale di recupero dalla matrice complessa.

La determinazione dei parametri di validazione comporta la conduzione di numerosi esperimenti secondo quanto specificato da organismi accreditati, quali l'*Eu-rachem* o la *Food and Drug Administration*, in modo tale da garantire l'affidabilità di qualsiasi metodo analitico adoperato, in termini di qualità analitica e riproducibilità (2,7).

L'insieme degli esperimenti necessari alla valutazione dei parametri di validazione costituisce un "protocollo di validazione" che garantisce alla procedura analitica "validata" il rispetto dei requisiti indispensabili per supportare, anche in ambito internazionale, la validità delle indagini condotte.

Il protocollo di validazione costituisce parte del *know-how* interno al laboratorio stesso e può essere condiviso in ambito scientifico mediante pubblicazione su riviste scientifiche, in modo da sottostare al processo di revisione degli articoli da parte di esperti del settore.

La validazione può essere completa (*full-validation*, richiesta per nuove metodologie); parziale (*partial vali-*

dation, per modifiche introdotte in una metodologia già validata) e incrociata (*cross validation*, nel caso in cui due o più metodologie vengano usate per la produzione dello stesso dato analitico) (1).

Qualunque sia il tipo di validazione, è auspicabile che l'utente del laboratorio (colui che richiede l'analisi) verifichi che le metodiche adoperate nel laboratorio a cui ci si è rivolti, siano validate.

Allo scopo di poter meglio interpretare il senso e l'importanza dei parametri di validazione, di seguito si riporta una breve descrizione di ciascuno dei suddetti parametri.

- **Sensibilità** Il limite di sensibilità di un metodo indica la quantità minima di analita che si riesce a rivelare con la metodica scelta (LOD, *limit of detection*); il limite di quantificazione (LLOQ, *lower limit of quantification*) è la minima concentrazione di analita quantificabile con livelli di precisione e accuratezza accettabili (2,3,7).

È buona norma che il laboratorio di analisi includa, nel *report* di risposta che viene dato al cliente, il LOD e il LLOQ della procedura analitica adoperata per le determinazioni effettuate, in modo da facilitarne l'interpretazione e, allo stesso tempo, consentire di verificare la qualità della misura condotta. Ad esempio, è necessario appurare che i valori riportati (cioè le concentrazioni di analita dosate) siano superiori non solo al LOD ma anche al LLOQ e, soprattutto, tener presente che un risultato negativo significa solo che la matrice indagata non contiene la sostanza da determinare in concentrazioni maggiori del LOD: qualora la concentrazione dell'analita fosse minore, la tecnica non è in grado di rilevarla, quindi, la sostanza potrebbe comunque essere presente. Se nella risposta analitica, inoltre, è riportata la dizione "tracce", solitamente tale risposta indica che l'analita determinato è rilevabile ma non quantificabile, cioè è presente in concentrazioni comprese tra il LOD e il LLOQ (3,7).

- **Specificità** La specificità indica la capacità del metodo analitico di discriminare gli analiti da sostanze interferenti eventualmente presenti nella matrice complessa. Per la sua determinazione è solitamente necessario analizzare almeno sei campioni costituiti unicamente dalla matrice, cioè campioni che non contengono l'analita in esame (bianchi di matrice). Nel caso di analiti endogeni, l'impossibilità di disporre di bianchi di matrice rende la valutazione della specificità più complessa, argomento oggetto di ampio dibattito nella comunità scientifica (8).

- **Accuratezza e precisione** L'accuratezza è un parametro di quanto il risultato ottenuto sia prossimo al valore vero; il discostamento percentuale tra il valore di concentrazione ottenuto dall'analisi e quello nominale rappresenta l'accuratezza percentuale. Il parametro "precisione" è connesso al concetto di riproducibilità analitica. La precisione indica la concordanza dei risultati di misure relative allo stesso campione (9).

assay) o a campioni almeno in triplicato preparati alla stessa concentrazione di analita (*inter-assay*) ed analizzati lo stesso giorno (*intra-day*) o in giorni diversi (*inter-day*). Il parametro si valuta attraverso la determinazione della deviazione standard e del coefficiente di variazione (CV), il quale è un indice percentuale che correla l'errore della misura (deviazione standard) al valore medio di concentrazione ottenuto durante le analisi (2).

Secondo quanto proposto dalla FDA, la precisione, espressa come coefficiente di variazione percentuale, non dovrà superare il 15% per ogni livello di concentrazione, eccetto che per il limite inferiore di quantificazione (LLOQ), per il quale è sufficiente che il valore del CV non superi il 20%; analogamente l'accuratezza dovrà rientrare nel 15% del valore vero, eccetto per il LLOQ, per il quale non dovrà deviare di più del 20% rispetto al valore reale.

Recupero La percentuale di recupero è un indice dell'efficienza della procedura di estrazione dell'analita dalla matrice complessa. Una metodica analitica a cui corrisponda una bassa percentuale di recupero non risulta affidabile in quanto il risultato analitico potrebbe essere negativo anche se l'analita è di fatto presente nella matrice. È, pertanto, necessario verificare se i risultati forniti dalle analisi siano stati riportati tenendo conto della percentuale di recupero dell'analita stesso, cioè, ad esempio, siano stati "normalizzati" rispetto al recupero percentuale misurato in fase di validazione della metodica (9).

Stabilità L'esito negativo di una determinazione analitica può dipendere non solo da una bassa percentuale di recupero ma anche dalla degradazione dell'analita durante le fasi di raccolta, conservazione e analisi del campione. Gli esperimenti volti alla valutazione della stabilità devono tener conto di tutte le condizioni di manipolazione del campione (temperature e tempi durante l'analisi e lo stoccaggio, cicli di congelamento e scongelamento, ecc.). La stabilità degli analiti viene valutata confrontando i risultati provenienti da analisi del medesimo campione condotte in momenti diversi e i valori di stabilità indicano per quanto tempo e a quale temperatura è possibile conservare ed analizzare un campione senza andare incontro a perdite significative di analita (3).

ed alle condizioni in cui gli studi di laboratorio vengono programmati, eseguiti, controllati, registrati e riportati. Le GLP, infatti, prevedono specifici accorgimenti da adottare in ciascuna fase coinvolta nella produzione del dato, dalle modalità di approvvigionamento di reattivi e strumentazione, passando per la competenza del personale, fino alla gestione dei flussi informativi e alla comunicazione dei risultati all'utente (11,12). Tali accorgimenti, che sostanzialmente costituiscono un modello di gestione della qualità, sono enunciati anche nelle norme ISO 9000, volte al "miglioramento continuo" attraverso la riorganizzazione delle procedure, del sistema organizzativo, delle responsabilità e delle risorse e mediante verifiche, azioni correttive, revisioni e riesami (6). L'obiettivo "miglioramento continuo" implica la conduzione di analisi preliminari, riesami, verifiche, valutazioni e definizione di "politiche"; tutti processi comuni anche alla gestione di altre variabili strategiche per lo sviluppo di un'organizzazione, quali l'ambiente e la sicurezza (argomenti specificamente trattati dalla famiglia delle norme internazionali ISO 14000 per l'ambiente e dalle linee guida BS 8800 e OHSAS 18002 e 18001 per la sicurezza). Le analogie riscontrabili tra i modelli di riferimento forniti da norme e linee guida evidenziano l'utilità di porre in essere anche nell'organizzazione delle attività del laboratorio di medicina del lavoro un sistema di gestione integrato per qualità, ambiente e sicurezza.

La conformità ai requisiti previsti dalle norme può essere "certificata e/o accreditata" da una parte terza indipendente: l'accredito riconosce formalmente la competenza tecnica nell'eseguire uno specifico servizio (ad esempio, l'accredito ISO/IEC 17025 applica criteri e procedure specificamente predisposte per determinare la competenza tecnica di un laboratorio); la certificazione assicura il rispetto di una specifica norma (ad esempio, la certificazione ISO 9001 non è collegata ad una competenza tecnica specifica, ma dichiara la conformità alla norma in tema di gestione generale del laboratorio, dei processi e dei dati).

