



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

in Biologia Molecolare e Applicata

**Nuova metodologia per la conta dei corpuscoli  
dell'asbesto**

*Asbestos bodies counts: a new method*

Tesi di Laurea Magistrale di:

Angela L. Cianfarani

Relatore: Chiar.mo Prof.

Mauro Pesaresi

Sessione Luglio 2021

Anno Accademico 2020-2021

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b> .....	3
<b>Capitolo primo</b> .....	4
<b>ASBESTO</b> .....	4
1.1 Le dimensioni del fenomeno .....	4
1.2 Definizione .....	6
1.3 Corpi di amianto .....	9
1.4 Struttura e sviluppo.....	10
1.5 Presenza e distribuzione dei corpi di amianto .....	19
1.6 Quantificazione dei corpi .....	21
1.7 Corpi di amianto e tipo di fibra .....	26
<b>Capitolo secondo</b> .....	29
<b>MESOTELIOMA</b> .....	29
2.1 Definizione e descrizione.....	29
2.2 Aspetti clinico-patologici del mesotelioma .....	31
2.3 Epidemiologia e sanità pubblica .....	32
2.4 Diagnosi precoce e sorveglianza.....	38
2.5 Anatomia patologica .....	39

2.6 Criteri di definizione dei casi di interesse del ReNaM .....	44
<b>Capitolo terzo</b> .....	52
<b>ALTRE PATOLOGIE ASBESTO-CORRELATE</b> .....	52
3.1 Placche pleuriche .....	52
3.2 Asbestosi .....	53
3.3 Carcinoma del polmone .....	55
3.4 Altre neoplasie .....	57
<b>Capitolo quarto</b> .....	59
<b>METODICA TRADIZIONALE E NUOVA METODICA PER LA CONTA DELLE FIBRE</b> .....	59
4.1 Materiali e reagenti .....	59
4.2 Metodi .....	61
4.3 Procedure .....	61
4.4 Conta dei corpuscoli dell'asbesto .....	74
<b>Capitolo quinto</b> .....	75
<b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	75
<b>CONCLUSIONE</b> .....	86
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	88

## INTRODUZIONE

L'esposizione protratta all'asbesto è causa dello sviluppo di tumore polmonare maligno denominato mesotelioma.

La diagnosi di mesotelioma non è sempre facile e debbono essere utilizzate diverse metodiche per accertare il nesso di causa tra la malattia e l'esposizione all'agente patogeno.

La comprovata capacità patogena di dosi molto basse di amianto, la attuale mancanza di conoscenze riguardo il livello di esposizione al di sotto del quale l'effetto non è più osservabile, la peculiare importanza di fattori di suscettibilità individuale, rendono complessa anche la valutazione delle responsabilità e degli eventuali comportamenti colposi.

Per una diagnosi di certezza o di probabilità, posto che sono coinvolti diversi ambiti giuridici, vale a dire quello penale e quello civile, è opportuno integrare ad uno studio istologico ed istochimico su tessuto una *procedura analitica* che consenta una valutazione quantitativa dei corpi e delle fibre dell'asbesto, in grado di garantire la sensibilità e la rapidità del metodo.

## **Capitolo primo**

### **ASBESTO**

#### **1.1 Le dimensioni del fenomeno**

In Italia solo una minoranza delle persone che hanno subito un'esposizione lavorativa ad amianto è stata oggetto di identificazione ed è entrata in qualche programma di sorveglianza sanitaria o epidemiologica.

La domanda di un contatto con le strutture sanitarie, quando presente, spesso non è stata esaudita o non è stata incanalata in un percorso organizzato, programmato e monitorato nel tempo, come testimoniano gli interventi alla Tavola Rotonda.

Bisogna anche tenere in considerazione il numero dei lavoratori esposti e come la dimensione del fenomeno si interfacci con aspetti collaterali, ma influenti, sulla sorveglianza sanitaria legati al potenziale riconoscimento di malattia professionale o ad altri aspetti previdenziali.

La legge di dismissione dell'amianto ha portato all'emersione di circa 600.000 persone che riportano di essere state esposte sul lavoro per almeno 10 anni e hanno avanzato domanda all'Istituto Nazionale per la Previdenza Sociale (INPS) per accedere al prepensionamento (in realtà le domande non rappresentano che una parte dei soggetti esposti).

La domanda doveva essere valutata dall'Istituto Nazionale per l'Assicurazione contro gli Infortuni sul Lavoro (INAIL) e accolta se da questi fosse stata ritenuta presente un'esposizione almeno decennale al valore medio giornaliero di 100 fibre/litro.

Tuttavia, il beneficio previdenziale andava sempre assegnato quando il richiedente fosse riconosciuto dall'INAIL affetto da una malattia da amianto, tra le quali sono incluse le placche pleuriche, benché la loro presenza non comporti, secondo l'Istituto assicuratore, una percentuale di danno tale da comportare un indennizzo o una rendita.

Tra gli addetti di diversi settori produttivi e per numerose situazioni lavorative dove si è usato amianto è comune riscontrare, trascorsa una lunga latenza, una percentuale di soggetti affetti da placche pleuriche superiore al 20%.

Inoltre, per i dipendenti di aziende ancora attive o solvibili, un interesse anche solo alla rilevazione di malattie da amianto deriva dalla possibilità di ottenere in sede civilistica dal datore di lavoro il risarcimento del danno, che consiste nella differenza tra quanto versato dall'INAIL a titolo di indennizzo e quanto avrebbe dovuto essere soddisfatto secondo i criteri di valutazione di un risarcimento integrale. Anche in questo caso si ha interesse anche alla sola diagnosi radiologica di placche pleuriche.

In conclusione, è necessario tenere presente che la domanda di esposti di sottoporsi a radiografie del torace o TC del torace può essere motivata dall'obiettivo, legittimo ma non necessariamente convergente con i criteri d'inclusione in programmi di screening del tumore del polmone, di ottenere il riconoscimento di malattia professionale per accedere direttamente al beneficio previdenziale o di risarcimento del danno biologico differenziale.

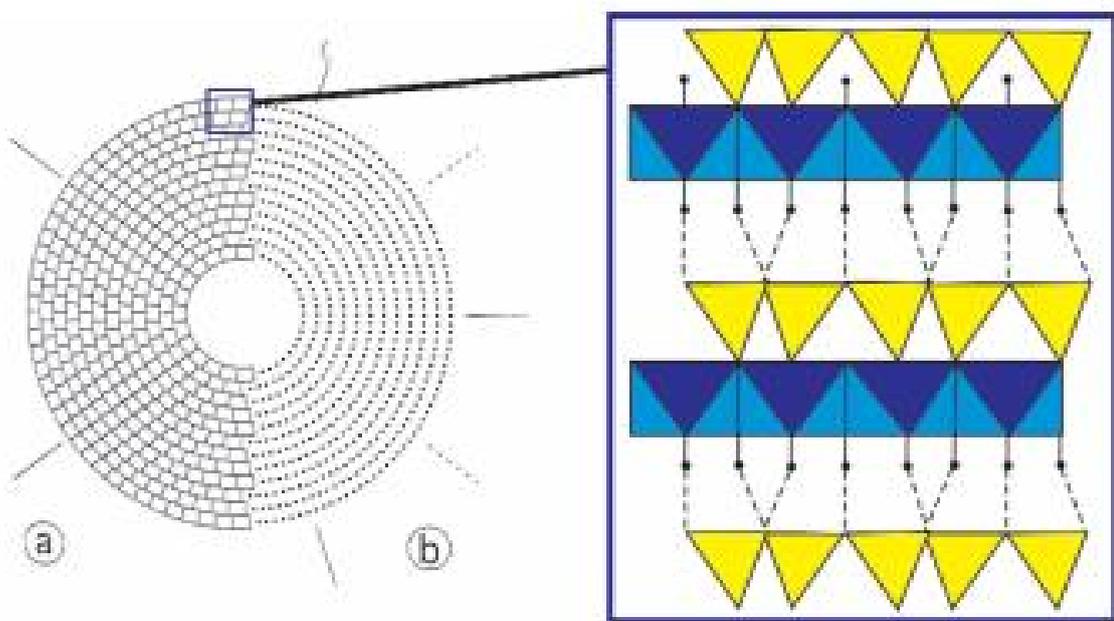
## **1.2 Definizione**

Secondo la classificazione della Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (AIRC), l'asbesto rientra nel gruppo delle sostanze cancerogene certe per l'uomo<sup>1</sup>.

Il termine generico "asbesto" o "amianto" (rispettivamente dal greco *perpetuo*, *incorruttibile*) fa riferimento ad un gruppo di sei minerali naturali di aspetto fibroso e struttura microcristallina appartenenti alla classe chimica dei silicati. Le serie mineralogiche sono due ed in particolare quella degli *anfiboli* e del *serpentino*.

Al gruppo del *serpentino* appartiene una sola varietà, il crisotilo, altresì definito "amianto bianco": è un silicato di magnesio idrato la cui struttura è definita dall'alternanza di strati tetraedrici  $[\text{SiO}_4]$  con strati ottaedrici  $\text{MgO}_2(\text{OH})_4$ , con formula ideale  $\text{Mg}_3\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$  (figura 1).

In genere il crisotilo ha una struttura cilindrica derivante dall'incurvamento degli strati tetraedrico ed ottaedrico, responsabile del suo abito fibroso e del suo aspetto curvilineo macroscopico<sup>2</sup>.



**Figura 1.** Struttura del crisotilo vista lungo l'asse della fibra. In giallo gli strati tetraedrici, in blu gli ottaedrici. I pallini neri rappresentano gli ossidrili<sup>3</sup>.

Il gruppo degli *anfibioli*, silicati di calcio e magnesio, comprende cinque specie a differente composizione chimica:

- La crocidolite o “amianto blu”,  $\text{Na}_2(\text{Fe}^{2+})_3(\text{Fe}^{3+})_2\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$ , varietà fibrosa del minerale riebeckite, estratto soprattutto in Sud Africa (Northwestern Cape Province), Australia occidentale, Bolivia, Rhodesia del nord;

- L'amosite o "amianto bruno",  $(\text{Mg,Fe})_7\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$ , varietà fibrosa dei minerali cummingtonite-grunerite, presente in India e Sud Africa;
- La tremolite,  $\text{Ca}_2\text{Mg}_5\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$ , che deve il nome alla Val Tremola in Svizzera e che è presente in Italia (Alpi Occidentali), Turchia, Cipro, Grecia, Pakistan, Corea del Sud;
- L'antofillite,  $(\text{Mg,Fe})_7\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$ , presente soprattutto in Finlandia e Stati Uniti;
- L'actinolite,  $\text{Ca}_2(\text{Mg,Fe})_5\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$ , presente in Italia (Alpi Occidentali), India, Sud Africa (Cape Province).

Il crisotilo e, tra gli *anfibioli*, l'amosite e la crocidolite sono tra i più commercializzati: per via delle loro innumerevoli proprietà si suppone siano stati incorporati in almeno 3000 differenti prodotti. Le forme di anfibioli non commercializzati, tremolite, antofillite ed actinolite sono invece largamente diffuse in natura e sono anche tra i principali contaminanti del crisotilo o di altri minerali come il talco<sup>4</sup>.

L'amianto è contenuto in diversi tipi di roccia ed in Italia il crisotilo è presente solo nelle rocce ultrafemiche serpentinite delle Alpi Occidentali, mentre la tremolite e l'actinolite possono formarsi in uno spettro più ampio di litotipi, appartenenti alla Zona Piemontese dei Calcesisti con meta-ofioliti<sup>2</sup>.

Le fibre dell'asbesto possono trovarsi da sole o in associazione con altri minerali, come riempimento di vene, dalle quali possono liberarsi per i naturali processi di alterazione chimico-fisica delle rocce che li contengono.

L'Italia è stata uno dei maggiori produttori e utilizzatori di amianto fino alla fine degli anni '80. Dal dopoguerra al bando del 1992 sono state prodotte 3.748.550 tonnellate di amianto grezzo, con la miniera di Balangero (TO) quale sito più importante di produzione di crisotilo. Il periodo tra il 1976 ed il 1980 è quello di picco nei livelli di produzione con più di 160.000 tonnellate/anno prodotte. Fino al 1987 la produzione non è mai scesa sotto le 100.000 tonnellate/anno per poi decrescere rapidamente. Le importazioni italiane di amianto grezzo sono state pure molto consistenti, mantenendosi superiori alle 50.000 tonnellate/anno fino al 1991. Complessivamente, dal dopoguerra al 1992, l'Italia ha importato 1.900.885 tonnellate di amianto<sup>5</sup>.

La produzione mondiale è in decrescita dal 1980.

### **1.3 Corpi di amianto**

I corpi di amianto sono oggetti di colore marrone dorato, perline o segmentati, a forma di manubrio, hanno un aspetto microscopico facilmente riconoscibile.

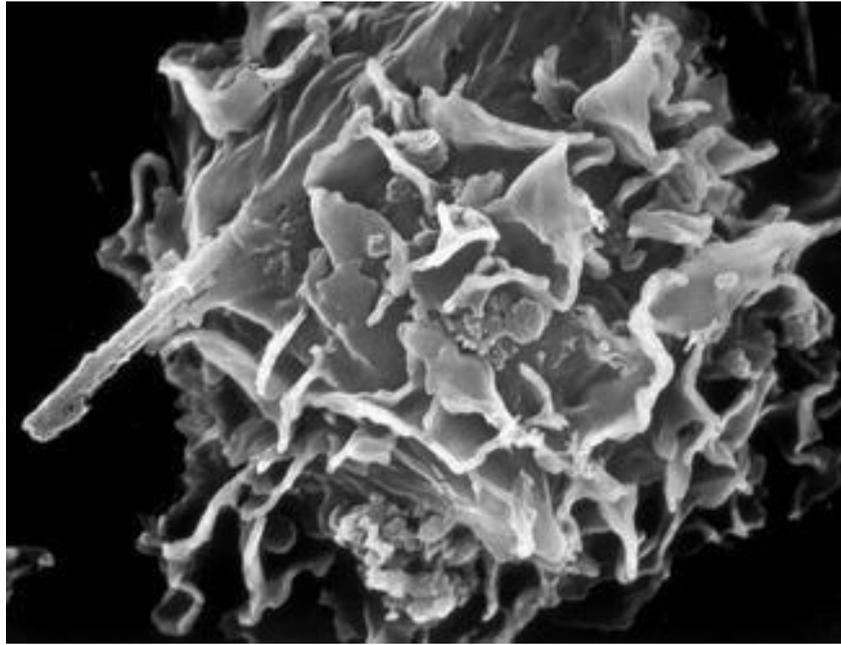
Furono descritti per la prima volta nel polmone da Marchand nel 1906<sup>6</sup>, li chiamò “cristalli pigmentati” e non riconobbe la loro relazione con le fibre di

amianto. Otto anni dopo, il patologo tedesco T. Fahr ha notato particolari cristalli nei polmoni di un lavoratore dell'amianto con fibrosi interstiziale polmonare<sup>7</sup>. W. E. Cooke ha descritto queste strutture come "corpi curiosi"<sup>8</sup>, e nel 1929 Stewart e Haddow avevano coniato il termine di corpi di asbestosi<sup>9</sup>. A questo punto Cooke<sup>10</sup> e Gloyne<sup>11</sup> riconobbero che questi corpi curiosi avevano fibre di amianto al loro interno. Il termine corpo di asbestosi è stato successivamente cambiato in corpo di amianto quando si è scoperto che erano presenti anche nei polmoni dei lavoratori che non presentavano asbestosi<sup>12,13</sup>.