Con o senza certificazione ufficiale, l'attuazione di un *quality assurance programme* (QAP) garantisce al contempo il rispetto delle buone pratiche di laboratorio e dei requisiti richiesti dalla norma ISO 9001 (5,12). Il QAP, pianificato e gestito dal management direttivo (vedere paragrafo successivo), garantisce la validità non solo di uno specifico processo analitico ma dell'intera struttura organizzativa del laboratorio, indicando i punti fondamentali su cui porre l'attenzione allo scopo di condurre l'attività del laboratorio perseguendo principi di qualità, efficienza ed efficacia. I fattori presi in considerazione dal *management* direttivo devono tener conto dei costi, dei tempi e dei flussi di lavoro e riguardano: il personale (in termini di numero, competenza, compiti e responsabilità); la struttura, la distribuzione e la destinazione d'uso dei locali (ad esempio, l'area adibita a laboratorio deve avere locali destinati a specifici usi, sia a scopi di sicurezza sia per evitare contaminazioni, interferenze, ecc.); la registrazione e l'archiviazione/con-

Quality assurance programme e certificazione

L'affidabilità del dato fornito dal laboratorio analitico è strettamente connessa non solo con l'affidabilità delle metodiche analitiche adoperate ma anche con una corretta organizzazione e gestione del laboratorio stesso, in termini di qualità delle prestazioni offerte (4,10). In altri termini, l'affidabilità del dato è connessa con il rispetto delle "buone pratiche di laboratorio" (*good laboratory practice*, GLP), cioè al processo organizzativo

servazione dei campioni e dei dati in ingresso, in uscita o prodotti in fase analitica (13); la manutenzione e la calibrazione della strumentazione; l'identificazione e la conservazione di reattivi, reagenti e standard certificati; la disponibilità di "procedure operative standard" (POS o SOP - *standard operating procedures*: procedure scritte dettagliate, sia di taglio tecnico - come condurre l'analisi - sia gestionale - come gestire i rifiuti, come effettuare gli approvvigionamenti, ecc.) (12). In altri termini, la definizione del QAP, rappresenta la condizione secondo cui l'attività viene pianificata, condotta, monitorata, registrata, archiviata e refertata. Il QAP è parte integrante delle buone pratiche di laboratorio e riflette lo schema ciclico *plan, do, check, act* riportato nelle norme internazionali per la gestione delle attività "in qualità": solitamente, nel caso di nuova introduzione di un QAP in un sistema preesistente, l'approccio al sistema ciclico inizia dal *check* (monitoraggio o controllo), finalizzato all'analisi delle condizioni in essere; si passa, quindi, alle decisioni da assumere (*act*), alla pianificazione (*plan*), all'attuazione (*do*) e nuovamente alla verifica (*check*) dell'efficacia delle decisioni assunte (4).

Tra i vari aspetti connessi con la conduzione di un QAP, i paragrafi successivi ne trattano due che meritano particolare attenzione in quanto spesso ritenuti ovvi e, quindi, poco pianificati: la scelta e la gestione del personale, in termini di "competenze e responsabilità"; l'organizzazione dei "flussi informativi" all'interno del laboratorio stesso e nei rapporti con l'esterno.

Competenze e responsabilità

L'efficienza e l'organizzazione del laboratorio analitico si riflettono nella definizione di un organigramma ben delineato, dal quale si desumono prontamente compiti e responsabilità attribuiti al personale di cui il sistema dispone: dal *management* direttivo, seguito da dirigenti e preposti, al personale amministrativo, fino ai singoli tecnici-operatori (6).

Il management direttivo è responsabile dell'organizzazione e del corretto funzionamento del servizio offerto *in toto*, con poteri decisionali inerenti tutti gli aspetti del sistema (personale assunto, attività tecnico-scientifica, gestione sia interna al laboratorio sia dei rapporti con l'esterno, amministrazione economica, acquisto delle attrezzature, ecc.). Il *management*, inoltre, definisce la "politica" del laboratorio (cioè gli obiettivi di miglioramento continuo e la finalità delle attività svolte) e ha lo specifico compito di distribuire la responsabilità di ciascuna fase del servizio offerto tra i componenti del personale, garantendo, in tal modo, l'efficienza globale del sistema (12). Secondo quali criteri si individuano le risorse umane adatte allo svolgimento di uno specifico compito? In primo luogo, ciascuna funzione (dove per "funzione" si intende la gestione delle attrezzature, di una determinata commessa, del processo di fatturazione, ecc.) implica il possesso di requisiti ben definiti, che evidenzino le competenze necessarie allo svolgimento

stesso della mansione (ad esempio, titoli ed esperienze professionali) (4).

È d'uopo sottolineare che la responsabilizzazione del personale non ha il solo scopo di consentire l'individuazione di eventuali mancanze o irregolarità ma, soprattutto, quella di individuare soggetti cui far riferimento nello svolgimento di ciascun compito, favorendo, in tal modo, le "dinamiche di gruppo". In altri termini, un'efficace gestione dei servizi offerti e delle risorse umane implica che tutte le "parti" dell'organizzazione debbano lavorare in cooperazione, sentendosi non solo responsabili dello specifico compito assegnato, ma partecipi dell'intera organizzazione. A tale scopo, riunioni di *brainstorming* (in senso lato, riunioni di confronto di idee) dove ciascun membro del gruppo di lavoro è invitato ad apportare il proprio contributo creativo nella risoluzione di qualsiasi eventuale problematica insorta nello svolgimento dell'attività, sono altamente auspicabili (4). Tali riunioni, se da un lato sono volte ad incrementare lo spirito di collaborazione, dall'altro favoriscono la condivisione delle informazioni nell'ambito del gruppo di lavoro (vedere il paragrafo successivo *Flussi informativi*) e, allo stesso tempo, consentono al management direttivo sia di monitorare l'andamento di una specifica attività, sia, più in generale, di verificare, in continuo, la corretta attribuzione dei compiti, cioè se un responsabile individuato in fase preliminare effettivamente svolga con competenza e abilità il proprio ruolo.

Un ultimo aspetto, non trascurabile, circa l'attribuzione di compiti e responsabilità finalizzata ad un'efficace gestione di un'organizzazione e, nella fattispecie, di un laboratorio analitico, è disporre di personale in numero adeguato sia alla gestione del laboratorio stesso sia alla mole di lavoro connessa con l'esecuzione delle determinazioni quali-quantitative (6).

Flussi informativi

Il flusso informativo è un sistema di archiviazione, solitamente elettronico, realizzato attraverso la raccolta e l'elaborazione di dati (informazioni) di varia natura. Nel caso specifico dei laboratori analitici, il flusso informativo è composto da diverse tipologie di informazioni raggruppabili in due macrosettori: una documentazione "generale", inerente l'attività *in toto* del laboratorio; una documentazione "specifica" per ciascuna singola analisi. Per documentazione "generale", si intendono: registrazione delle qualifiche e delle modalità di addestramento o aggiornamento del personale; procedure standard operative e relative procedure di validazione interna; *record* e rapporti tecnici circa manutenzione, calibrazione/taratura e certificazione della strumentazione; certificazione dei reattivi e reagenti adoperati quali materiali di riferimento (standard certificati); record delle riunioni condotte nell'ambito del QAP; archiviazione del materiale di laboratorio in entrata e in uscita (ad esempio: data di ricezione e di scadenza dei reattivi, quantità presenti in laboratorio, posizione di stoccaggio, ecc.)