Quando non era nota la natura precisa del nucleo fibroso è stato suggerito di utilizzare il termine "corpo ferruginoso"<sup>14,15</sup>. Toccò poi a Churg e Warnock<sup>16,17</sup> mostrare per mezzo della spettrometria a dispersione di energia e della diffrazione elettronica che i corpi ferruginosi isolati dai polmoni umani e aventi un nucleo fibroso sottile e traslucido erano praticamente veri corpi di amianto.

#### **1.4 Struttura e sviluppo**

I corpi di amianto si formano quando una fibra di amianto viene inalata e depositata nelle regioni distali del parenchima polmonare<sup>13</sup>, qui i macrofagi alveolari liberi fagocitano la fibra (figura 2).

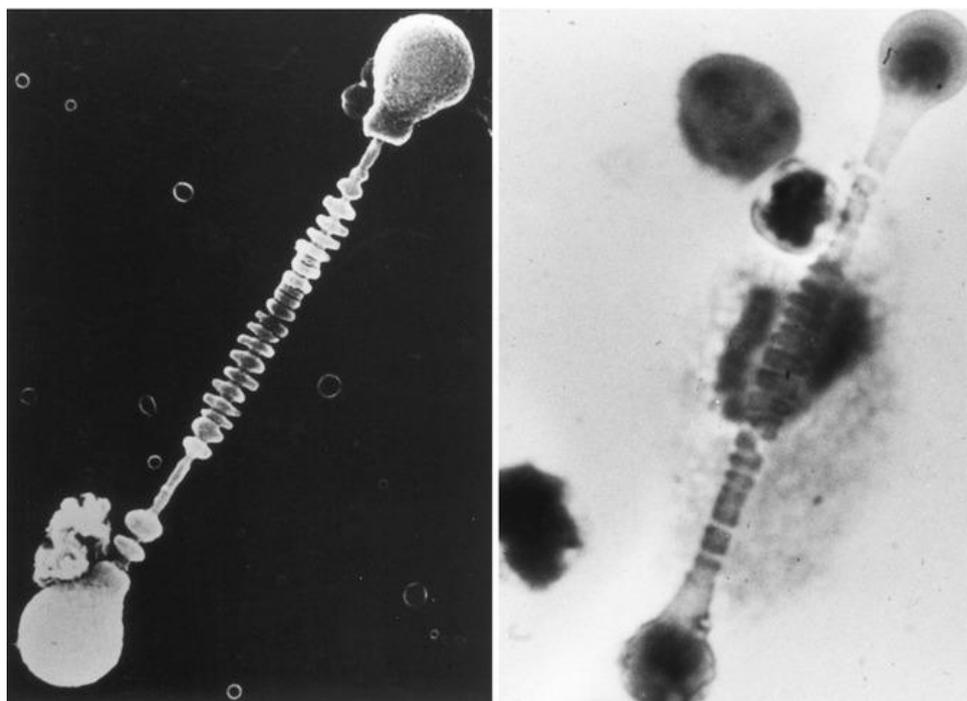


**Figura 2.** Micrografia elettronica a scansione di un *macrofago alveolare* libero umano che fagocita una *fibra* di amianto amosite<sup>18</sup>.

Successivamente, attraverso un processo poco conosciuto, la fibra viene ricoperta da uno strato di materiale ferro-proteina-mucopolisaccaride<sup>19,20,21</sup>.

È stato proposto che questo processo è un mezzo di difesa dell'ospite, poiché studi in vivo<sup>22</sup> e in vitro<sup>23</sup> hanno dimostrato che i corpi di amianto non sono fibrogeni e non sono citotossici rispetto alle fibre di amianto non rivestite. Inoltre, il rivestimento di ferro è legato in modo tale da non partecipare in modo efficiente alla generazione di specie reattive dell'ossigeno<sup>24,25</sup>. Ghio e altri hanno proposto che il processo di rivestimento è un marker per lo stress ossidativo indotto dalle particelle<sup>26</sup>.

La fibra di amianto rivestita, o corpo di amianto, ha un caratteristico aspetto marrone dorato, dovuto alla componente ferrosa del rivestimento. Queste strutture danno una forte reazione positiva con la colorazione blu di Prussia. Nelle sezioni istologiche i corpi di amianto hanno una forma a perline, segmentata o a lancetta, che è particolarmente apprezzata nelle preparazioni citologiche (figura 3) e nelle preparazioni di filtri Nucleopore di digestione del tessuto polmonare (figura 4).



**Figura 3.** Micrografia elettronica a scansione di un *corpo di amianto* a sinistra e corpo di amianto recuperato con *lavaggio broncoalveolare* e macrofago alveolare libero a destra (SEM, ingrandimento  $\times 2.000$ ; Papanicolaou, ingrandimento  $\times 600$ )<sup>27</sup>.



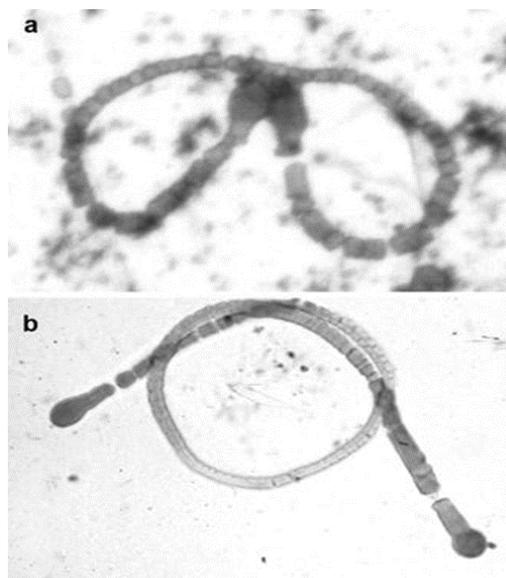
**Figura 4.** I corpi di amianto su un filtro Nucleopore mostrano la gamma di aspetti morfologici, comprese le forme di *manubri*, le strutture di *perline* e le forme di *lancetta*<sup>28</sup>.

Possono anche verificarsi forme ramificate, che risultano dalla deposizione di materiale di rivestimento su una fibra distesa (figura 5), si possono anche osservare corpi di amianto curvi o circolari (figura 6), questi di solito hanno fibre del nucleo molto sottili.

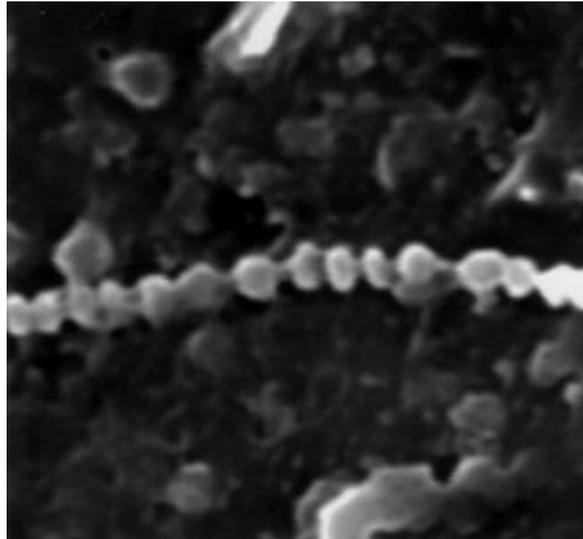
I corpi di amianto sono generalmente lunghi 20-50 $\mu\text{m}$ <sup>21</sup>, con una lunghezza di circa 35 $\mu\text{m}$ <sup>29</sup>, tuttavia possono superare i 200 $\mu\text{m}$  di lunghezza. Solitamente hanno un diametro di 2-5 $\mu\text{m}$ , in alcuni casi però possono avere anche un diametro estremamente piccolo di 0,5 $\mu\text{m}$ <sup>21</sup> (figura 7).



**Figura 5.** Micrografia elettronica a scansione di un corpo di amianto con divaricazione di un'estremità della fibra centrale. Ogni fibra allargata ha il proprio rivestimento di ferroproteine. Ingrandito  $\times 860^{28}$ .



**Figura 6.** Esempi di *corpi curvi* in amianto con sottili nuclei di anfibolo. (a) Coppia di "occhiali" in amianto. (b) Corpo di amianto isolato dal liquido di lavaggio broncoalveolare che sembra essere legato a nodo<sup>28</sup>.



**Figura 7.** Micrografia elettronica a scansione di un *corpo in amianto* con rivestimento molto sottile, del diametro di circa  $0,5\ \mu\text{m}$ . La fibra centrale ha un diametro inferiore a  $0,2\ \mu\text{m}$ . Un corpo del genere sarebbe difficile da visualizzare con la microscopia ottica. Ingrandito  $\times 14.000^{28}$ .

Solo una piccola percentuale di fibre di amianto che si trovano all'interno del polmone in un qualsiasi momento è rivestita e ci sono una serie di fattori che determinano se una singola fibra diventerà rivestita per formare un corpo di amianto. Questi fattori includono sia le caratteristiche della polvere inalata (ad esempio dimensione delle fibre) che le caratteristiche relative all'ospite.

Morgan e Holmes<sup>30</sup> hanno scoperto che nell'uomo le fibre di lunghezza inferiore a  $20\ \mu\text{m}$  raramente vengono rivestite, mentre tutte le fibre di lunghezza pari o superiore a  $80\ \mu\text{m}$  sono rivestite. Anche il diametro è un fattore

importante, poiché le fibre più spesse hanno maggiori probabilità di essere rivestite rispetto alle fibre più sottili<sup>31</sup>.

Dodson<sup>32</sup> ha suggerito che le irregolarità della superficie della fibra, come anche l'incisione, la frattura, lo sfilacciamento e la composizione multifibrillare possono influenzare il processo di rivestimento, rispetto a fibre non rivestite aventi caratteristiche di superficie molto più lisce.

Anche il tipo di fibra e la presenza di altre polveri nel polmone può influenzare il processo di rivestimento.

Per quanto riguarda i fattori dell'ospite, l'efficienza del rivestimento dipende dalla specie animale esposta alle fibre di amianto. Gli esseri umani, i criceti e i porcellini d'india formano corpi di amianto in modo efficiente, mentre gatti, conigli e topi lo fanno molto meno facilmente, e ratti e cani sono poveri formatori di amianto<sup>22</sup>.

Esiste anche una variabilità individuale nell'efficienza del rivestimento, in effetti è stata osservata una notevole variazione nell'efficienza del rivestimento in diverse aree del polmone da un singolo individuo<sup>31</sup>. La clearance delle fibre può essere ridotta negli individui con asbestosi, in modo tale da aumentare il numero delle fibre corte che viene trattenuto e la porzione di fibre rivestite è notevolmente ridotta.

Il *meccanismo di formazione dei corpi di amianto* è stato studiato in dettaglio da Suzuki e Churg<sup>33</sup>. Le fibre di amianto depositate nelle regioni distali del parenchima polmonare sono fagocitate da macrofagi alveolari. Quelle che sono circa 20µm o più di lunghezza non possono essere completamente ingerite da una singola cellula e, con meccanismi poco conosciuti, questa “fagocitosi frustrata” innesca quindi il processo di rivestimento. Entro 16 giorni dall’esposizione iniziale, le micelle di ferro compaiono nel citoplasma dei macrofagi e il loro accrescimento è continuo in questo materiale di matrice omogenea, si formano infine tipici corpi di amianto riconoscibili al microscopio ottico<sup>33</sup>.

La fibra di amianto è separata dal citoplasma del macrofago da una membrana lisosomiale limitante. Koerten ed altri hanno dimostrato che il processo di formazione del corpo di amianto può avvenire a livello extracellulare ed è analogo al processo di riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti<sup>34</sup>.

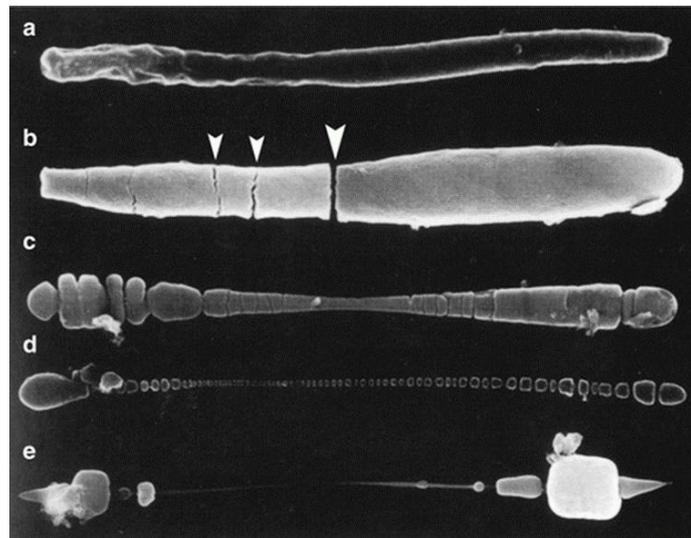
La fonte del ferro che ricopre la fibra è sconosciuta, ma è probabilmente derivata dall’emoglobina o dalla transferrina plasmatica. Studi più recenti che utilizzano l’imaging a raggi X molli di sincrotrone hanno dimostrato che anche il magnesio partecipa insieme al ferro nel processo di rivestimento<sup>35</sup>.

Studi in cui sono stati recuperati corpi di amianto sfruttando le proprietà magnetiche (al contrario delle dure tecniche che distruggono la componente

proteica del rivestimento) hanno dimostrato che l'albumina e la ferritina sono le principali proteine associate ai corpi di amianto<sup>36</sup>.