(6,13). La documentazione "specificata", invece, riguarda ogni singola analisi (o gruppo di analisi inerenti una determinata commessa) effettuata nel laboratorio di analisi su campioni complessi (matrici ambientali o biologiche) che pervengono in laboratorio a seguito di una richiesta da parte di un committente oppure, più genericamente, di un'indagine di monitoraggio in corso. Tale documentazione comprende: a) registrazione dei campioni in ingresso (tipo di analisi richiesta e nominativo del richiedente, data di arrivo, modalità di trasporto e condizioni di conservazione dei campioni fino all'analisi, nominativo del ricevente ed eventuali note sull'accettabilità dei campioni pervenuti: ad esempio, il campione deve pervenire al laboratorio in contenitori integri, in volume adeguato all'analisi richiesta, ecc.); b) registrazione dell'analisi effettuata, in termini di POS adoperate per l'analisi, data d'analisi e nominativo dell'operatore, *raw data* forniti dalla strumentazione utilizzata e *files* di elaborazione dati, *report* di risposta; c) conservazione/smaltimento campioni, ecc. (12,13).

In relazione ai laboratori analitici, quali sono le finalità dei flussi informativi? In primo luogo, disporre di un flusso informativo significa avere tracciabilità del dato, dall'arrivo del campione fino alla consegna del *report* di risposta, col duplice obiettivo di rispondere alla normativa vigente (circa *privacy*, custodia dei campioni, ecc.) e garantire l'affidabilità della prestazione fornita in termini di qualità del dato ed efficienza del servizio (10). In

secondo luogo, la realizzazione di un flusso informativo, facilitando la comunicazione delle informazioni sia verso l'interno (orizzontalmente, nell'ambito di ciascun gruppo di lavoro e verticalmente, tra i vari componenti dell'organigramma), sia verso l'esterno (nei rapporti con clienti o istituzioni), consente una maggiore cooperazione tra tutti i soggetti interessati, portando ad un continuo miglioramento del servizio offerto così come ad una maggiore efficienza ed affidabilità del laboratorio analitico nel complesso.

Criteri di affidabilità

Quali sono le domande da porsi nella scelta del laboratorio analitico a cui ci si rivolge per essere sufficientemente certi dell'affidabilità dei dati richiesti? In figura 1 è riportato un *flow chart* esplicativo sull'argomento. I processi di certificazione e accreditamento, così come i *quality assurance programmes*, prevedono una ben definita organizzazione e gestione del servizio offerto; pertanto, laboratori certificati, accreditati o dotati di un QAP, necessariamente rispondono a specifici requisiti a garanzia dell'affidabilità del sistema (4,10). In caso contrario è auspicabile, in primo luogo, accertarsi che il laboratorio adoperi, nello svolgimento della propria attività, procedure analitiche validate; il laboratorio, inoltre, dovrebbe disporre di procedure operative standard (scritte), definite per ogni fase del servizio richiesto, che

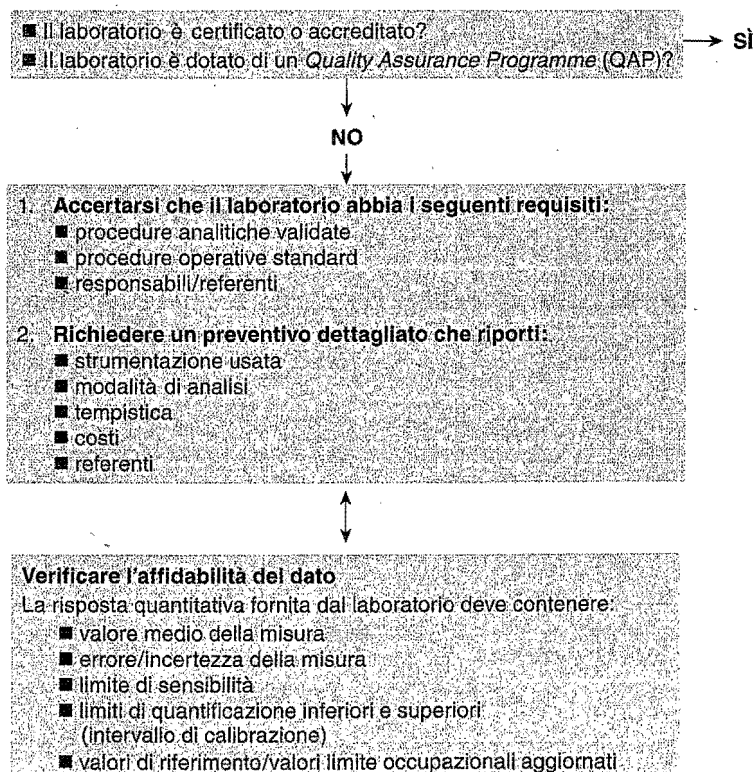


FIGURA 1 Flow chart: scelta del laboratorio ottimale.

indichino, assieme alle modalità di svolgimento dell'attività, anche il personale responsabile della fase di lavoro (5,13,14). Per "fasi del servizio richiesto", si intendono tutti i processi che vanno dall'iniziale contatto tra il richiedente ed il laboratorio, alle modalità di analisi, fino alla comunicazione della risposta analitica. Ad esempio, una POS inerente la fase di "contatto", deve riportare i giorni e gli orari in cui poter effettuare il contatto, così come il recapito e il nominativo del/i responsabile/i (referente/i), assieme alle indicazioni circa le modalità di richiesta del servizio stesso. Il ruolo del responsabile (referente) è particolarmente importante, in quanto è il soggetto a cui il medico del lavoro deve fare riferimento per informazioni, precisazioni e chiarimenti inerenti le indagini analitiche richieste.

La qualità del servizio offerto, inoltre, è desumibile dal dettaglio con cui viene stilato il preventivo relativo all'analisi richiesta: un preventivo che riporti, oltre ai costi necessari per effettuare le indagini, la strumentazione e le tecniche analitiche che saranno impiegate, così come la tempistica secondo cui verranno fornite le risposte, è indice di organizzazione ed efficienza. Altro indice di qualità, è la disponibilità di procedure scritte che detaglino le modalità di campionamento (raccolta dei campioni), conservazione e trasporto dei campioni biologici o ambientali al laboratorio di analisi. Va sottolineato che, quando si richiede unicamente l'esecuzione dell'analisi, ovvero quando campionamento-conservazione-trasporto dei campioni al laboratorio sono a cura del medico del lavoro, questi deve necessariamente richiedere al responsabile (referente) la procedura di campionamento-conservazione-trasporto da seguire, al fine di assicurare, da un lato, la corretta esecuzione del campionamento e, dall'altro, garantire la stabilità dei campioni fino alla loro consegna al laboratorio di analisi. Si tenga presente, che nel caso in cui la fase di campionamento non è affidata al laboratorio di analisi, quest'ultimo non ne è responsabile e il laboratorio assume responsabilità dei campioni solo a partire dalla loro ricezione.

Il rispetto di specifici requisiti e il dettaglio del preventivo fornito consentono una valutazione a priori circa la qualità del laboratorio analitico a cui rivolgersi; in ogni caso, l'affidabilità del dato analitico deve anche essere verificata a posteriori, una volta ricevuta la risposta analitica (figura 1). Nell'ambito della tossicologia occupazionale una risposta inerente la quantificazione di un agente chimico dovrebbe essere il risultato di analisi ripetute dello stesso campione, riportato come valore medio, con l'indicazione dell'errore connesso con la misura. Tale errore può corrispondere all'errore sulla media, alla deviazione standard (15) o, ancor meglio, derivare dallo studio dell'incertezza della misura (16): l'approfondimento circa il significato ai fini dell'interpretazione del dato, esula dagli scopi prefissi del presente capitolo.

Analoga importanza ha il limite di sensibilità della tecnica analitica adoperata, che deve essere sempre indi-

cato nella risposta fornita. Il lettore deve tener presente che risposte quali "assente", "< LOD", "ND = non rilevabile", non implicano necessariamente che l'analita in questione sia effettivamente assente dal campione analizzato, ma significano, semplicemente, che la tecnica analitica adoperata non è in grado di rilevarlo qualora sia presente in concentrazioni inferiori al proprio LOD. Ancora: se l'accuratezza e la riproducibilità della metodica di quantificazione sono state testate solo all'interno di un ben specifico intervallo di calibrazione, un dato quantitativo al di fuori di quell'intervallo (cioè un valore minore o maggiore dei limiti di quantificazione inferiori e superiori, rispettivamente) non è accettabile, in quanto non se conosce l'errore.

È opportuno, infine, che il laboratorio di analisi, oltre al dato quali-quantitativo inerente il dosaggio analitico effettuato, fornisca anche i valori di riferimento (17) o i valori limiti occupazionali o i valori di *cut off* normati (18), con cui confrontare il dato. In tal modo, infatti, da un lato si facilita l'interpretazione del dato stesso, dall'altro si evidenzia la competenza del laboratorio non solo in ambito analitico ma anche nelle ampie problematiche connesse con la tossicologia occupazionale e la medicina del lavoro in generale.

Scelta della tecnica analitica appropriata nel monitoraggio di agenti chimici

Il continuo evolvere della ricerca scientifica e i progressi tecnologici consentono di disporre oggi di numerosi metodi analitici mediante i quali poter realizzare la determinazione quali/quantitativa di una stessa sostanza chimica. Per i diversi agenti chimici presenti nei luoghi di lavoro e negli ambienti di vita, la scelta della tecnica analitica più appropriata deve basarsi innanzitutto sul livello di concentrazione attesa, sul grado di sensibilità/specificità richiesto all'analisi, sulla complessità della matrice da analizzare, nonché sui tempi e costi dell'analisi stessa (4). In particolare, nel caso di matrici biologiche si presenterà la necessità di considerare eventuali interferenti in esse contenuti, di conoscere l'effettiva stabilità dell'analita di interesse, di definire un'appropriate procedura di pretrattamento/purificazione. Nella scelta del metodo più adatto per valutare l'esposizione ad un dato agente chimico risulterà fondamentale, pertanto, avere un'accurata conoscenza delle possibilità e delle limitazioni intrinseche di ciascuna metodica, in termini di sensibilità analitica, accuratezza, specificità, riproducibilità e costo complessivo della determinazione. Attualmente, sono disponibili strumentazioni di elevata sensibilità e riproducibilità analitica, capaci di fornire risultati specifici ed accurati, il cui utilizzo routinario può essere, però, limitato dagli alti costi delle stesse. Si possono ulteriormente aumentare quando sia necessario purificare il campione, con conseguente aumento dei tempi di analisi. Generalmente, infatti, all'aumentare

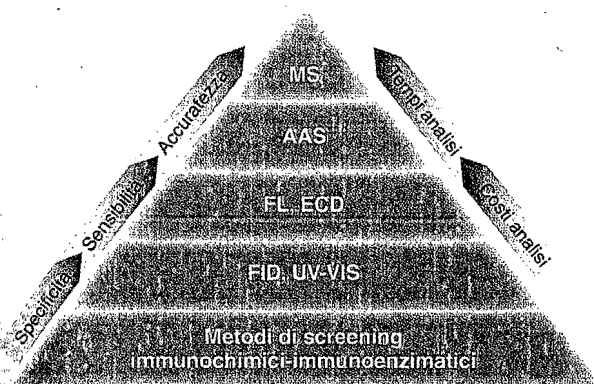


FIGURA 2 Sensibilità, specificità, accuratezza, tempi e costi di una determinazione analitica basata su rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID), assorbimento UV-VIS o a fluorescenza (FL), rivelatore a cattura di elettroni (ECD), assorbimento atomico (AAS), spettrometria di massa (MS).

re delle prestazioni della tecnica analitica adoperata, aumentano anche costi e tempi analitici (figura 2).

La gamma delle apparecchiature e delle prestazioni del laboratorio di medicina del lavoro è stata, poi, ampliata a seguito dell'obbligo introdotto dal D. lgs. 81/08 di procedere a controlli tossicologici finalizzati ad escludere uno stato di uso/abuso di sostanze psicoattive e/o psicotrope nei lavoratori adibiti o da adibire a mansioni che comportino particolari rischi per la salute e

l'incolumità propria e di soggetti terzi. Tale obbligo comporta la possibilità di eseguire test di *screening* in laboratorio nonché procedere, in caso di positività allo *screening*, con analisi di conferma basate sulla cromatografia/spettrometria di massa (18).

A titolo esemplificativo, in tabella 1 sono riportati, per diverse classi di agenti chimici, i possibili marcatori, la matrice ambientale o biologica in cui l'analita è presente e le tecniche analitiche utilizzabili per l'analisi quantitativa. Come si evince dalla tabella, per dosare uno stesso analita è possibile adoperare diverse tecniche: l'utilizzo di una tecnica piuttosto che un'altra dipende spesso dallo specifico obiettivo per cui l'indagine viene condotta. Per chiarire il concetto, si consideri, ad esempio, di dover valutare l'esposizione ambientale a composti inorganici del piombo. Secondo quanto riportato in tabella 1, la determinazione del piombo in matrice ambientale (aria) può essere effettuata sia mediante *inductively coupled plasma mass spectrometry* (ICPMS) sia mediante *atomic absorption spectroscopy* (AAS) con fornetto di grafite o AAS a fiamma, con limiti di sensibilità pari a 0,001, 0,05 e 2,2 ng/m³, che equivalgono a 0,001 × 10⁻⁶, 0,05 × 10⁻⁶ e 2,2 × 10⁻⁶ mg/m³, rispettivamente. Considerando che il valore limite di esposizione professionale relativo al "piombo inorganico e suoi composti" è pari a 0,15 mg/m³ (Allegato XXXVIII del D. lgs. 81/08 e s.m.i.) e nell'intento di utilizzare, come norma prudenziale, tecniche analitiche in grado di rilevare concentrazioni di analita pari ad almeno due

TABELLA 1 Scelta tecnica ottimale

Agente di rischio	Analita	Tecnica ³	Limite di sensibilità ³
Acetone	Acetone ^{1,2}	GC/FID	117 µg/l (aria esalata) 1 µg/l (urina)
		GC/MS	0,049 µl/l (aria esalata) 750 µg/l (urina, sangue)
Benzene	Acido trans,trans-muconico ²	HPLC-UV	2-100 µg/l (urina)
		HPLC/MS	0,22 µg/l (urina)
		GC/MS	10 µg/l (urina)
	Benzene ^{1,2}	GC/FID	29 µg/l (urina)
		HS-SPME-GC/MS	0,2-0,3 µg/m ³ (aria esalata) 38 ng/l (sangue) 25 ng/l (urina)
		GC/FID	16 µg/m ³ (aria esalata) 370 ng/l (sangue) 50 ng/l (urina)
Acido S-fenilmercapturico ²	HPLC/MS	0,2 µg/l (urina)	
	HPLC/FL	0,5 µg/l (urina)	
		GC/MS	1,0-2,4 µg/l (urina)

(Continua)

TABELLA 1 Scelta tecnica ottimale (continuazione)

Agente di rischio	Analita	Tecnica ³	Limite di sensibilità ³
Ciclofosfamide	Ciclofosfamide ¹	GC/MS	0,02-0,15 µg/m ³ (aria) 0,01-0,02 ng/cm ² (area)
		HPLC/UV	1 µg/m ³ (aria)
		HPLC/MS	0,05 µg/m ³ (aria)
	Ciclofosfamide ²	GC/NPD	0,05 µg/ml (sangue)
		GC/ECD	2,5 µg/l (urina)
		GC/MS	0,1-0,25 µg/l (urina)
		HPLC/MS	40 ng/ml (sangue)
Piombo	Piombo ^{1,2}	ICPMS	0,001 ng/m ³ (aria)
		AAS-fornetto grafite	0,05 ng/m ³ (aria) 0,6 µg/dl (sangue) ⁵ 1,1 µg/dl (urina) ⁵
		AAS-fiamma	2,2 ng/m ³ (aria)
n-Esano	n-Esano ^{1,2}	GC/EID	15 µg/l (aria esalata)
		GC/MS	0,5 µg/l (urina)
	2,5-Esandone ²	GC/FID	0,1 µg/ml (urina)
		GC/MS	0,1 µg/ml (urina)
		HPLC/UV	0,03 µg/ml (urina)
		HPLC/FL	0,012 µg/ml (urina)
IPA	IPA ^{1,2}	GC/MS	50-100 pg/m ³
		GC/FID	0,3-0,5 µg/campione
		HPLC/FL	10-100 ng/campione
	1-Ildrossipirene ²	HPLC/FL	0,11 µg/l (urina)
Protossido d'azoto	Protossido d'azoto ^{1,2}	IR	0,04-1 ppm (aria)
		GC/MS	2,7 mg/m ³ (aria) ⁷
		GC/ECD	1 µg/l (urina)

Indicatori da utilizzare in indagini di monitoraggio biologico¹ e monitoraggio ambientale².