È stato ipotizzato che la peculiare segmentazione dei corpi di amianto sia dovuta alla frammentazione del rivestimento rigido, simile ad una guaina e che alla fine si verificano ulteriori “dispersioni” e dissoluzione del rivestimento<sup>37,38</sup>.

Questa sequenza di eventi è stata supportata da osservazioni al microscopio elettronico a scansione di corpi di amianto isolati da tessuti umani<sup>39</sup> (figura 8).



**Figura 8.** Un SEM composito che dimostra la sequenza di eventi proposta nella segmentazione del corpo dell'amianto. (a) Rivestimento liscio limitato dalla membrana. (b) Parziale (piccole punte di freccia) e completo (grandi punte di freccia), crepe in una fibra rivestita. (c) Erosione degli spigoli vivi delle regioni fessurate per formare un contorno liscio lungo un corpo di amianto. (d) Ampia bordatura lungo l'asse di un corpo di amianto. (e) Una forma bizzarra, con un'estesa regione centrale non rivestita di fibre ricoperte da estremità fortemente erose<sup>39</sup>.

Tuttavia, Koerten e altri hanno dimostrato che i tipici corpi segmentati di amianto possono essere formati in vitro in un sistema di coltura di macrofagi peritoneali di topo<sup>40</sup>, mettendo in dubbio il meccanismo di “invecchiamento” della segmentazione del corpo di amianto.

Non tutti i corpi di amianto hanno un rivestimento ferruginoso, ci sono anche corpi di fosfato di calcio e ossalato di calcio ma sono eventi rari, mentre le fibre di amianto ferruginose sono di gran lunga la forma più comune di corpo di amianto.

### **1.5 Presenza e distribuzione dei corpi di amianto**

Nel 1963 Thomson e altri<sup>41</sup> hanno riferito che corpi di amianto potrebbero essere trovati nei raschiati dei polmoni dell'autopsia. Da quel momento, un certo numero di studi hanno dimostrato che quando vengono impiegate tecniche di digestione-concentrazione per analizzare quantità sufficienti di tessuto polmonare, alcuni corpi di amianto possono essere recuperati dai polmoni di quasi tutti gli adulti nei paesi industrializzati.

Le correlazioni con i dati professionali indicano che gli uomini “colletti blu” tendono ad avere i conteggi più alti<sup>42</sup>, riflettendo una certa esposizione professionale all'amianto per molti di questi individui. I conteggi inferiori si trovano spesso nelle donne rispetto agli uomini, indicando che gli uomini hanno

maggiori probabilità di avere un lavoro con una certa esposizione all'amianto. Inoltre, i fumatori sembrano avere una maggiore conta dei corpi di amianto polmonare rispetto ai non fumatori<sup>43</sup>. La contaminazione ambientale da amianto non è confinata alle aree urbane, dal momento che gli abitanti delle zone rurali si trovano ad avere corpi di amianto nei polmoni quanto gli abitanti della città (95% contro 91%), sebbene i livelli tendano ad essere più alti nelle aree urbane.

Bhagavan e Koss hanno riportato un aumento della prevalenza di corpi di amianto negli Stati Uniti dal 41% negli anni '40 al 91% dei casi nel 1970-1972<sup>44</sup>. Arenas-Huertero e altri hanno riportato un aumento della concentrazione media di amianto nei campioni polmonari del Messico da 4,2/g nel 1975 a 42,5/g nel 1988.

Haque e altri<sup>45</sup> che hanno riportato l'isolamento dei corpi di amianto dai polmoni dei bambini indicano che l'esposizione all'amianto nella nostra società industrializzata iniziava entro il primo anno di vita.

Alcuni studi hanno esaminato la distribuzione topografica dei corpi di amianto all'interno del polmone. Sebastian e altri<sup>46</sup> hanno esaminato il tessuto polmonare dell'autopsia di sei pazienti senza esposizione nota all'amianto e non hanno trovato alcuna relazione coerente tra la concentrazione di corpi di

amianto nei lobi superiori rispetto a quelli inferiori o nel parenchima polmonare centrale rispetto a quello periferico.

Inoltre Rosen e altri hanno riportato i risultati da 14 casi in cui il tessuto polmonare è stato analizzato per il contenuto corporeo di amianto da più di un sito e ancora una volta non è stata trovata alcuna relazione coerente<sup>47</sup>.

La variabilità nella concentrazione corporea di amianto da un sito all'altro all'interno del polmone è stata drammaticamente dimostrata negli studi di Morgan e Holmes<sup>48,49</sup>, che hanno ampiamente campionato il tessuto polmonare da un isolante e da due minatori finlandesi di antofillite. I loro dati mostrano una variazione da cinque a dieci volte nella concentrazione corporea di amianto in blocchi di tessuto adiacenti.

Studi sperimentali su animali suggeriscono che questa variabilità da sito a sito nel contenuto di amianto può essere correlata alla lunghezza delle vie aeree e ai modelli di ramificazione<sup>50</sup>.

## **1.6 Quantificazione dei corpi**

Poiché alcuni corpi di amianto possono essere trovati nei polmoni di quasi tutti nei paesi industrializzati, sono necessari studi quantitativi per trarre conclusioni relative all'esposizione e ai vari processi patologici. Sono state ideate numerose tecniche per la quantificazione dei corpi di amianto nei tessuti, queste

includono la quantificazione in sezioni istologiche, digestione del tessuto polmonare, linfonodi e tessuti extrapolmonari.

### Sezioni istologiche

Le sezioni in paraffina sono abitualmente utilizzate dai patologi a fini diagnostici, quindi è naturale che le sezioni istologiche abbiano svolto un ruolo importante per quanto riguarda l'identificazione e la quantificazione dei corpi di amianto nei tessuti. Nei primi studi che hanno indagato la prevalenza dei corpi di amianto nella popolazione generale, sono state impiegate sezioni di paraffina spesse  $30\mu\text{m}^{51}$ .

Uno studio semi-quantitativo è stato riportato nel 1980 da Roggli<sup>52</sup> e altri, che hanno concluso che erano necessari 5.000 o più corpi di amianto per grammo di tessuto polmonare umido prima che i corpi potessero essere incontrati in dieci campi casuali ad alta potenza.

Roggli e Pratt<sup>29</sup> hanno riportato uno studio quantitativo relativo al numero di corpi di amianto osservati nelle sezioni di tessuto correlate con ferro per la conta dei corpi di amianto nella digestione del tessuto polmonare. Le osservazioni in questo studio sono state convalidate utilizzando una modalità matematica più rigorosa e risultati simili sono stati successivamente segnalati da altri.

### Digestione del tessuto polmonare

C'è una varietà di tecniche per l'estrazione di corpi di amianto dal tessuto polmonare per la successiva quantificazione o identificazione. La maggior parte di queste tecniche impiega la digestione chimica umida, sebbene siano state utilizzate anche tecniche di incenerimento al plasma a bassa temperatura<sup>53,54,55</sup>. Il residuo inorganico rimanente dopo la digestione viene quindi sospeso in etanolo e raccolto su un filtro in acetato o policarbonato con una dimensione dei pori appropriata (0,45µm o meno). Se l'intento dello studio è quello di quantificare solo corpi di amianto, il filtro può essere esaminato al microscopio ottico con un ingrandimento di 200-400x. Tuttavia, la microscopia elettronica a scansione (SEM) può essere utilizzata per contare i corpi di amianto, c'è un'eccellente correlazione tra le concentrazioni corporee di amianto determinate al microscopio ottico e quelle determinate al SEM. Una volta che il numero dei corpi di amianto sul filtro è stato determinato, la concentrazione dei corpi di amianto per grammo di polmone umido, grammo di polmone secco o cm<sup>3</sup> di tessuto polmonare varia da caso a caso a seconda del metodo utilizzato per riportare i risultati.

Gli studi sulla digestione devono essere eseguiti con attenzione, poiché esistono numerose potenziali fonti di errore. I corpi (e le fibre) di amianto possono andare persi durante il processo di estrazione a causa dell'adesione alle

superfici di vetro, e ciò può comportare una sostanziale sottostima della concentrazione effettiva nei tessuti<sup>55</sup>.

C'è abbastanza buon accordo nella determinazione delle concentrazioni corporee di amianto tissutale tra diversi laboratori che impiegano diverse tecniche analitiche, l'accordo è considerevolmente peggiore per la determinazione delle concentrazioni di fibre di amianto non rivestite<sup>56</sup>. Pertanto, è preferibile che i laboratori impegnati in tali determinazioni calcolino il proprio range normale di concentrazioni dei corpi di asbesto.

È importante riconoscere che il numero di corpi di amianto nei polmoni umani decomposti diminuisce nel tempo. Ciò è stato dimostrato in uno studio di Mollo e altri<sup>57</sup> in otto casi in cui i corpi di amianto sono stati misurati poco dopo la morte e di nuovo dopo 1-18 mesi di decomposizione. Questo è probabilmente dovuto alla perdita di proteine nella matrice del materiale ferruginoso, così che il rivestimento diventa fragile e si rompe durante il processo di recupero.

### Linfonodi

Gloyne nel 1933 descrisse i corpi di amianto nelle sezioni istologiche dei linfonodi e notò che, quando presenti, si trovano solitamente nelle aree del linfonodo contenenti pigmento<sup>58</sup>. Godwin e Jagatic hanno riportato corpi di amianto nei linfonodi regionali di 6 su 7 pazienti con mesotelioma maligno<sup>59</sup>.

Anche altri hanno menzionato la presenza di corpi di amianto nelle sezioni istologiche di linfonodi<sup>21</sup>. Roggli e Benning hanno riportato corpi di amianto in sezioni istologiche in 20 casi<sup>60</sup>.

C'erano modelli riproducibili di amianto in vari linfonodi ma molte variazioni nelle quantità di amianto trovate nei siti campionati.

Il ritrovamento di corpi di amianto in sezioni istologiche di linfonodi è indicativo di un pesante carico corporeo di amianto all'interno del linfonodo ed è associato a un carico corporeo di amianto polmonare considerevolmente elevato. Alcuni corpi di amianto possono essere trovati nei digeriti dei linfonodi in molti individui senza esposizione nota all'amianto, indicando il trasporto di alcune fibre lunghe ai linfonodi anche a bassi carichi di amianto nei tessuti. Infine, in alcuni casi, il contenuto corporeo di amianto dei linfonodi ilari supera quello del parenchima polmonare sia a basso che ad alto carico tissutale.

### Tessuti extrapolmonari

Gloyne aveva osservato che i corpi di amianto sono facilmente trasportati da un posto all'altro su un bisturi o su una lama di microtomo e possono essere facilmente trasferiti da un vaso di campioni a un altro. È pratica comune per i patologi posizionare porzioni di più organi in un unico contenitore di formalina. Inoltre, i corpi di amianto possono aderire alla vetreria utilizzata nella

procedura di digestione e quindi potenzialmente essere trasferiti da un caso all'altro<sup>55,61</sup>. Tutte queste fonti di contaminazione dovrebbero essere considerate negli studi sui corpi di amianto in tessuti extrapolmonari.

I corpi di amianto sono stati recuperati da reni, cuore, fegato, milza, ghiandole surrenali, pancreas, cervello, prostata e tiroide. Negli individui con pesanti carichi di amianto polmonare, è probabile che i corpi di amianto siano presenti in altri organi<sup>59</sup>. Inoltre l'incidenza e il numero di corpi di amianto negli organi extrapolmonari tendono ad aumentare man mano che il carico di amianto polmonare aumenta<sup>62</sup>. Tuttavia, questa osservazione è anche coerente con la contaminazione di formalina da parte di amianto polmonare.

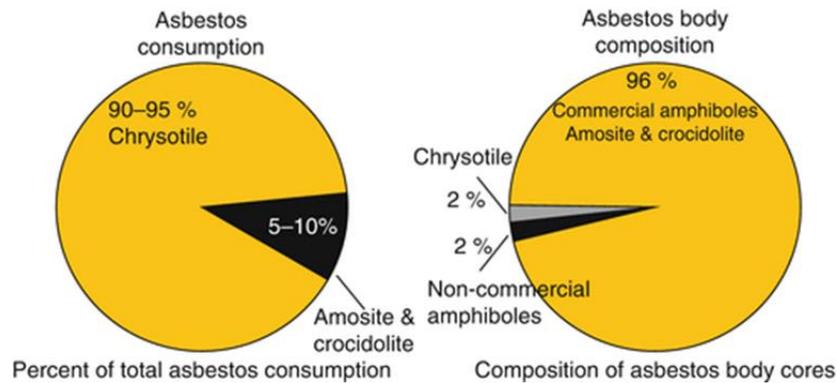
Sebbene i corpi di amianto in siti extrapolmonari possano essere artefatti, ci sono alcuni dati che indicano che può verificarsi il trasporto vascolare di polvere dai polmoni<sup>63,64</sup>, una volta che la fibra di amianto ottiene l'accesso al compartimento intravascolare.

### **1.7 Corpi di amianto e tipo di fibra**

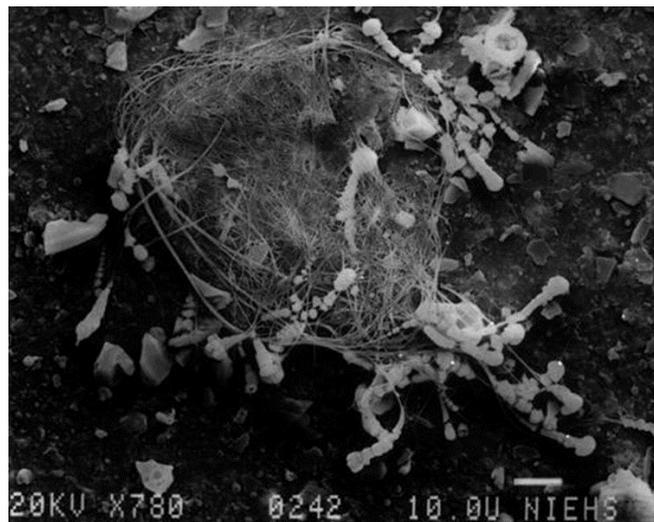
È stato scoperto che la stragrande maggioranza dei corpi di amianto isolati dai polmoni umani ha un nucleo di amianto anfibolo. Lavoratori dell'amianto e uomini della popolazione generale hanno generalmente gli anfiboli commerciali, amosite o crocidolite, che formano i nuclei dei corpi di amianto

all'interno dei loro polmoni. D'altra parte, le donne tra la popolazione generale è più probabile che abbiano uno degli anfibioli non commerciali, la tremolite o l'antofillite, come nucleo dei corpi di amianto che si trovano nei polmoni<sup>65</sup>. La predominanza dei nuclei del corpo di amianto anfibolo è alquanto curiosa, considerando che la maggior parte dell'amianto utilizzato commercialmente è il crisotilo<sup>66</sup>.