³ Minoia C, Perbellini L. Monitoraggio ambientale e biologico dell'esposizione professionale a xenobiotici. Como: Morgan Edizioni Tecniche, 2001.

⁴ Youssefi SM, Shemirani F. J Hazard Mater 2013;254-255C:134-40.

⁵ Arai F et al. Ind Health 1994;32:67-78.

⁶ De Palma G et al. G Ital Med Lav Ergon 2012;34(Suppl 3):44-7.

⁷ Westberg H et al. Int Arch Occup Environ Health 2008;81:829-36.

ordini di grandezza inferiori al valore limite, in questo esempio, risulta necessario utilizzare una tecnica analitica con un limite di sensibilità pari $1500 \times 10^{-6} \text{ mg/m}^3$. Nello specifico caso qui riportato, quindi, tutte e tre le tecniche risultano più che adeguate e poiché l'ICPMS è solitamente più costosa, l'AAS potrebbe essere preferibile. Al contrario, un altro esempio può essere fornito dalla necessità di valutare l'esposizione a cromo di stronzio: il valore limite proposto dall'ACGIH (ACGIH 2012)

è di $0,0005 \text{ mg/m}^3$, di gran lunga inferiore rispetto a quello relativo ai composti insolubili del Cr VI, pari a $0,01 \text{ mg/m}^3$: questo è uno dei casi in cui potrebbe risultare opportuno richiedere indagini in ICPMS piuttosto che in AAS.

In base a quanto detto finora, quali sono le domande che il medico del lavoro dovrebbe porsi allo scopo di stabilire quale tecnica analitica richiedere? Di seguito si riporta uno schema riassuntivo dei quesiti da porsi:

- qual è il limite di sensibilità della tecnica analitica? È adeguato allo scopo prefisso?
- quali sono i requisiti di specificità, accuratezza, riproducibilità? Rispettano le esigenze dell'indagine?
- qual è il costo complessivo dell'analisi? È giustificato dal tipo di indagine richiesto? Rientra nel budget disponibile?
- quali sono i tempi di risposta previsti? Sono adeguati al rispetto delle scadenze secondo la normativa vigente?

Con l'intento di fornire le informazioni indispensabili non solo per la scelta della strategia analitica, ma anche per poter valutare l'affidabilità del dato analitico fornito dal laboratorio, di seguito verranno presentate le principali tecniche analitiche di cui un moderno laboratorio di medicina del lavoro può avvalersi per la determinazione degli agenti chimici presenti nei luoghi di lavoro, focalizzando l'attenzione sulle possibili applicazioni di ciascuna tecnica da sola o in combinazione con altre (tecniche ifenate) ed evidenziandone le criticità e le potenzialità analitiche.

Spettrofotometria

Le tecniche spettrofotometriche (o spettroscopiche) si basano sulla misura della radiazione assorbita ad una particolare lunghezza d'onda da una soluzione contenente l'analita o le classi di analiti di interesse (ad esempio idrocarburi policiclici aromatici, solventi aromatici, ecc.) (19). Le analisi possono prevedere l'utilizzo della spettrofotometria tal quale (per l'analisi, ad esempio, di sostanze organiche) o come rivelatore a valle di una tecnica di separazione (tipico l'accoppiamento con la cromatografia liquida ad alte prestazioni, HPLC), adoperando radiazioni nel range spettrale dell'ultravioletto (UV: 10-400 nm) e del visibile (VIS: 380-700 nm), in quanto la maggioranza delle molecole organiche mostra caratteristiche bande di assorbimento in tali regioni dello spettro elettromagnetico. Alcune applicazioni specifiche, come, ad esempio, la determinazione di monossido di carbonio, sfruttano la radiazione infrarossa (IR: 700 nm-1 mm) (20). Nell'ambito della medicina del lavoro, l'utilizzo di consolidate tecniche spettrofotometriche nell'analisi di campioni inorganici di matrice ambientale o biologica consente sia indagini qualitative (che consistono, cioè, nella verifica dell'assorbimento da parte del campione in esame delle bande caratteristiche di una specifica sostanza di interesse eventualmente presente nel campione) sia quantitative, visto che l'entità dell'assorbimento della radiazione è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita (legge di Lambert-Beer).

La specificità dei metodi spettrofotometrici è limitata dal fatto che molecole simili e/o interferenti presenti nella matrice possono mostrare un assorbimento significativo nella stessa regione dello spettro caratteristica dell'analita di interesse e, per questo, spesso si preferisce adoperare tecniche più specifiche, quali la cromatografia liquida o la spettrometria di massa.

Un esempio in tal senso è rappresentato dalla determinazione dell'acido *trans,trans*-muconico (metabolita urinario del benzene; per approfondimenti vedere capitolo 75 *Composti organici - Benzene, stirene, toluene e xilene*): la matrice urinaria presenta numerosi composti interferenti che assorbono alla stessa lunghezza d'onda dell'analita, limitando la sensibilità e la specificità dei metodi HPLC/UV rispetto a quelli basati sulla spettrometria di massa (tabella 1).

Cromatografia liquida ad alta efficienza

La cromatografia liquida ad alta efficienza (HPLC, *high performance liquid chromatography*) consente la separazione delle numerose sostanze contenute in miscele complesse, mediante analisi rapide (nell'ordine dei pochi minuti) e caratterizzate da un elevato potere risolutivo, in modo da evidenziare la presenza di analiti anche quando le concentrazioni siano a livello di tracce. L'analisi HPLC consente di analizzare molti agenti chimici presenti in soluzione (21).

La versatilità del sistema di separazione HPLC fa sì che le applicazioni nel campo dell'analisi chimica condotta a scopi di monitoraggio siano numerose. Tra queste si ricordano l'analisi di composti pericolosi tra cui erbicidi, insetticidi, chinoni, ftalati, la determinazione di agenti cancerogeni (tra cui nitrosammine, composti policiclici aromatici, aflatossine), la rivelazione di diversi solventi organici opportunamente derivatizzati (come il 2,4- e il 2,6-toluendiisocianato, l'1,6-esametilene diisocianato o il metilene difenil isocianato) o di loro metaboliti (ad esempio nel caso di benzene e xilene, è possibile quantificare mediante HPLC i rispettivi metaboliti, quali l'acido *trans,trans*-muconico e l'acido metil-ippurico) o degli acidi mercapturici (derivati di coniugazione di metaboliti di solventi organici col glutatione) oppure, ancora, di addotti proteici e al DNA (22,23). L'HPLC consente, inoltre, l'analisi di matrici inorganiche complesse, quali olii, catrame e resine.

Le sensibilità analitiche ottenibili dipendono in larga misura dalla natura del campione da analizzare, dalla complessità della matrice e dal particolare rivelatore scelto. Il sistema HPLC può essere accoppiato a diversi rivelatori, primi tra tutti rivelatori UV-VIS e a fluorescenza (FL) oltre a quelli basati sulla spettrometria di massa (MS). La scelta del rivelatore da accoppiare all'HPLC dipende essenzialmente dalle caratteristiche chimiche dell'analita in esame e dalla concentrazione attesa. Il rivelatore a fluorescenza, ad esempio, assicura elevata specificità nell'identificazione dei composti ed il raggiungimento di sensibilità analitiche dell'ordine dei pg/ml, tipiche degli spettrometri di massa (vedere paragrafo *Spettrometria di massa*). Ciò deriva dal fatto che sono poche le molecole definite "fluorofori naturali", ossia molecole in grado di rispondere al rivelatore a fluorescenza senza necessità di modificarne opportunamente la struttura chimica (un esempio è rappresentato delle

antracicline, farmaci di crescente utilizzo nelle terapie oncologiche); l'analisi in HPLC/FL sarà caratterizzata da un rumore chimico trascurabile, con un conseguente aumento della specificità e della sensibilità analitica. Sistemi HPLC accoppiati a rivelatori UV-VIS sono caratterizzati, invece, da sensibilità dell'ordine dei ng/ml ed anche la specificità è minore rispetto ai sistemi con rivelatori FL o MS: ciò è dovuto al fatto che sono molte le molecole che mostrano assorbimento nella regione UV-VIS e sarà, pertanto, di primaria importanza paragonare i cromatogrammi registrati per i campioni incogniti con quelli ottenuti dall'analisi di standard di riferimento.

La possibilità di abbinare all'HPLC diversi rivelatori in serie tra loro consente, da un lato, di aumentare la specificità dell'identificazione delle molecole incognite e, dall'altra, di identificare un maggior numero di molecole presenti in miscele complesse in un'unica analisi. Ad esempio, se nello stesso campione sono presenti analiti di diversa natura chimica, per ciascuno di essi è opportuno poter disporre del rivelatore più conveniente in termini di specificità, sensibilità ed accuratezza della determinazione analitica. Indipendentemente dal rivelatore scelto, la risposta registrata per un campione incognito dipenderà dalla quantità di sostanza campionata, introdotta nel sistema cromatografico e rivelata: la determinazione della concentrazione dell'analita sarà effettuata paragonando la risposta registrata per il campione con quella di standard di riferimento a concentrazione nota della sostanza in esame.

Gas cromatografia

La cromatografia in fase gassosa (GC, *gas chromatography*) è una tecnica ad alto potere risolutivo che consente la separazione delle sostanze in base a proprietà chimico-fisiche quali temperatura di ebollizione, polarità e dimensioni delle molecole; la tecnica consente l'analisi di sostanze in fase gassosa o volatili (24).

In origine, la gas cromatografia è stata sviluppata per l'analisi di molecole volatili e dalla struttura chimica semplice, come ad esempio i solventi organici, ma oggi le applicazioni si estendono anche a sostanze poco volatili e di natura complessa, grazie alla disponibilità di un'ampia gamma di colonne cromatografiche e, soprattutto, alla possibilità di modificare la struttura chimica della sostanza mediante opportuna reazione di derivatizzazione, capace di modificare la polarità della molecola, abbassandone il punto di ebollizione. La possibilità, poi, di accoppiare la GC a diversi rivelatori e i minori costi dell'apparecchiatura rispetto ad un sistema basato sulla cromatografia liquida, rendono la gas cromatografia una delle tecniche maggiormente utilizzate nei laboratori di analisi. Le applicazioni della gas cromatografia vanno dall'analisi di solventi organici (tra cui idrocarburi policiclici aromatici, chetoni, alcoli, eteri, mercaptani, aldeidi), all'analisi di policlorobifenili, pesticidi organofosforici, ammine e derivati amminici.

Nelle analisi quantitative, anche in GC come per la cromatografia HPLC, i risultati derivanti dall'analisi di un campione incognito vengono paragonati a quelli provenienti da standard di riferimento a concentrazione nota.

Tra i rivelatori maggiormente utilizzati si ricordano il FID (*flame ionization detector*, rivelatore a ionizzazione di fiamma), l'ECD (*electron capture detector*, rivelatore a cattura di elettroni), l'NPD (*nitrogen-phosphorus detector*, rivelatore azoto-fosforo), e la spettrometria di massa (*mass spectrometry*, MS). Le sensibilità analitiche e la gamma di molecole analizzabili con i diversi rivelatori sono diverse: il FID è il rivelatore più versatile, consente di evidenziare un elevato numero di molecole organiche, presenta un costo contenuto ed è di semplice utilizzo. Nel caso di matrici ambientali (aria), quando l'intera massa campionata viene analizzata, le sensibilità analitiche raggiungibili con il FID, tipicamente nell'ordine dei mg/campione, possono raggiungere anche concentrazioni dell'ordine di parti per miliardo (ppb). I rivelatori ECD e NPD sono più specifici rispetto al FID, dal momento che ad essi rispondono soltanto molecole capaci, rispettivamente, di assorbire elettroni (come l'ossido di etilene o i policlorobenzoni) o contenenti azoto/fosforo (come l'acrilonitrile, l'N,N-dimetilformammide, ecc.). La maggiore specificità è anche accompagnata da maggiori sensibilità analitiche, dell'ordine dei µg/campione.

A differenza di quanto accade per le analisi che sfruttano l'HPLC, nei sistemi basati sulla gas cromatografia non è possibile accoppiare più rivelatori in serie, dal momento che la vaporizzazione iniziale del campione da introdurre nel GC e la successiva rivelazione dell'effluente dalla colonna cromatografica implicano la distruzione del campione stesso. Sarà, pertanto, fondamentale condurre uno studio iniziale sulle proprietà chimiche delle molecole in esame ed una stima delle concentrazioni attese, in modo da scegliere il rivelatore più appropriato in termini di *performance* analitiche, tempi e costi complessivi dell'analisi.

Spettrometria di massa

L'analisi mediante tecniche di spettrometria di massa (MS) consente di misurare il rapporto massa su carica (m/z) dell'analita e, quindi, di ricavare informazioni riguardanti la composizione elementare e la struttura della sostanza in esame o procedere ad un'accurata analisi quantitativa. È questa una tecnica sensibile, specifica e di elevata riproducibilità, applicabile, visto l'elevato grado di automazione dei moderni spettrometri, ad analisi di routine (25).

La tecnica si basa sulla ionizzazione e frammentazione delle molecole e sulla separazione degli ioni generati in fase gassosa. Data la necessità di analizzare in fase gassosa, inizialmente si è assistito allo sviluppo di sistemi GC/MS, mentre a partire dagli anni '80, l'intro-

duzione di particolari ed innovative tecniche di ionizzazione ha reso possibile lo sviluppo di sistemi HPLC/MS, che oggi consentono l'analisi di pressoché tutte le classi di composti chimici. Va ricordato, tuttavia, che i sistemi HPLC/MS presentano costi sensibilmente superiori rispetto a quelli GC/MS.

Nell'utilizzare la spettrometria di massa a scopi quantitativi sarà indispensabile disporre di un'opportuna curva di calibrazione allo scopo di mettere in relazione la risposta strumentale registrata con la concentrazione dell'analita di interesse: *step* imprescindibile per analisi quantitative condotte in MS, dal momento che la correlazione tra risposta strumentale e concentrazione dell'analita è influenzata da numerosi parametri.

È opinione largamente condivisa il considerare la spettrometria di massa come una tecnica di rivelazione universale, visto che il campo delle possibili applicazioni si estende alla quasi totalità delle molecole, con livelli di specificità, sensibilità ed accuratezza superiori a tutte le altre tecniche (26). Ad esempio, come già accennato, l'acido *trans,trans*-muconico può essere dosato sia mediante HPLC-UV che in LC/MS o in GC/MS (tabella 1), con livelli di sensibilità dell'ordine di 20,0 µg/l, 0,22 µg/l e 10 µg/l, rispettivamente (27-29); la spettrometria di massa, dunque, offre elevati requisiti di sensibilità; di contro, i costi e i tempi delle analisi sono maggiori ed è necessario disporre di personale tecnico altamente specializzato.

Spettrofotometria di assorbimento atomico ed ICPMS

La spettrofotometria di assorbimento atomico (AAS) e la combinazione dell'*inductively coupled plasma* con la spettrometria di massa (ICPMS) rappresentano la scelta ottimale nelle indagini di monitoraggio volte ad evidenziare inquinamento e/o esposizione a composti elementari, metallici e non, presenti a livello di tracce (4,30).