È particolarmente probabile che si rilevino in individui esposti a lunghe fibre di crisotilo, come i lavoratori tessili dell'amianto, i minatori o i mugnai di crisotilo, soprattutto in quest'ultimo gruppo di lavoratori, corpi di amianto isolati dal tessuto polmonare con nuclei di amianto crisotilo. I fasci di crisotilo più spessi hanno maggiori probabilità di essere rivestiti rispetto alle sottili fibrille di crisotilo. La rarità dei corpi di amianto crisotilo risulta apparentemente dalla pronta frammentazione del crisotilo in fibrille più corte e dal fatto che i corpi di amianto tendono a formarsi solo su fibre di lunghezza pari o superiore a 20µm. Di conseguenza, i corpi di amianto crisotilo sono generalmente un cattivo indicatore del carico polmonare di amianto. Tra gli individui esposti professionalmente all'amianto, la maggior parte delle fibre in questa gamma di dimensioni sono anfibioli commerciali. Un'ovvia eccezione a ciò è la percentuale relativamente piccola di lavoratori dell'amianto esposti esclusivamente al crisotilo.



**Figura 9.** Diagramma che mostra la proporzione dei vari tipi di fibre di amianto consumate commercialmente (a sinistra) rispetto alla composizione dei nuclei di amianto (a destra). Sebbene il crisotilo rappresenta la maggior parte (90-95%) dell'amianto consumato commercialmente, i corpi di amianto raramente (circa il 2%) hanno un nucleo di crisotilo<sup>67</sup>.



**Figura 10.** Cluster di fibre di amianto crisotilo su un filtro Nucleopore isolato dai polmoni di un lavoratore tessile di amianto con un mesotelioma pleurico. Le estremità delle fibre sembrano ruotare fuori dalla massa centrale come le diramazioni di una galassia a spirale e sono state rivestite per formare numerosi corpi di amianto crisotilo. Microscopia elettronica a scansione, ingrandita  $\times 850$ <sup>68</sup>.

## Capitolo secondo

### MESOTELIOMA

#### 2.1 Definizione e descrizione

Si chiama mesotelioma il tumore che nasce dalle cellule del mesotelio.

Il mesotelio è un tessuto che riveste come una sottile pellicola la superficie delle membrane sierose che “foderano” la parte interna di torace, addome e lo spazio intorno al cuore. Il mesotelio riveste anche la maggior parte degli organi interni e li protegge grazie alla produzione di un particolare liquido lubrificante che facilita i movimenti. Il mesotelio assume diversi nomi a seconda dell’area che riveste: si chiama pleura nel torace, peritoneo nell’addome e pericardio nello spazio attorno al cuore.

Il mesotelioma può avere origine in quattro zone del corpo: nel torace, nell’addome e, molto raramente, nella cavità attorno al cuore e nella membrana che riveste i testicoli.

Dal mesotelio possono nascere anche tumori benigni (come tumori adenomatoidi, mesotelioma cistico benigno) che in genere vengono rimossi chirurgicamente e non richiedono ulteriori trattamenti.

*La sua rarità, combinata con la forte associazione all’esposizione all’asbesto, fa di esso un marker epidemiologico di esposizione all’asbesto stesso<sup>69</sup>.*

Si suppone che fu Adami<sup>70</sup> a coniare il termine mesotelioma agli albori del XX secolo e Klemperer e Rabin<sup>71</sup> ne definirono i due principali isotipi patologici nel 1931. Il mesotelioma altresì denominato “mesotelioma maligno diffuso” o “mesotelioma maligno”, è stato riconosciuto come entità clinico-patologica a sé stante nella seconda metà del XX secolo<sup>72</sup>.

Il primo articolo medico riguardo i rischi conseguenti l'esposizione a polveri di asbesto è apparso nel 1924 sul British Medical Journal dove veniva riportato il caso di una signora addetta alla filatura dell'amianto in una fabbrica di Rochdale, deceduta a seguito di fibrosi polmonare e tubercolosi<sup>73,74</sup>. Nel 1930 Merewether confermò che l'inalazione professionale di polveri di asbesto, per lunghi periodi di tempo e a concentrazioni particolarmente elevate, costituiva “a definite occupational risk among asbestos workers as a class”<sup>75</sup>. Occorre attendere il 1960 per fugare ogni dubbio: Wagner e altri<sup>76,77</sup> descrivono 33 casi di mesotelioma pleurico diffuso, di cui 32 con una documentata esposizione alla crocidolite, definita “Cape Blue Asbestos”, nei minatori nella Northwestern Cape Province del Sud Africa.

Da allora numerosi studi sono stati intrapresi da alcune delle maggiori nazioni industrializzate per documentare l'elevato tasso di mesoteliomi in seguito al massiccio utilizzo dell'amianto in campo commerciale.

## 2.2 Aspetti clinico-patologici del mesotelioma

Inizialmente la malattia si presenta con ispessimenti confluenti che si distribuiscono lungo la superficie delle sierose, eventualmente associati a versamenti che possono contribuire in un secondo momento alla obliterazione delle cavità sierose stesse.

Il sito più comune di origine del mesotelioma maligno è la *pleura*; infatti esso si manifesta dapprima con numerosi noduli o placche che vanno a ricoprire la pleura parietale e che sovente si associano ad un versamento pleurico di carattere emorragico. Poi nel tempo si fondono tra loro, si portano lungo la pleura viscerale estendendosi alle fessure e ai setti interlobulari, fino ad incarcerare il polmone medesimo<sup>78</sup>.

Nella cavità toracica la crescita tende ad essere piuttosto uniforme, con possibilità di invasione di strutture mediastiniche, diaframma, parete toracica e nelle fasi più avanzate persino peritoneo e pleura controlaterale; mentre nel peritoneo è possibile riscontrare da grosse masse localizzate a diffusi conglomerati di noduli tumorali di dimensione variabile<sup>79</sup>.

Comunemente osservabili metastasi per via linfatica ai linfonodi ilari o mediastinici e la propensione del tumore ad estendersi nel tessuto sottocutaneo toracico o addominale seguendo le linee di incisione di una precedente agobiopsia, toracoscopia o laparoscopia esplorativa.

I sintomi clinici dipendono sostanzialmente dalla localizzazione primitiva: benché aspecifici, da considerare dolore toracico, dispnea, tosse, febbre e rilevante perdita di peso per le forme pleuriche (nel 5-10% dei casi osteoartropatia toracica e dita a bacchetta di tamburo); esordio subdolo con dolore addominale o epigastrico che peggiora dopo i pasti, nausea, vomito, costipazione, anoressia, distensione addominale o ascite refrattaria a paracentesi per le forme peritoneali. Per le ben più rare forme ad interessamento pericardico e della tunica vaginale, rispettivamente versamento pericardico, aritmie, tamponamento cardiaco fino all'insufficienza cardiaca oppure idrocele o massa scrotale palpabile.

### **2.3 Epidemiologia e sanità pubblica**

Il Mesotelioma Pleurico Maligno è oggetto di una specifica attività di rilevazione epidemiologica da parte del Registro Nazionale Mesotelioma (ReNaM), costituito ai sensi del Decreto Legislativo 257/1992, la norma che in Italia ha vietato l'uso dell'amianto. La grande attenzione al tema delle malattie amianto-correlate in Italia, a oltre venticinque anni dal bando di ogni forma di estrazione, lavorazione, importazione e commercio di amianto, deriva dal fatto che in questo periodo (e ancora per qualche anno nelle previsioni epidemiologiche) vi è la massima incidenza di mesoteliomi a causa del

frequente utilizzo di questo minerale dal secondo dopoguerra fino agli anni '80 e della lunga latenza della malattia.

AIOM ha valutato l'evidenza relativa al rischio di mesotelioma in documenti di consenso, che hanno anche considerato gli aspetti epidemiologici e di sanità pubblica<sup>76,77</sup> e che costituiscono la base per queste linee guida.

Il VI Rapporto del ReNaM, pubblicato nel Novembre 2018 e che presenta i dati aggiornati al 2015, ha rilevato mediamente 1594 casi incidenti di mesotelioma per anno negli anni dal 2013 al 2015<sup>80</sup>, di cui 1496 in sede pleurica.

I dati AIRTUM-AIOM forniscono per il 2018 1800 nuovi casi di mesotelioma maligno in Italia<sup>81</sup>, sulla base dei tassi di incidenza dei registri tumori italiani proiettati sulla popolazione italiana ISTAT. Il numero fornito dal ReNaM considera invece la sola rilevazione osservata, escludendo quindi le aree con dati mancanti. Un'indagine condotta sui casi 2000-2004 e su un campione di registri tumori e COR ha osservato una buona concordanza nella valutazione<sup>82</sup>. La frequenza è maggiore tra gli uomini (circa 2/3 dei casi), verosimilmente a causa della più frequente esposizione ad amianto. L'incidenza in Italia è maggiore nelle regioni settentrionali e in particolare nelle aree dove è stato maggiore l'uso di amianto.

I dati AIRTUM-AIOM stimano nel 9% la sopravvivenza a 5 anni, sulla base della coorte diagnosticata nel 2005-2009, con valori leggermente superiori a quelli presentati da analoghe valutazioni in altri paesi europei, che mostrano percentuali di sopravvivenza a 5 anni del 5 – 8%. La sopravvivenza mediana osservata in due studi basati sui dati ReNaM del 1990 - 2001 era pari a 9,8 mesi per il mesotelioma della pleura<sup>83</sup> e 5,6 mesi per il mesotelioma del peritoneo<sup>84</sup>, con rispettivamente il 5% e 8,1% di pazienti sopravvissuti a 5 anni. Il COR (Centro Operativo Regionale del ReNaM per il Piemonte ha recentemente presentato i dati di sopravvivenza aggiornati al 2016 per la coorte dei casi incidenti dal 1990. Si è osservato un progressivo aumento delle mediane di sopravvivenza, che sono passate da 8,6 mesi per i casi diagnosticati nel 1990-94 a 11,6 mesi per i casi del 2015-16. La sopravvivenza cumulativa per i casi diagnosticati nel 2010-14 è del 46% a 1 anno, 20% a 2 anni, del 12% a 3 e del 5% a 5 anni<sup>85</sup>. La mortalità dovuta al mesotelioma costituisce circa il 4% della mortalità globale per tumori in quasi tutte le età e in ambedue i sessi.

Diversi modelli concordano nel prevedere un picco di incidenza del mesotelioma maligno sul territorio nazionale nel periodo compreso tra la seconda e la terza decade degli anni duemila<sup>86,87</sup>, in relazione all'andamento nel tempo dell'esposizione ad amianto, il cui uso industriale è stato massimo negli anni 70 e fino alla metà degli anni 80 e poi è cessato dal 1994, con l'entrata in

vigore del Decreto Legislativo 257. Le previsioni sull'andamento dell'epidemia di mesotelioma da amianto in Italia sono in corso di revisione sulla base dei dati più recenti di incidenza.

Dal punto di vista eziopatogenetico, tutti i tipi di asbesto causano il mesotelioma maligno, sebbene gli anfiboli siano ritenuti più potenti rispetto al crisotilo<sup>88</sup>. Il rischio di sviluppare un mesotelioma pleurico maligno è incrementato sia tra i lavoratori esposti ad amianto sia nelle persone con esposizione non-occupazionale ad asbesto o altre fibre minerali asbestiformi. Secondo i dati del VI rapporto del ReNaM si stima che l'esposizione non lavorativa sia responsabile del 10.8% dei casi di mesotelioma pleurico in Italia. Il rischio di mesotelioma aumenta con l'incremento della esposizione cumulativa a fibre di amianto<sup>89</sup>.

Altri minerali fibrosi presenti in natura (come l'erionite e la fluoro-edenite) condividono l'architettura silicea e la morfologia fibrosa dell'asbesto e determinano aumenti di rischio di mesotelioma analoghi a quanto osservato per le fibre di amianto. Non risultano usi industriali di tali sostanze ma l'esposizione ambientale ad essi è stata associata a numerosi casi di mesotelioma maligno nell'uomo<sup>90</sup>.

Studi su animali suggeriscono un'associazione tra l'esposizione a fibre di ceramica o lana vetro e lo sviluppo di mesotelioma maligno, mentre studi

epidemiologici nel genere umano non confermano tale associazione<sup>91,92</sup>. Studi sperimentali che hanno valutato un possibile ruolo dei nanotubi in carbonio, stante la loro somiglianza con le fibre di asbesto, hanno condotto a risultati contrastanti<sup>93,94</sup>. La monografia IARC ha preso in considerazione diverse tipologie di nanotubi in carbonio e una di queste (MWCNT-7) è stata classificata come “possibile cancerogeno”.

L'importanza di altri fattori di rischio è molto limitata. Alcuni studi su coorti di soggetti esposti a thorotrast quando tale mezzo di contrasto era in uso e su pazienti esposti per ragioni terapeutiche ad alte dosi di radiazioni ionizzanti dimostrano un aumentato rischio di mesotelioma maligno, sia pleurico che peritoneale, dipendente dalla regione corporea esposta. Tale tipo di esposizione peraltro spiega soltanto una minima quota (1.7%-4.7%) dei casi diagnosticati in Italia.

La proporzione di casi di mesotelioma pleurico maligno familiare in Italia si attesta tra 1.3 e 2.5% del totale dei casi. L'esposizione ad amianto è risultata comunque sempre presente. Nella popolazione che ha vissuto o lavorato a Wittenoom (Miniera Australiana di Crocidolite, chiusa nel 1966), i casi di mesotelioma pleurico maligno tra parenti raggiungono il 7% con un rischio raddoppiato per consanguinei dei pazienti rispetto alla popolazione generale,

anche dopo correzione per l'esposizione all'asbesto<sup>95</sup>. Si tratta della proporzione più elevata riferita in letteratura.

Il ruolo delle mutazioni germinali di BAP-1 è limitato ai rari casi che fanno parte della "BAP-1 cancer predisposition syndrome" (aumentata frequenza in famiglie di casi di melanoma uveale, mesotelioma della pleura, melanoma cutaneo, carcinoma renale ma anche in altri tipi di neoplasia), mentre tali alterazioni sono molto rare (1 su 300 casi di MM) nei casi sporadici. Recentemente è stato mostrato che i pazienti con familiarità, ossia portatori di mutazioni germinali in BAP1 o in geni predisponenti il cancro, hanno una sopravvivenza migliore rispetto ai pazienti con mesotelioma sporadico<sup>96</sup>.

Sulla base delle prime osservazioni epidemiologiche si è affermato che l'incidenza di mesotelioma maligno aumenta proporzionalmente all'esposizione stessa moltiplicata per una potenza pari a 3 o 4 del tempo dall'esposizione stessa (comunemente denominata latenza). Dai dati del VI Rapporto ReNaM per i 14.647 casi per i quali è disponibile l'anno di inizio esposizione la latenza mediana è di 48 anni con una deviazione standard di 11,4 anni e una distribuzione gaussiana. Studi recenti hanno rivalutato la relazione tra incidenza di mesotelioma e tempo dalla prima esposizione ad amianto: una recente analisi di più studi dimostra come, dopo circa 45 anni dalla prima esposizione all'asbesto, il trend di incremento dell'incidenza e della mortalità

del mesotelioma pleurico tenda a rallentare. È anche possibile che vi sia una stabilizzazione o una riduzione del rischio al cessare dell'esposizione<sup>97</sup>.

#### **2.4 Diagnosi precoce e sorveglianza**

Esistono indicazioni normative per la sorveglianza per lavoratori esposti all'asbesto o coloro che, per motivi occupazionali, possano esserlo (Dlgs 257/2006; Dlgs 81/2008). L'implementazione di tali indicazioni e la formulazione in programmi operativi non è però uniforme tra le diverse regioni, anche se di recente sono state emanate linee guida dal Ministero della Salute, approvate in Conferenza Stato Regioni nel 2018. Eventuali proposte di interventi di diagnosi precoce debbono essere valutate criticamente, non solo perché ad oggi non esistono indagini con sensibilità e specificità adeguate ma soprattutto perché non esistono ancora interventi terapeutici sufficientemente efficaci.

I programmi di sorveglianza diretti ai lavoratori esposti all'asbesto devono: 1) informare i soggetti circa il rischio dovuto all'esposizione presente o passata all'asbesto; 2) informare i familiari dei soggetti esposti circa i possibili rischi per la salute dovuti all'esposizione passiva; 3) ricostruire in modo completo l'anamnesi lavorativa, in particolar modo circa l'esposizione ad asbesto; 4) fornire informazioni circa la diagnosi, le terapie e le prospettive medico-legali esistenti; 5) favorire il riconoscimento e l'indennizzo dei casi dovuti ad

esposizione all'amianto; 6) fornire un counselling circa l'abbandono dell'abitudine tabagica e altri stili di vita pericolosi per la salute.

Ai sensi di legge, la diagnosi di mesotelioma deve essere sempre segnalata ai registri mesoteliomi dal medico che la effettua. I mesoteliomi maligni devono essere segnalati alle ASL (Servizi di Prevenzione o Servizi di Prevenzione sul luogo di lavoro) per gli obiettivi di prevenzione e di riconoscimento delle malattie professionali. I pazienti ed i loro familiari devono essere informati sul loro diritto di chiedere il riconoscimento e l'indennizzo all'INAIL, siano essi ad origine professionale o dovuti ad esposizione fuori dal luogo di lavoro. Anche per questi ultimi, infatti, è previsto un indennizzo.

## **2.5 Anatomia patologica**

La diagnosi di mesotelioma pleurico può essere talora molto complicata e richiede generalmente un approccio multidisciplinare mediante correlazione degli aspetti cito-istologici (ed eventualmente immunomolecolari) con i dati clinici e radiologici<sup>98,99</sup>. La diagnosi definitiva richiede comunemente la conferma biptica, seppure in casi selezionati anche campioni citologici o citoinclusi (cell-block) di versamenti pleurici possono essere utilizzati a scopo diagnostico osservando i criteri recentemente approvati da un panel di esperti internazionali dell'International Mesothelioma Interest Group (IMIG)<sup>100,101</sup>.

Nella maggior parte dei casi, tuttavia, la diagnosi di mesotelioma può essere sospettata o identificata direttamente sui reperti morfologici in ematossilina-eosina, particolarmente nel sottotipo epitelioide (o epiteliale). Nonostante ciò, diversi gruppi di patologi raccomandano la conferma della diagnosi morfologica con appropriate indagini immunohistochimiche, che devono però sempre tenere conto del contesto della diagnosi differenziale in ogni singolo caso (es. adenocarcinoma polmonare vs mesotelioma, metastasi pleurica di carcinoma extra-toracico vs mesotelioma, mesotelioma vs sarcoma ed iperplasia mesoteliale vs mesotelioma).

La classificazione patologica da utilizzare è quella più recente proposta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nel 2015, periodicamente aggiornata da un pannello di esperti internazionali.

In accordo con questa classificazione, i mesoteliomi possono essere suddivisi in 3 principali sottotipi: epitelioide, sarcomatoide e bifasico. L'incidenza dei vari sottotipi di mesotelioma può variare a seconda delle casistiche ma si può affermare che il 70-85% circa dei mesoteliomi è di tipo epitelioide, il 10-25% bifasico e circa il 10% sarcomatoide, mentre il mesotelioma desmoplastico è la forma più rara (<2%). La frequenza dell'istotipo di mesotelioma può dipendere dalla modalità e dall'estensione del prelievo<sup>102</sup>.

La *variante epitelioide* è quella costituita da cellule globose/poligonali con ampio citoplasma eosinofilo e nuclei uniformi con nucleolo prominente, disposte in aggregati solidi che tendono a formare strutture tridimensionali. È anche la variante di mesotelioma con il maggior numero di pattern cito-architetturali spesso commisti tra loro (papillare, tubulo-papillare, micropapillare, trabecolare, solido, deciuoide, adenomatoide/microcistico, a cellule chiare, transizionali, ad anello con castone o a piccole cellule). La presenza di cellule anaplastiche e/o giganti multinucleate è tipica della forma pleomorfa, mentre la variante linfo-istiocitoide mostra un denso infiltrato infiammatorio misto (comprendente linfociti, plasmacellule, istiociti e granulociti) che può oscurare le cellule mesoteliali mimando un linfoma o un carcinoma simil-linfoepiteliale. Lo stroma del mesotelioma epitelioide è spesso fibroso, denso e ipocellulare con aspetti “a colata di cera”, ma possono osservarsi anche aspetti ipercellulari con numerosi elementi fibro/miofibroblastici o aree mixoidi Alcian-Blue positive.

La *variante sarcomatoide* si caratterizza per la presenza di una proliferazione a cellule fusate arrangiate in corti fasci con pattern storiforme o disordinato che infiltra i tessuti molli della pleura parietale o il parenchima polmonare. Le cellule possono essere sottili e lunghe o più rigonfie e corte, mentre le atipie nucleari e le mitosi possono essere da assenti a prominenti. La presenza di

focolai di necrosi tumorale è di rilevanza diagnostica. Si possono osservare anche componenti eterologhe di osteosarcoma, rabdomiosarcoma o condrosarcoma accanto alla componente fusata più convenzionale. Il pleomorfismo può essere molto marcato.

La *variante desmoplastica* è solitamente la forma più difficile da diagnosticare. Si tratta di una proliferazione blanda di elementi fusati disposti in modo disordinato in uno stroma collagene ialinizzato. L'invasione dei tessuti molli o del parenchima polmonare è talora difficile da dimostrare e le indagini immunohistochimiche per il mesotelio sono spesso negative. La presenza di nodulazioni ipercellulari accanto ad aree interamente fibrotiche, necrosi blanda tumorale e la ricerca di focoli, aree epitelioidee o sarcomatoidee più convenzionali, con inclusione completa del materiale prelevato e sezioni seriate più profonde di tutti i prelievi in paraffina disponibili, sono tutti aspetti fondamentali per supportare la diagnosi. La forma desmoplastica ha una prognosi simile a quella della variante sarcomatoide.

La *variante bifasica* prevede la combinazione del pattern epitelioide e sarcomatoide con la presenza di almeno il 10% di una delle due componenti. È raccomandabile riportare la percentuale di componente sarcomatoide globalmente rappresentata nell'intero mesotelioma.

Il *mesotelioma localizzato* è una rara presentazione di mesotelioma maligno come massa solitaria localizzata con base pleurica. Può manifestare tutte le varianti istologiche ed entra in diagnosi differenziale con il tumore fibroso solitario e il sarcoma sinoviale.

Il *mesotelioma papillare* ben differenziato è una rara forma di mesotelioma di basso grado che spesso coinvolge il peritoneo e si caratterizza per la crescita esofitica papillare con un rivestimento monostratificato di cellule mesoteliali con blande atipie e stroma mixoide, in assenza di chiari aspetti di invasione. Recentemente, sono stati riportati casi di mesotelioma papillare ben differenziato con iniziale infiltrazione dei tessuti molli.

Sono stati identificati criteri clinico-patologici per la diagnosi di *mesotelioma maligno in situ*: proliferazione mesoteliale atipica in monostrato con perdita di BAP1 e senza evidenza macroscopica o strumentale di invasione diretta pleurica per almeno un anno dalla diagnosi.

Il *tumore adenomatoide* è una rara forma benigna di proliferazione mesoteliale caratterizzata da una crescita nodulare solitaria con spazi simil-ghiandolari, irregolari con cellule mesoteliali piatte o cuboidali prive di atipie. La diagnosi differenziale è con una forma simil-adenomatoide di mesotelioma epitelioido (in questo caso il pattern di crescita è diffuso) e con l'emangioendoteloma

epitelioide (quest'ultimo è negativo per marcatori mesoteliali e positivo per marcatori vascolari).

In caso di resezione chirurgica, il gruppo di patologi internazionali esperti di mesotelioma dell'International Collaboration on Cancer Reporting (ICCR) ha identificato 8 punti richiesti nella refertazione del mesotelioma, secondo quanto segue: procedura operativa eseguita per ottenere i prelievi, tipo di campione, sede macroscopica del prelievo, tipo istologico, stato dei margini, estensione dell'invasione tumorale, stato linfonodale, stadio pTNM. Sono stati inoltre identificati 7 punti raccomandati nel report patologico, tra cui: storia clinica, terapia neoadiuvante eseguita, dimensioni dei noduli tumorali maggiori e spessore massimo dell'invasione neoplastica, numero di mitosi (numero di mitosi per mm quadrato di tessuto neoplastico), risposta alla terapia neoadiuvante, patologie neoplastiche o non neoplastiche associate, studi ancillari eseguiti (immunoistochimica, indagini molecolari, altro)<sup>103</sup>.

## **2.6 Criteri di definizione dei casi di interesse del ReNaM**

Sono inclusi e quindi registrati nel Registro Nazionale dei Mesoteliomi tutti i casi di mesotelioma maligno, anche sospetti. La classificazione di caso prevede 5 classi e varie sottoclassi di livello decrescente di certezza diagnostica, in relazione alla modalità e certezza diagnostica raggiunta:

1. Mesotelioma maligno CERTO (con 3 sottoclassi)

2. Mesotelioma maligno **PROBABILE** (con 2 sottoclassi)
3. Mesotelioma maligno **POSSIBILE** (con 2 sottoclassi)
4. Mesotelioma maligno **DA DEFINIRE** (con 3 sottoclassi)
5. **NON** mesotelioma maligno

Esami diagnostici necessari per l'inclusione dei casi nelle varie classi e sottoclassi.

1. Mesotelioma maligno *CERTO*

Sottoclasse 1. Il caso deve essere caratterizzato da tutte le seguenti condizioni:

- Indagine microscopica su materiale (istologico o citologico con centrifugazione del sedimento) incluso in paraffina, con quadro morfologico caratteristico. Sono inclusi anche i prelievi di tessuto effettuati durante un esame autoptico;
- Immunoistochimica, con quadro immunofenotipico caratteristico;
- Diagnostica per immagini (conferma di lesione neoplastica primitiva in sede pleurica o peritoneale ed esclusione patologia alternativa) oppure diagnosi di dimissione di mesotelioma oppure analogo valutazione effettuata da un clinico.

Sottoclasse 2. Il caso deve essere caratterizzato da tutte le seguenti condizioni:

- Indagine microscopica su materiale istologico incluso in paraffina, con quadro morfologico caratteristico. Sono inclusi anche i prelievi di tessuto effettuati durante un esame autoptico;
- Immunoistochimica non effettuata o quadro non definitivo;
- Diagnostica per immagini (conferma di lesione neoplastica primitiva in sede pleurica o peritoneale ed esclusione di patologia alternativa) oppure diagnosi di dimissione di mesotelioma oppure analogo valutazione effettuata da un clinico.

Sottoclasse 3. Il caso deve essere caratterizzato da tutte le seguenti condizioni:

- Indagine microscopica su materiale istologico incluso in paraffina, con quadro morfologico caratteristico. Sono inclusi anche i prelievi di tessuto effettuati durante un esame autoptico;
- Immunoistochimica non effettuata o quadro non definitivo;
- Assenza di dati clinici e radiologici disponibili al COR per valutare la fondatezza della diagnosi clinica.

## 2. Mesotelioma maligno *PROBABILE*:

Sottoclasse 1. Il caso deve essere caratterizzato da tutte le seguenti condizioni:

- Esame istologico o citologico con inclusione in paraffina effettuato, anche durante un esame autoptico, ma che non ha dato

un esito indicativo di mesotelioma in modo chiaro e attendibile (caso dubbio);

- Diagnostica per immagini (conferma di lesione neoplastica primitiva in sede pleurica o peritoneale ed esclusione di patologia alternativa) oppure diagnosi di dimissione di mesotelioma oppure analoga valutazione effettuata da un clinico.

Sottoclasse 2. Il caso deve essere caratterizzato da tutte le seguenti condizioni:

- Esame citologico non incluso in paraffina, effettuato anche durante un esame autoptico, con quadro caratteristico e referto espresso in termini chiaramente indicativi di mesotelioma (e non di semplice neoplasia maligna);
- Diagnostica per immagini (conferma di lesione neoplastica primitiva in sede pleurica o peritoneale ed esclusione di patologia alternativa) oppure diagnosi di dimissione di mesotelioma oppure analoga valutazione effettuata da un clinico.