Come le altre forme di spettrofotometria, anche l'assorbimento atomico si basa sull'interazione tra radiazione elettromagnetica incidente, specifica per ogni analita, e campione in esame; in particolare, una volta atomizzata, la materia assorbe la radiazione incidente (in tempi dell'ordine di 10^{-14} - 10^{-7} s) e gli atomi danno luogo a transizioni elettroniche quantizzate, interagendo solo con radiazioni di lunghezza d'onda caratteristiche. Di qui la possibilità di registrare, per ciascun elemento, uno spettro caratteristico e, mediante l'analisi di calibranti preparati in matrice, di correlare l'entità dell'assorbimento alla concentrazione dell'elemento in esame.

L'AAS è tipicamente utilizzata per l'analisi di elementi metallici; con limiti di sensibilità che variano a seconda del sistema di atomizzazione: si passa da una sensibilità di 10-1000 ng/g in AAS in fiamma, a 0,01-1 ng/g in forno: la precisione dell'analisi di AAS in fiamma è dell'ordine dello 0,1-1%, mentre con il fornello è dell'ordine dello 0,5-5%.

Quando si debbano raggiungere livelli di sensibilità pari a 0,01-0,1 pg/g è necessario ricorrere all'ICPMS, caratterizzata anche da minori tempi di analisi (2-5 minuti per la determinazione di tutti gli elementi presenti in un campione, anche se numerosi, contro tempi di 10-15 s/elemento e 3-4 min/elemento per l'AAS in fiamma e in fornello, rispettivamente); inoltre, l'ICPMS consente di analizzare anche elementi non metallici ed elementi che tendono a formare composti refrattari, quali boro, fosforo, uranio e tungsteno; di fatto, è considerata la migliore tecnica per l'analisi degli elementi presenti in tracce (31).

Tecniche per l'accertamento dell'assunzione di sostanze stupefacenti

Le procedure diagnostiche e medico-legali finalizzate a valutare l'assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope nei lavoratori adibiti o da adibire a mansioni a rischio, prevedono che il medico competente proceda all'esecuzione di indagini di primo livello (18,32) (per approfondimenti, vedere capitolo 109 *Abitudini voluttuarie - Droghe*). In particolare, i test diagnostici di primo livello sono costituiti da test di *screening* (basati su tecniche immunochimiche/immunoenzimatiche) eseguiti su campioni di urina estemporanei, il cui risultato, in caso di positività, va confermato, ripetendo l'analisi mediante cromatografia/spettrometria di massa (analisi di conferma di primo livello). In accordo con la normativa vigente, i dispositivi di *screening* da utilizzare devono consentire la rivelazione di oppiacei, cannabinoidi, cocainici, metadone, amfetamina, metamfetamina, 3,4-metilendioossimetamfetamina (MDMA o *ecstasy*) e, per alcune regioni, buprenorfina (33). Il Provvedimento 18 settembre 2008 definisce i livelli minimi di sensibilità (*cut off*, ovvero concentrazione al di sopra della quale un campione va considerato "positivo"), che i dispositivi di *screening* devono offrire per le diverse sostanze da rivelare (pari a 300 ng/ml per oppiacei, cocainici e metadone, 500 ng/ml per amfetamina, metamfetamina e MDMA, 50 ng/ml per i cannabinoidi e 5 ng/ml per la buprenorfina) (29,33).

I test di *screening* immunochimici sono ampiamente utilizzati per l'analisi di sostanze d'abuso in matrici biologiche e, in generale, si basano sull'interazione di una molecola bersaglio (antigene) con un corrispondente anticorpo specifico. I test immunochimici possono essere di tipo qualitativo, ovvero restituire risposte "positivo/negativo" (ad esempio, mediante la visualizzazione di bande colorate sul dispositivo dopo che esso sia stato addizionato di una piccola aliquota del campione biologico), oppure di tipo semi-quantitativo, che sfruttano curve di calibrazione costruite a partire dall'analisi di calibranti e campioni di controllo di qualità.

Tra le tecniche immunochimiche utilizzate per la determinazione di sostanze d'abuso vanno segnalate: *radioimmunoassay* (RIA) che utilizza radioisotopi, *lumi-*

nescence immunoassay (LIA) che sfrutta la reazione dell'analita di interesse con molecole chemiluminescenti o *fluorescence immunoassay* (FIA) che sfrutta la reazione dell'analita con fluorofori naturali.

Tra le tecniche immunoenzimatiche, si ricorda l'*enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), che utilizza anticorpi marcati (31). Le tecniche succitate consentono di rivelare un'ampia gamma di sostanze, con tempi di analisi ridotti e minimo trattamento preliminare del campione. Nel caso dei test immunochimici, inoltre, va sottolineato che, data la loro relativa semplicità di utilizzo, possono essere eseguiti direttamente *on site* in sede di visita medica.

Il punto critico dei test immunochimici/immunoenzimatici è la scarsa specificità, ovvero la possibilità che il dispositivo reagisca con molecole simili all'analita di interesse, soprattutto alle basse concentrazioni e in presenza di matrici complesse quale quella urinaria: proprio da tale limite intrinseco della tecnica nasce l'esigenza di procedere ad analisi di conferma di un dato positivo che, di conseguenza, può essere considerato solo indice di una presunta positività. Tale limite, particolarmente critico per alcune classi di sostanze, prime tra tutte le amfetamine, pone l'accento sulla necessità di basare la scelta del dispositivo sull'accuratezza analitica del test al livello del *cut off* e non sul rispetto del valore di *cut off sic et simpliciter* (ovvero alla sensibilità del test), quale parametro per valutare l'efficacia diagnostica dei test immunochimici rapidi. L'accuratezza al livello del *cut off* riflette, infatti, il numero di campioni con concentrazioni uguali o prossime al valore di *cut off* risultati falsamente negativi all'analisi di *screening*: un test sensibile fino al valore di *cut off*, ma caratterizzato da un basso valore di accuratezza è assolutamente inadatto, dal momento che il numero di campioni falsamente negativi che il test restituisce sarà elevato (34).

Come anticipato in precedenza, un campione positivo al test di *screening* va sottoposto ad analisi di conferma, utilizzando tecniche ifenate di cromatografia/spettrometria di massa (GC/MS o HPLC/MS), in grado di garantire maggiore specificità all'analisi.

PUNTI RILEVANTI

- Il medico competente collabora con il datore di lavoro nella valutazione dei rischi e nell'elaborazione del DVR (D. lgs. 81/08 e s.m.i., art 29); la valutazione dei rischi può avvalersi di indagini di monitoraggio in grado di fornire dati analitici inerenti i livelli di esposizione ad agenti di rischio
- Nel caso degli agenti chimici, i dati provenienti dalle campagne di monitoraggio vengono forniti da laboratori analitici a seguito di determinazione delle sostanze di interesse presenti in matrici complesse (ad es. aria-ambiente o fluidi biologici) attraverso l'utilizzo di opportuni metodi analitici
- Il medico del lavoro deve essere in grado di valutare l'affidabilità dei dati forniti dai laboratori di analisi: l'affidabilità del dato è garantita dall'utilizzo di procedure analitiche, validate secondo i requisiti richiesti in ambito internazionale, e dalla gestione in qualità del laboratorio di analisi

- Una stessa sostanza può essere quantificata adoperando tecniche differenti per sensibilità, specificità, tempi e costi analitici: è necessario che il medico del lavoro sia informato sul tipo di tecnica analitica da utilizzare, in modo da verificare che soddisfi gli scopi dell'indagine

Bibliografia

1. FDA (US FDA, Food and Drug Administration), Center for Drug Evaluation Research (2001). Guidance for Industry: bio-analytical method validation. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf> (ultimo accesso 29-1-2014).
2. FDA (US FDA, Food and Drug Administration), Center for Drug Evaluation Research (2000). Guidance for industry - analytical procedures and methods validation - chemistry, manufacturing, and controls documentation. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf> (ultimo accesso 29-1-2014).
3. Validation. In: De Bièvre P, Günzler H (eds). Chemical measurement. New York: Springer, 2005.
4. Di Nardi SR (ed.). The occupational environment: its evaluation, control, and management, 2nd ed. Falls Church, VA: AIHA Press, 2003.
5. Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD series on principles of GLP and compliance monitoring. Number 4 (revised). Quality assurance and GLP. ENV/JM/MONO(99)20. Paris (1999). [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(99\)20&doLanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(99)20&doLanguage=en) (ultimo accesso 29-1-2014).
6. UNI EN ISO 9001:2008. Sistemi di gestione per la qualità: requisiti. <http://store.uni.com> (ultimo accesso 29-1-2014).
7. Eurachem: EURACHEM guide. The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics (1998). [http://www.eurolab-d.bam.de/eurachem_dokumente/The%20Fitness%20for%20Purpose%20of%20Analytical%20Methods%20A%20Laboratory%20Guide%20to%20Method%20Validation%20and%20Related%20Topics%20\(1998\).pdf](http://www.eurolab-d.bam.de/eurachem_dokumente/The%20Fitness%20for%20Purpose%20of%20Analytical%20Methods%20A%20Laboratory%20Guide%20to%20Method%20Validation%20and%20Related%20Topics%20(1998).pdf).
8. van de Merbel NC. Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques. Trends in Analytical Chemistry 2008;27:924-33.
9. Guadagni R, Miraglia N, Simonelli A, Silvestre A, Lambertini M, Feola D, Acampora A, Sannolo N. Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method validation for the determination of endogenous substances: urinary hexanal and heptanal as lung tumor biomarkers. Analytica Chimica Acta 2011;701:29-36.
10. Huber L. Validation and qualification in analytical laboratories, 2nd ed. London: Informa Healthcare, 2007.
11. OECD series on principles of glp and compliance monitoring. Number 5. Compliance of laboratory suppliers with glp principles (as revised in 1999). ENV/JM/MONO(99)21. Paris (1999). [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?doLanguage=en&cote=env/jm/mono\(99\)21](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?doLanguage=en&cote=env/jm/mono(99)21) (ultimo accesso 29-1-2014).
12. OECD Series on Principles of GLP and compliance monitoring. Number 1.5 OECD principles on good laboratory practice (as revised in 1997). ENV/MC/CHEM(98)17. Paris (1997). [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/mc/chem\(98\)17&doLanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/mc/chem(98)17&doLanguage=en) (ultimo accesso 29-1-2014).
13. OECD Series on principles of GLP and compliance monitoring. Number 1. Establishment and control of archives

- operate in compliance with the principles of GLP. ENV/JM/MONO(2007)10. Paris (2007). [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=en/jm/mono\(2007\)10](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=en/jm/mono(2007)10) (ultimo accesso 29-1-2014).
14. United States Office Environmental Protection Agency (EPA). EPA/600/B-07/001. Guidance for preparing standard operating procedures (SOPs). EPA QA/G-6 (April, 2007). <http://www.epa.gov/QUALITY/qs-docs/g6-final.pdf> (ultimo accesso 29-1-2014).
 15. Daniel WW (ed). Statistica (medica). Weinheim: SES John Wiley & Sons', 1996.
 16. Meyer VR. Measurement uncertainty. *J Chromatogr A* 2007;1158:15-24.
 17. Società Italiana Valori di Riferimento. II lista (2005) e III lista (2011). <http://www.valoridiriferimento.it> (ultimo accesso 29-1-2014).
 18. Conferenza Unificata. Provvedimento 30 ottobre 2007. Intesa, ai sensi dell'articolo 8, comma 6, della Legge 5 giugno 2003, n. 131, in materia di accertamenti di assenza di tossicodipendenza. *Gazzetta Ufficiale* n. 266 del 15 novembre 2007.
 19. Hollas JM. *Modern spectroscopy*, 2nd ed. Weinheim: Wiley, 2004.
 20. Minoia C, Perbellini L. Monitoraggio ambientale e biologico dell'esposizione professionale a xenobiotici. *Solventi II*. Volume 6. Milano: Morgan Edizioni Tecniche, 2001.
 21. Majors RE. *Cromatografia in fase solida e liquida*. In: Bauer HH, Christian CD, O'Reilly JE (eds). *Analisi strumentale*. Padova: Piccin, 1985.
 22. Marczyński B, Raulf-Heimsoth M, Spickenheuer A, Pesch B, Kendzia B, Mensing T, Engelhardt B, Lee EH, Schindler BK, Heinze E, Welge P, Bramer R, Angerer J, Breuer D, Kafferlein HU, Brüning T. DNA adducts and strand breaks in workers exposed to vapours and aerosols of bitumen: associations between exposure and effect. *Arch Toxicol* 2011;85(Suppl 1): S53-64.
 23. Schettgen T, Bertram J, Kraus T. Accurate quantification of the mercapturic acids of acrylonitrile and its genotoxic metabolite cyanoethylene-epoxide in human urine by isotope-dilution LC-ESI/MS/MS. *Talanta* 2012;98:211-9.
 24. Littlewood AB. *Gas chromatography: principles, techniques and applications*, 2nd ed. New York: Academic Press, 1970.
 25. Gelpi E. *Advances in mass spectrometry*. Weinheim: Wiley, 2001.
 26. Farré M, Kantiani L, Petrovic M, Pérez S, Barceló D. Achievements and future trends in the analysis of emerging organic contaminants in environmental samples by mass spectrometry and bioanalytical techniques. *J Chromatogr A* 2012;1259:86-99.
 27. Hoet P, De Smedt E, Ferrari M, Imbriani M, Maestri L, Negri S, De Wilde P, Lison D, Haufroid V. Evaluation of urinary biomarkers of exposure to benzene: correlation with blood benzene and influence of confounding factors. *Int Arch Occup Environ Health* 2009;82:985-95.
 28. Tranfo G, Paci E, Sisto R, Pignini D. Validation of an HPLC/MS/MS method with isotopic dilution for quantitative determination of trans,trans-muconic acid in urine samples of workers exposed to low benzene concentrations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008;867:26-31.
 29. Scherer G, Renner T, Meger M. Analysis and evaluation of trans,trans-muconic acid as a biomarker for benzene exposure. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998;717:179-99.
 30. Giebmann U, Greb U. High resolution ICP-MS - a new concept for elemental mass spectrometry. *Fresenius J Anal Chem* 1994;350:186-93.
 31. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B (eds). *Clarke's. Analysis of drugs and poisons*, 3rd ed. London: Pharmaceutical Press, 2004.
 32. Provvedimento 18 settembre 2008. Conferenza Permanente per i Rapporti tra lo Stato, le Regioni e le Province Autonome di Trento e Bolzano. Accordo, ai sensi dell'articolo 8, comma 2 dell'Intesa in materia di accertamento di assenza di tossicodipendenza, perfezionata nella seduta della Conferenza Unificata del 30 ottobre 2007 (Rep Atti n 99/CU), sul documento recante "Procedure per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi" (Rep Atti n 178/CSR). *Gazzetta Ufficiale, Serie Generale* n. 236 dell'8 ottobre 2008.
 33. Recepimento protocollo operativo per gli accertamenti sanitari di assenza di tossicodipendenza o di assunzione di sostanze stupefacenti o psicotrope in lavoratori addetti a mansioni che comportano particolari rischi per la sicurezza, l'incolumità e la salute di terzi ai sensi dell'intesa Stato/Regioni (provvedimento n 99/CU del 30/10/2007) e dell'Accordo Stato/Regioni (rep atti n 178 del 18/9/2008). BURC (Bollettino Ufficiale della Regione Campania) 2009;58 (Deliberazione n 1448).
 34. Basilicata P, Pieri M, Settembre V, Galdiero A, Della Casa E, Acampora A, Miraglia N. Screening of several drugs of abuse in Italian workplace drug testing: performances comparison of an on-site screening tests and an fluorescence polarization immunoassay-based device. *Anal Chem* 2011;83:8566-74.