### 3. Mesotelioma maligno *POSSIBILE*

Sottoclasse 1. Il caso deve essere caratterizzato da:

- Dati clinici e radiologici indicativi;

- Diagnosi di dimissione di mesotelioma (il solo codice di dimissione non è sufficiente, ma occorre valutare la cartella clinica per verificare che non sia una neoplasia da altra sede con interessamento della pleura). I casi la cui cartella non è stata esaminata non rientrano in questa categoria;
- Assenza di esame istologico;
- Assenza di esame citologico.

Sottoclasse 2. Il caso deve essere caratterizzato da:

- DCO con presenza sul certificato di decesso ISTAT della dizione “mesotelioma”. I casi il cui certificato di morte non è stato esaminato non rientrano in questa categoria;
- Assenza di esame istologico;
- Assenza di esame citologico;
- Assenza di dati clinici e radiologici.

#### 4. Casi da *DEFINIRE*

Questa categoria deve essere utilizzata solo come un “contenitore provvisorio” in cui classificare i casi in corso di accertamento. I casi occorsi in residenti in altra Regione dovranno esser segnalati al COR di competenza che penserà poi a segnalarli all’ISPESL.

Sottoclasse 1. Il caso deve essere caratterizzato da:

- Esame istologico o citologico incluso in paraffina, in assenza di quadro morfologico caratteristico (caso dubbio), in assenza di diagnostica per immagini positiva per mesotelioma oppure diagnosi di dimissione di mesotelioma oppure analogo valutazione effettuata da un clinico.

oppure

- Immunoistochimica non effettuata, con quadro immunofenotipico dubbio, in assenza di diagnostica per immagini positiva per mesotelioma oppure diagnosi di dimissione di mesotelioma oppure analogo valutazione effettuata da un clinico.

Sottoclasse 2. Il caso deve essere caratterizzato da:

- Sola diagnosi SDO, senza lettura della cartella clinica e senza ulteriori dati diagnostici.

Sottoclasse 3. Il caso deve essere caratterizzato da:

- Solo DCO definito sulla base del codice ICD IX di decesso, senza lettura del certificato di morte.

5. NON mesotelioma maligno

In questo livello vengono posti i casi che dal livello 4.0 non riescono a raggiungere un livello superiore (1.0; 2.0; 3.0) dopo averne accertato il decesso ed aver atteso quanto meno due mesi dal decesso (inteso come limite temporale all'effettuazione di esami autoptici che potrebbero meglio definire la diagnosi).

### **Priorità nella definizione dell'esposizione**

Per i casi posti ai livelli 1, 2, 3 si procederà:

- alla definizione della loro eventuale esposizione ad amianto. Ove, in particolari situazioni, si presentasse provvisoriamente l'esigenza di dover operare una scelta per l'attivazione della fase di ricostruzione della storia anamnestica, si potrà applicare il "criterio di priorità": i casi certi posti al livello 1 andranno considerati ad "alta priorità" e per loro dovrà essere sempre attivata la procedura per la definizione dell'esposizione; per i casi di livello diagnostico 2 (probabili) e 3 (possibili), da considerare nell'ordine a priorità inferiore, si potrà procedere all'intervista, alla definizione ed alla classificazione per livello di esposizione ad amianto per una quota rappresentativa dei casi rilevati, riservandosi di procedere quanto prima anche per i casi rimanenti;
- alla loro segnalazione all'ISPESIL (leggi ReNaM);
- alla loro inclusione nella casistica da utilizzare per il calcolo dei tassi di incidenza da parte dell'ISPESIL.

## **Criteri di definizione della data di incidenza dei casi di interesse del ReNaM**

La data di prima diagnosi o data di incidenza è la data dell'esame che fa porre il caso nel suo specifico livello diagnostico. Tale criterio è quello seguito da molti Registri tumori di popolazione e raccomandato dallo European Network of Cancer Registries.

## Capitolo terzo

### ALTRE PATOLOGIE ASBESTO-CORRELATE

Oltre al mesotelioma, l'asbesto può determinare le seguenti lesioni<sup>104</sup>:

- placche pleuriche fibrose, localizzate o diffuse;
- versamenti pleurici;
- fibrosi interstiziale parenchimale ovvero asbestosi;
- carcinoma broncogeno;
- carcinoma del laringe e probabilmente forme extrapolmonari.

#### 3.1 Placche pleuriche

Le placche pleuriche rappresentano la manifestazione più comune dell'esposizione all'amianto: possono verificarsi anche in seguito ad una esposizione ambientale o a bassi livelli di asbesto e comunque mai prima di due o tre decenni dall'iniziale esposizione.

Nella maggior parte dei casi sono aree circoscritte di tessuto collagene denso, spesso calcifico, presenti bilateralmente sulla superficie anteriore e posterolaterale della pleura parietale o sulle cupole diaframmatiche. Sono state descritte anche placche peritoneali, ovvero sulle superfici epatiche o spleniche, alcune delle quali secondarie ad una precedente esposizione<sup>105</sup>.

La presenza di placche pleuriche è asintomatica, evidenziabile radiologicamente come aree di maggiore densità nelle superfici sopra menzionate. Il riscontro radiologico di una placca può giustificare l'avvio di un programma di follow-up, considerando che nelle regioni dove esse non sono endemiche, nell'80-90% dei casi sono secondarie ad una esposizione professionale<sup>106</sup>.

Non vi sono evidenze in letteratura che le placche siano dei precursori di mesoteliomi e controversa è la relazione tra placche e carcinoma del polmone: a tal proposito il Consensus Report di Helsinki ha definitivamente concluso che la presenza di placche non è di per sé sufficiente per correlare il carcinoma ad una esposizione pregressa all'amianto.

L'ispessimento pleurico diffuso è un termine che sta ad indicare un insieme di reazioni interessanti la pleura viscerale: può associarsi ad un "rounded" atelettasia o a disfunzioni polmonari di tipo restrittivo. Meno frequenti delle placche pleuriche localizzate, necessitano di livelli di esposizione considerevoli.

### **3.2 Asbestosi**

L'asbestosi è una fibrosi polmonare interstiziale diffusa difficilmente distinguibile dalle altre pneumoconiosi senza una storia positiva per significativa esposizione a polveri di asbesto o presenza di corpi e fibre

dell'asbesto nel polmone in quantità maggiore rispetto quelli della popolazione generale.

Di solito conseguente all'inalazione di elevate quantità di polveri d'asbesto, viene diagnosticata sulla base della storia anamnestica e clinica, sulla base di un appropriato periodo di latenza, sulla base di indagini strumentali (test di funzionalità respiratoria, test di diffusione per il monossido di carbonio), radiologiche o istologiche e sull'esclusione di cause alternative<sup>107</sup>.

Di fronte a sintomi quali dispnea, tosse secca, crepitii inspiratori bibasali, dita a bacchetta di tamburo, deficit polmonari di tipo restrittivo o restrittivo-ostruttivo<sup>108</sup>, la radiografia del torace rimane ancora l'esame preliminare. Sin dal 1950 la *International Labor Office* (ILO) ha sviluppato un sistema di classificazione internazionale delle pneumoconiosi per graduare la severità delle alterazioni polmonari e pleuriche sulla base di acquisizioni di immagini RX in postero-anteriore<sup>109</sup>.

L'asbestosi si presenta inizialmente con piccole, irregolari, bilaterali opacità parenchimali ai lobi polmonari inferiori che nel tempo aumentano di densità e si portano ai lobi superiori. Per via del numero di falsi positivi e falsi negativi della radiografia toracica, la tomografia computerizzata (CT), o meglio la HRCT, può confermare il quadro Rx o rilevare anomalie non altrimenti visibili perché molto più sensibile e specifica<sup>110</sup>: dapprima la fibrosi è peri-

bronchiale, per andare a coinvolgere poi i tessuti che circondano dotti, sacchi alveolari ed alveoli adiacenti; si creano spazi aerei dilatati circondati da tessuto fibroso con regioni che assumono l'aspetto di favo d'api.

Criteri istologici di diagnosi comprendono il riscontro di almeno due corpi in un'area di tessuto di un cm<sup>2</sup> (o in alternativa fibre nude in quantità tale da rientrare nel range stabilito dal proprio laboratorio per l'asbestosi) oltre che l'identificazione di fibrosi interstiziale diffusa secondo un modello di severità ed estensione proposto dal *College of American Pathologists* (CAP) e dal *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH).

### **3.3 Carcinoma del polmone**

Tutti i principali istotipi di tumore del polmone possono essere collegati all'asbesto (sebbene da alcuni studi emerga una maggiore prevalenza degli adenocarcinomi<sup>111</sup>) e l'esposizione a tutti i tipi di fibre d'asbesto può portare ad un carcinoma polmonare<sup>112</sup>.

Nessun segno o sintomo clinico lo differisce da neoplasie polmonari insorte per altra causa, se non si dimostra con ragionevole certezza che l'asbesto ha contribuito allo sviluppo della malattia: a tal proposito il principale criterio da considerare dovrebbe essere l'esposizione cumulativa; il Consensus Report di Helsinki ha stimato che l'esposizione a 25 fibre/mL-anno raddoppia il rischio

di neoplasia, ma un'analisi più recente ha stabilito pure che l'esposizione a 25-1000 fibre/mL-anno non ha alcun effetto se si tratta di fibre di tipo crisotilo<sup>113</sup>.

I ricercatori concordano da anni sul fatto che esiste una relazione tra esposizione e sviluppo tumorale e che l'asbestosi costituisce un rischio ancora maggiore, ma persistono ancora dubbi sul poterla considerare un requisito necessario per l'attribuzione di una neoplasia polmonare come asbesto-correlata<sup>114</sup>. Al contrario il riscontro di placche pleuriche nello stesso paziente attesta solamente una esposizione a bassi livelli di asbesto; dunque per potere definire la neoplasia secondaria all'asbesto è necessario quantificare fibre o corpi nel tessuto polmonare e verificare che ci sia stata una esposizione lavorativa. A differenza del mesotelioma, il fumo può contribuire allo sviluppo tumorale in modo sinergico o moltiplicativo; diverse ipotesi sono state fatte ma non è stato delineato un preciso meccanismo.

È possibile che il tabacco possa facilitare la penetrazione delle fibre nei bronchi e che possa interferire con la clearance delle stesse; che le sostanze cancerogene nel fumo di sigaretta possano essere assorbite dalle fibre d'asbesto e successivamente rilasciate nelle cellule ad elevata concentrazione; e che gli acidi grassi presenti nel tabacco possano trasferire ferro sulle membrane cellulari incrementando la loro sensibilità alle specie reattive dell'ossigeno<sup>115</sup>. In particolare, riguardo la capacità delle fibre di penetrare nella mucosa

bronchiale, Churg e Stevens hanno dimostrato come questo sia possibile e molto più probabile per il crisotilo piuttosto che per altri tipi di fibre, analizzando parenchima polmonare e vie aeree di fumatori e non fumatori<sup>116</sup>.

### **3.4 Altre neoplasie**

È possibile che l'esposizione all'asbesto si associ a forme di tumore extr-polmonari: laringe, tratto gastrointestinale, fegato, pancreas, ovaio, rene e disordini del sistema emopoietico.

Selikoff fu il primo a formulare tale ipotesi individuando una quota rilevante di tumori al tratto digerente tra i lavoratori esposti all'amianto e giustificandolo come la conseguenza della deglutizione di muco proveniente dalle vie aeree<sup>117</sup>: il diretto contatto dell'asbesto con le cellule epiteliali del tratto digerente avrebbe quindi determinato la loro trasformazione maligna. Il cancro allo stomaco è la patologia riportata più di frequente in letteratura.

Tuttavia l'Agenzia Internazionale per la ricerca sul Cancro (IARC) ha da poco concluso che le evidenze a supporto di un cancro dello stomaco asbesto-indotto sono limitate, ma è possibile considerare l'asbesto un cancerogeno ovarico.

Gli effetti sull'apparato riproduttivo sono poco noti, ma includono carcinoma ovarico e probabilità di incremento di aborti, mortalità infantile e di mesotelioma nell'infanzia. Mentre l'ambito della fertilità e dello sviluppo

fetale-infantile merita indagini più approfondite, è possibile sostenere che ad una elevata esposizione corrisponde un elevato rischio e che le donne con una esposizione professionale o familiare all'amianto hanno il più alto rischio di sviluppo di carcinoma ovarico<sup>118</sup>.

## **Capitolo quarto**

### **METODICA TRADIZIONALE E NUOVA METODICA PER LA CONTA DELLE FIBRE**

Lo studio sperimentale ha l'obiettivo di sviluppare una tecnica che dimostri affidabilità, precisione, accuratezza e riproducibilità del risultato utilizzando una procedura opportunamente modificata rispetto a quella tradizionalmente utilizzata e, qualora possibile, anche più rapida nell'esecuzione.

Si tratta di metodiche analitico-estrattive per il recupero di corpi e fibre.

#### **4.1 Materiali e reagenti**

I materiali utilizzati sono i seguenti:

- ✓ Bisturi monouso
- ✓ Garze sterili
- ✓ Pinze monouso
- ✓ Piastra Petri grande
- ✓ Falcon da 15 ml
- ✓ Falcon da 50 ml
- ✓ Bilancia analitica
- ✓ Carta di alluminio
- ✓ Parafilm
- ✓ Agitatore da tavolo

- ✓ Falcon da 50 ml
- ✓ Apparato di filtrazione Millipore® dotato di imbuto filtrante, supporto setto poroso in vetro sintetizzato, beuta da vuoto da 125 ml e pinza di serraggio
- ✓ Pompa da vuoto
- ✓ Magnete MACS MIDI
- ✓ Supporto per Magnete MACS MULTI STAND
- ✓ LD Column MACS Miltenyi Biotec
- ✓ Smagnetizzatore
- ✓ Asta metallica e morsetto
- ✓ Pasteur in plastica
- ✓ Filtro Millipore® mod. Isopore™ in policarbonato, diametro membrana 25mm, diametro pori 0,4 µm
- ✓ Vetrino portaoggetti 75x55mm
- ✓ Vetrino coprioggetti 75x55mm
- ✓ Nastro adesivo
- ✓ Microscopio ottico

I reagenti utilizzati sono i seguenti:

- ✓ Ipoclorito di sodio 7%
- ✓ Buffer MACS (PBS + BSA + EDTA)

- ✓ Acqua ultrapura
- ✓ Acido ossalico 8%
- ✓ Etanolo assoluto

## **4.2 Metodi**

Sono stati esaminati 12 casi, per ogni campione 5 frammenti di polmone fissati in formalina (anche inclusi in paraffina) provenienti da autopsie eseguite nei settori Medico-Legali di Ancona.

Per ogni reperto autoptico sono stati prelevati più campioni del peso di 0,3g cadauno.

Alcuni casi del 2020 sono stati processati con la procedura in sperimentazione.

È stato riesaminato il campione A08/20 (poiché dubbio) proveniente da un individuo con mesotelioma certificato dovuto ad esposizione prolungata ad asbesto.

## **4.3 Procedure**

La procedura di seguito elencata, e che il nostro istituto ha preso come riferimento, è quanto è stato proposto da Roggli *et al.*<sup>119</sup> nel 1984.

- Il campione selezionato è stato pesato umido su una bilancia analitica dopo una delicata rimozione del fluido in eccesso con della carta assorbente.

- Il tessuto è stato sminuzzato mediante bisturi monouso in frammenti da 1-2 mm.
- Il tessuto sminuzzato è stato trasferito in un becker; una aliquota di ipoclorito di sodio è stata versata nel becker, sino al raggiungimento di un contenuto di 10 ml.
- Il becker è stato contrassegnato per l'identificazione e posizionato sull'agitatore. La digestione è stata protratta sino a che i frammenti di tessuto non erano più visibili ad occhio nudo (di solito sono necessari 20-25 minuti per un campione di 0,3 g ma un tempo maggiore può essere necessario per la digestione di campioni particolarmente fibrotici o sparaffinati).
- È stato montato l'apparato di filtrazione e la sospensione è stata trasferita nell'imbuto filtrante. È preferibile aggiungere nell'imbuto un'aliquota non maggiore del 25% del totale della sospensione alla volta.
- Onde prevenire la deposizione di cristalli sulla superficie del filtro che potrebbero rallentare o arrestare la filtrazione, 2 ml di soluzione di acido ossalico, o di etanolo, o di ipoclorito di sodio possono essere aggiunti sulla superficie del filtro con una pipetta Pasteur facendo attenzione ad intervallare ogni lavaggio con un'aliquota (2 ml) di acqua ultrapura preriscaldata a 50°C.

- Dopo che la sospensione è stata completamente filtrata, è stato effettuato, nell'ordine, un risciacquo con ulteriori 2 ml di ipoclorito di sodio, acido ossalico, ed etanolo intervallati ciascuno da lavaggi con acqua ultrapura ed in ultimo con etanolo assoluto.
- Per procedere con la lettura al microscopio ottico, il filtro è stato quindi rimosso mediante pinzette ed è stato posto sulla superficie di un vetrino portaoggetti opportunamente contrassegnato con la superficie di filtrazione rivolta verso l'alto; (per procedere invece con la lettura al microscopio elettronico, il filtro è stato montato su apposito supporto ed analizzato, senza essere deposto su vetrino portaoggetti).
- Una volta che il filtro è stato fissato con del nastro adesivo lungo tutta la sua circonferenza, si è proceduto con la dissoluzione mediante somministrazione di cloroformio con pipetta Pasteur.
- Quando il filtro è stato completamente coperto e dissolto dal cloroformio, è stato tolto il nastro adesivo e montato il vetrino coprioggetto.

La *nuova metodica* utilizzata nel dipartimento di medicina legale dell'Ospedale Riuniti di Ancona si inserisce nell'ambito di un percorso di ricerca e di analisi, pur non discostandosi completamente da quella proposta da Roggli, essa apporta diversi cambiamenti sostanziali nella sua esecuzione: la scelta di un

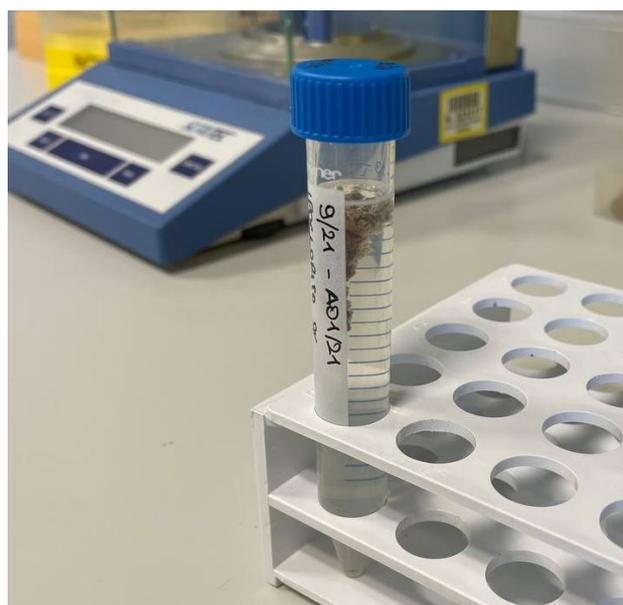
filtro Millipore® al posto di un Nucleopore®, l'utilizzo di un magnete per la separazione delle fibre, di un nuovo buffer per attivare la colonnina, di uno smagnetizzatore per il recupero ed infine la lettura diretta del filtro al microscopio ottico senza precedente dissoluzione in cloroformio.

Dunque tale procedura è così formulata:

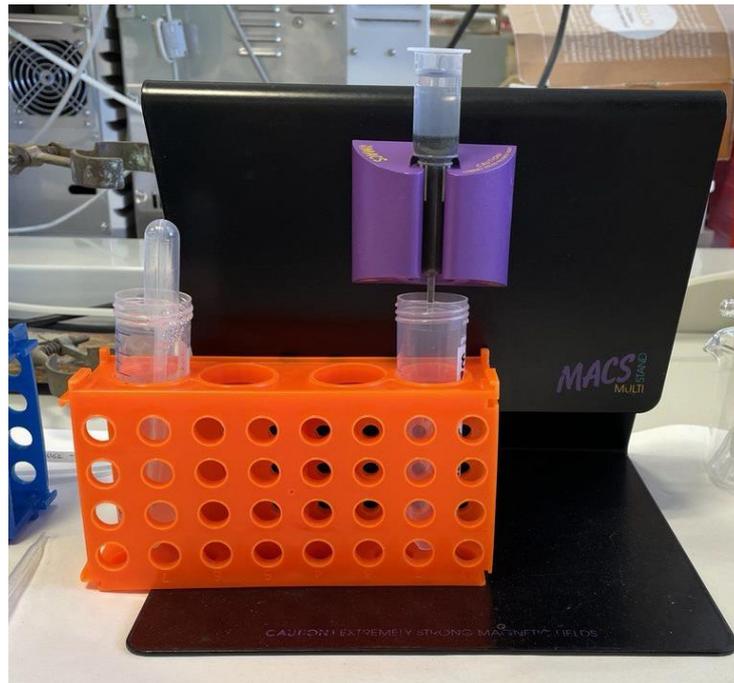
- I campioni provengono da autopsie eseguite nella SOD Medicina Legale dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona.
- Eseguire almeno un prelievo per ogni lobo polmonare.
- I campioni a fresco vengono conservati in congelatore a -20°C. Se i campioni sono stati fissati in formalina, vanno prima lavati o lasciati per qualche ora in acqua (a seconda della grandezza del pezzo).
- Campionare ogni porzione di lobo, evitando le parti più fibrose e la pleura, solo se patologica.
- Rimuovere il liquido in eccesso (acqua o sangue) con delle garze sterili.
- Sminuzzare il tessuto di tutti i prelievi dei 5 lobi polmonari utilizzando un bisturi monouso. I frammenti ottenuti dovranno avere dimensioni di 1-2 mm per permettere una più rapida digestione.



- Pesare con la bilancia analitica una quantità totale di campione di 0.3 g.
- Trasferire il tessuto sminuzzato in una Falcon da 15 ml identificata con il numero del caso e il peso del contenuto. È possibile utilizzare dell'ipoclorito per raccogliere i frammenti più piccoli rimasti sulla stagnola o sulla piastra usate per la pesata.
- Aggiungere 8-10 ml di ipoclorito di sodio.



- Sigillare la Falcon con parafilm e porre sull'agitatore fino a quando il tessuto non sarà stato completamente digerito. Se il materiale fa difficoltà a sciogliersi, cambiare l'ipoclorito saturato con ipoclorito fresco, conservando l'ipoclorito di scarto in una Falcon da 50 ml.
- Degassare il buffer depositando circa 10 ml di buffer sulla beuta da vuoto. Chiudere la beuta con relativo tappo sigillato con parafilm e aprire il vuoto. Lasciar degassare per circa 15-20 minuti.
- Preparare il magnete per la separazione delle fibre, posizionando il magnete MACS MIDI sul suo supporto.
- Posizionare la punta della colonnina LD Column all'interno del magnete MACS MIDI.
- Posizionare una Falcon da 50 ml sotto la colonnina per raccogliere il Waste (da conservare in frigorifero a 4°C).
- Attivare la colonna con 2 ml di buffer.
- Far passare il campione digerito attraverso la colonnina.
- Lavare la colonnina con 1 ml di buffer.



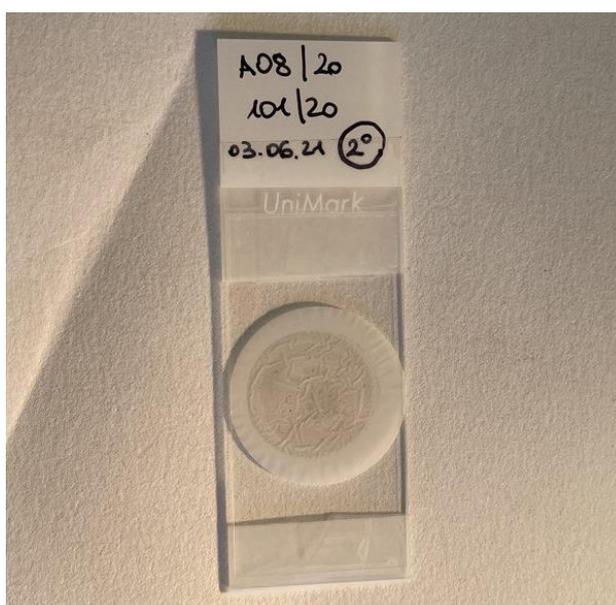
- Procedere con la smagnetizzazione della colonnina, inserendo la colonnina nel solenoide dello smagnetizzatore spento. Accendere lo smagnetizzatore e allontanare piano piano la colonnina dal solenoide per circa 1 metro e spegnere lo smagnetizzatore. Ripetere 2-3 volte.
- Procedere con il recupero delle fibre posizionando la colonnina su un'asta e una provetta sottostante per il recupero.
- Eluire con 3 ml di buffer (spingendo con il pistone). Ripetere 2 volte.
- Montare l'apparato di filtrazione (attaccare la beuta al tubo del vuoto; chiudere la beuta con il tappo filtrante; depositare qualche goccia di acqua ultrapura nell'area centrale; posizionare un filtro Millipore® sull'area centrale; chiudere con l'imbuto di vetro; sigillare con del parafilm; chiudere con le apposite pinze).



- Attivare il filtro con 1 ml di acqua ultrapura.
- Trasferire l'intero eluito nell'imbuto filtrante fino ad esaurire il campione.
- Al termine della filtrazione del campione, eseguire dei lavaggi nel seguente ordine: 2 ml di acqua, 2 ml di acido ossalico (per sciogliere i cristalli e pulire il filtro), 2 ml di acqua ultrapura, 2 ml di etanolo assoluto.
- Lasciare asciugare il filtro per qualche minuto.



- Rimuovere il filtro mediante pinzette, depositarlo su vetrino portaoggetti, opportunamente contrassegnato, con la superficie di filtrazione rivolta verso l'alto e sigillare con il coprioggetti utilizzando del nastro adesivo.



- Lavare l'apparato filtrante con acqua corrente e poi con acqua distillata.
- Procedere con la conta delle fibre di asbesto mediante un microscopio ottico ad un ingrandimento 200x.

### *Procedura in sperimentazione*

La metodica analitico-estrattiva in sperimentazione è analoga a quella precedentemente descritta con l'aggiunta di due passaggi che consentono di:

- Concentrare le fibre in modo da facilitare la rilevazione di queste in termini di conta.
- Velocizzare la procedura perché permette di eliminare il passaggio che prevede la filtrazione di tutto l'ipoclorito che è stato utilizzato per digerire il tessuto (possono servire quantità variabili dai 13 ai 50 ml).

Dunque la procedura è la seguente:

- I campioni provengono da autopsie eseguite nella SOD Medicina Legale dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona.
- Eseguire almeno un prelievo per ogni lobo polmonare.
- I campioni a fresco vengono conservati in congelatore a -20°C. Se i campioni sono stati fissati in formalina, vanno prima lavati o lasciati per qualche ora in acqua (a seconda della grandezza del pezzo).

- Campionare ogni porzione di lobo, evitando le parti più fibrose e la pleura, solo se patologica.
- Rimuovere il liquido in eccesso (acqua o sangue) con delle garze sterili.
- Sminuzzare il tessuto di tutti i prelievi dei 5 lobi polmonari utilizzando un bisturi monouso. I frammenti ottenuti dovranno avere dimensioni di 1-2 mm per permettere una più rapida digestione.
- Pesare con la bilancia analitica una quantità totale di campione di 0.3 g.
- Trasferire il tessuto sminuzzato in una Falcon da 15 ml identificata con il numero del caso e il peso del contenuto. È possibile utilizzare dell'ipoclorito per raccogliere i frammenti più piccoli rimasti sulla stagnola o sulla piastra usate per la pesata.
- Aggiungere 8-10 ml di ipoclorito di sodio.
- Sigillare la Falcon con parafilm e porre sull'agitatore fino a quando il tessuto non sarà stato completamente digerito. Se il materiale fa difficoltà a sciogliersi, cambiare l'ipoclorito saturato con ipoclorito fresco, conservando l'ipoclorito di scarto in una Falcon da 50 ml.

- Degassare il buffer depositando circa 10 ml di buffer sulla beuta da vuoto. Chiudere la beuta con relativo tappo sigillato con parafilm e aprire il vuoto. Lasciar degassare per circa 15-20 minuti.
- Centrifugare l'ipoclorito saturato per circa 10 minuti.
- Trasferire il surnatante in un'altra Falcon (ipoclorito di scarto) e risospendere il precipitato con circa 5 ml di buffer degassato.
- Preparare il magnete per la separazione delle fibre, posizionando il magnete MACS MIDI sul suo supporto.
- Posizionare la punta della colonnina LD Column all'interno del magnete MACS MIDI.
- Posizionare una Falcon da 50 ml sotto la colonnina per raccogliere il Waste (da conservare in frigorifero a 4°C).
- Attivare la colonna con 2 ml di buffer.
- Far passare il campione digerito attraverso la colonnina.
- Lavare la colonnina con 1 ml di buffer.
- Procedere con la smagnetizzazione della colonnina, inserendo la colonnina nel solenoide dello smagnetizzatore spento. Accendere lo

smagnetizzatore e allontanare piano piano la colonnina dal solenoide per circa 1 metro e spegnere lo smagnetizzatore. Ripetere 2-3 volte.

- Procedere con il recupero delle fibre posizionando la colonnina su un'asta e una provetta sottostante per il recupero.
- Eluire con 3 ml di buffer (spingendo con il pistone). Ripetere 2 volte.
- Montare l'apparato di filtrazione (attaccare la beuta al tubo del vuoto; chiudere la beuta con il tappo filtrante; depositare qualche goccia di acqua ultrapura nell'area centrale; posizionare un filtro Millipore<sup>®</sup> sull'area centrale; chiudere con l'imbuto di vetro; sigillare con del parafilm; chiudere con le apposite pinze).
- Attivare il filtro con 1 ml di acqua ultrapura.
- Trasferire l'intero eluito nell'imbuto filtrante fino ad esaurire il campione.
- Al termine della filtrazione del campione, eseguire dei lavaggi nel seguente ordine: 2 ml di acqua, 2 ml di acido ossalico (per sciogliere i cristalli e pulire il filtro), 2 ml di acqua ultrapura, 2 ml di etanolo assoluto.
- Lasciare asciugare il filtro per qualche minuto.

- Rimuovere il filtro mediante pinzette depositarlo su vetrino portaoggetto, opportunamente contrassegnato, con la superficie di filtrazione rivolta verso l'alto e sigillare con il coprioggetto utilizzando del nastro adesivo.
- Lavare l'apparato filtrante con acqua corrente e poi con acqua distillata.
- Procedere con la conta delle fibre di asbesto mediante un microscopio ottico ad un ingrandimento 200x.

#### **4.4 Conta dei corpuscoli dell'asbesto**

Per la quantificazione dei corpi dell'asbesto i campioni sono stati sottoposti ad una lettura al microscopio ottico *Nikon Eclipse E600* ad un ingrandimento a 200x-400x. Solo le formazioni con la tipica morfologia, la tipica colorazione ed un sottile nucleo traslucido sono state contate come corpi dell'asbesto.

I risultati sono stati riportati come numero di corpi per grammo di tessuto umido e, tramite il fattore di conversione universalmente impiegato e riportato in letteratura, *ovvero corpi/g di tessuto secco = corpi su g di tessuto umido x 10*, è stato possibile esprimere il risultato anche come numero di corpi per grammo di tessuto secco.

## Capitolo quinto

### RISULTATI E DISCUSSIONE

La diagnosi di patologie correlate all'asbesto è il frutto di un'integrazione di più dati: anamnestici, clinici, radiologici, citologici, istologici, istochimici, immunoistochimici. L'analisi delle fibre e dei corpi nel tessuto può contribuire definitivamente a stabilire se l'esposizione sia professionale o meno.

Le linee guida, ad uso clinico, riportate negli *Helsinki Criteria for Diagnosis and Attribution* stabiliscono che vi è un'elevata probabilità di esposizione professionale se si riscontrano un numero maggiore di:

- 100.000 fibre di anfiboli ( $>5\mu\text{m}$ ) per grammo di tessuto polmonare secco.
- 1 milione di fibre di anfiboli ( $>1\mu\text{m}$ ) per grammo di tessuto polmonare secco, misurate con microscopia elettronica.
- 1.000 corpi dell'asbesto per grammo di tessuto polmonare secco, 100 corpuscoli per grammo di tessuto polmonare umido.

Di seguito vengono riportati i 12 casi esaminati nell'anno 2020/2021 trattati con la nuova procedura analitico-estrattiva per la conta dei corpuscoli dell'asbesto (tabella 1).

<b>Codice</b>	<b>Codice autopsia</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Conta su intero filtro</b>	<b>Conta dopo conta diametri</b>	<b>Pari a C/G</b>	<b>Rapporto umido/secco</b>
A01-20	51/20	0,3603	8		26,11818479	261,1818479
A02-20	167/2019	0,3002	1		3,3311126	33,31112592
A03-20	150/2019	0,3086	9		29,1639663	291,639663
A04-20	39/20	0,3012	5		16,6002656	166,002656
A05-20	164/19	0,3088	0		0	0
A06-20	87/20	0,301	26		86,37873754	863,7873754
A07-20	91/20	0,3019	24		79,49652203	794,9652203
A08-20	101/20	0,3072	1		3,3	32,96
A09-20	143/20	0,3055	0		0	0
A10-20	153/20	0,3041	0		0	0
A01-21	09/21	0,3034	13		42,84772577	428,4772577
A02-21	166/20	0,301		1997,040	6634,684385	66346,84385

**Tabella 1.** Raccolta di tutti i risultati ottenuti per ogni campione

Interpretazione della tabella:

- **Codice/Codice autopsia** = sono identificativi del campione in esame.
- **Peso** = quantità in grammi di tessuto, proveniente da polmone, che deve essere digerito in ipoclorito.
- **Conta su intero filtro** = fibre rilevate dall'osservazione dettagliata dell'intero filtro.
- **Conta dopo conta diametri** = rappresenta la conta su intero filtro dopo aver contato i diametri (si applica in caso di concentrazioni molto elevate di fibre su vetrino), si ottiene moltiplicando il totale delle fibre per 6,28.
- **Pari a C/G** = corrisponde al numero totale delle fibre diviso il peso in grammi.

- **Rapporto umido/secco** = si moltiplica per 10 il risultato ottenuto facendo C/G.

Successivamente sono riportati i risultati ottenuti tramite l'analisi tossicologica quali-quantitativa su matrici biologiche, attraverso l'osservazione di filtri Millipore® (sono descritti 4 casi esplicativi).

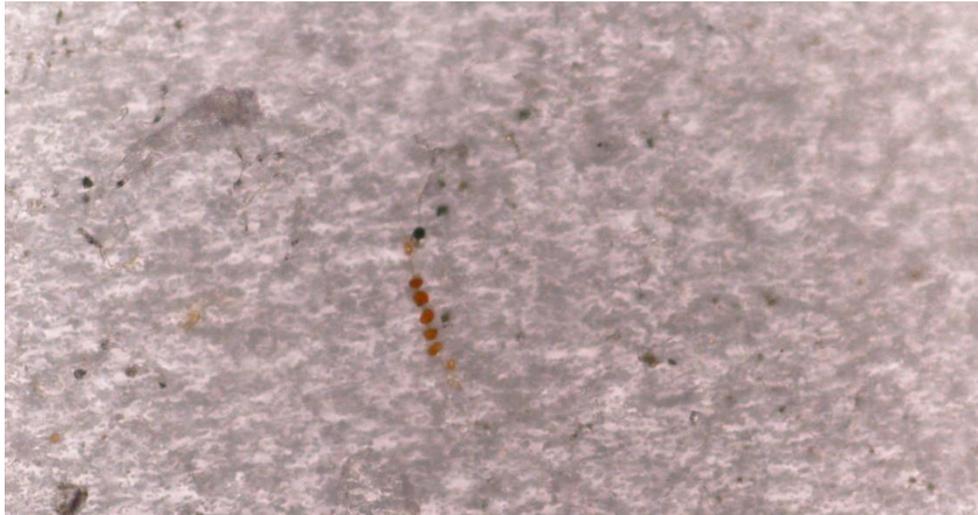
*A. Campione A03-20*

MATRICE: 0,308 g TESSUTO POLMONARE

**B. ANALISI**

**METODO:** DIGESTIONE MEDIANTE IPOCLORITO, FILTRAZIONE SU FILTRO CON PORI DI DIAMETRO 0,4 µm, QUANTIFICAZIONE MEDIANTE MICROSCOPIO OTTICO AD INGRANDIMENTO 200x.

SOSTANZA	RISULTATO
Corpi dell'Asbesto (C.A.)	9 C.A.
EQUIVALENTE A (APPROX.):	29,2 C.A./g tessuto umido 292 C.A./g tessuto secco



**Figura 11.** Corpi dell'asbesto su filtro ricavati da processazione di tessuto polmonare di A03-20.



**Figura 12.** Corpi dell'asbesto su filtro ricavati da processazione di tessuto polmonare di A03-20.

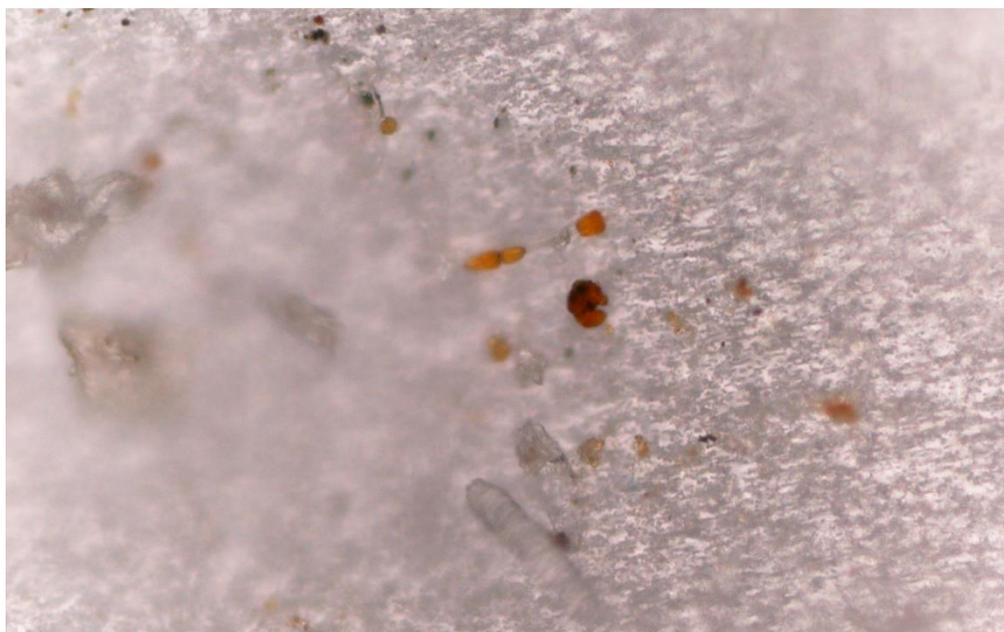
A. *Campione 06-20*

MATRICE: 0,302 g TESSUTO POLMONARE

B. ANALISI

METODO: DIGESTIONE MEDIANTE IPOCLORITO, FILTRAZIONE SU FILTRO CON PORI DI DIAMETRO 0,4  $\mu\text{m}$ , QUANTIFICAZIONE MEDIANTE MICROSCOPIO OTTICO AD INGRANDIMENTO 200x.

SOSTANZA	RISULTATO
Corpi dell'Asbesto (C.A.)	26 C.A.
EQUIVALENTE A (APPROX.):	86,4 C.A./g tessuto umido 864 C.A./g tessuto secco



**Figura 13.** Corpi dell'asbesto su filtro ricavati da processazione di tessuto polmonare di A06-20.



**Figura 14.** Corpi dell'asbesto su filtro ricavati da processazione di tessuto polmonare di A06-20.

*A. Campione A01-21*

MATRICE: 0,303 g TESSUTO POLMONARE

**B. ANALISI**

METODO: DIGESTIONE MEDIANTE IPOCLORITO, FILTRAZIONE SU FILTRO CON PORI DI DIAMETRO 0,4  $\mu\text{m}$ , QUANTIFICAZIONE MEDIANTE MICROSCOPIO OTTICO AD INGRANDIMENTO 200x.

SOSTANZA	RISULTATO
Corpi dell'Asbesto (C.A.)	13 C.A.
EQUIVALENTE A (APPROX.):	42,8 C.A./g tessuto umido 428 C.A./g tessuto secco



**Figura 15.** Corpi dell'asbesto su filtro ricavati da processazione di tessuto polmonare di A01-21.



**Figura 16.** Corpi dell'asbesto su filtro ricavati da processazione di tessuto polmonare di A01-21.

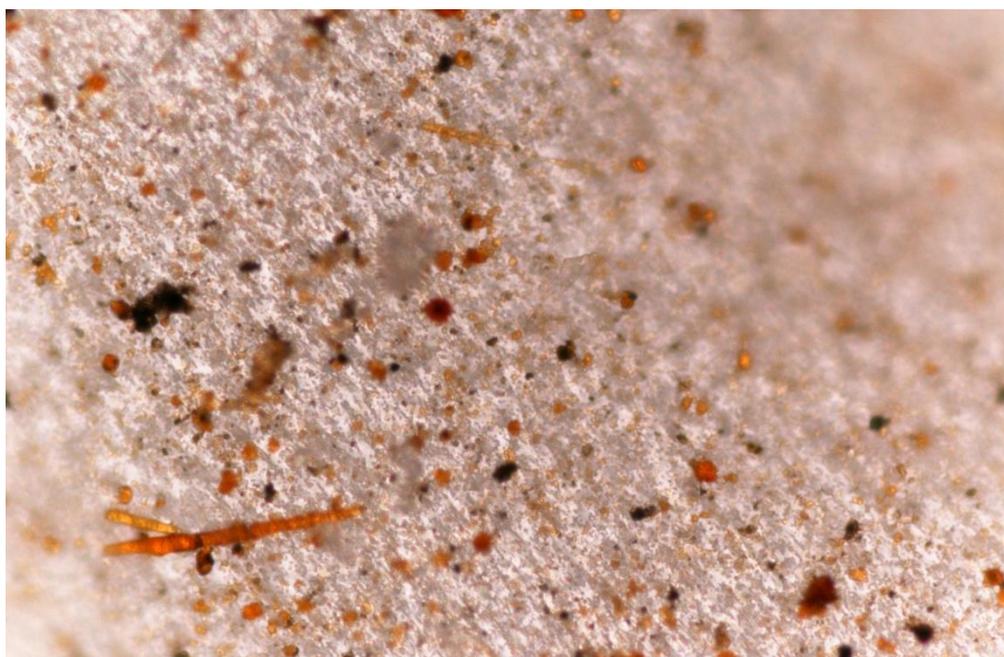
A. *Campione A02-21*

MATRICE: 0,301 g TESSUTO POLMONARE

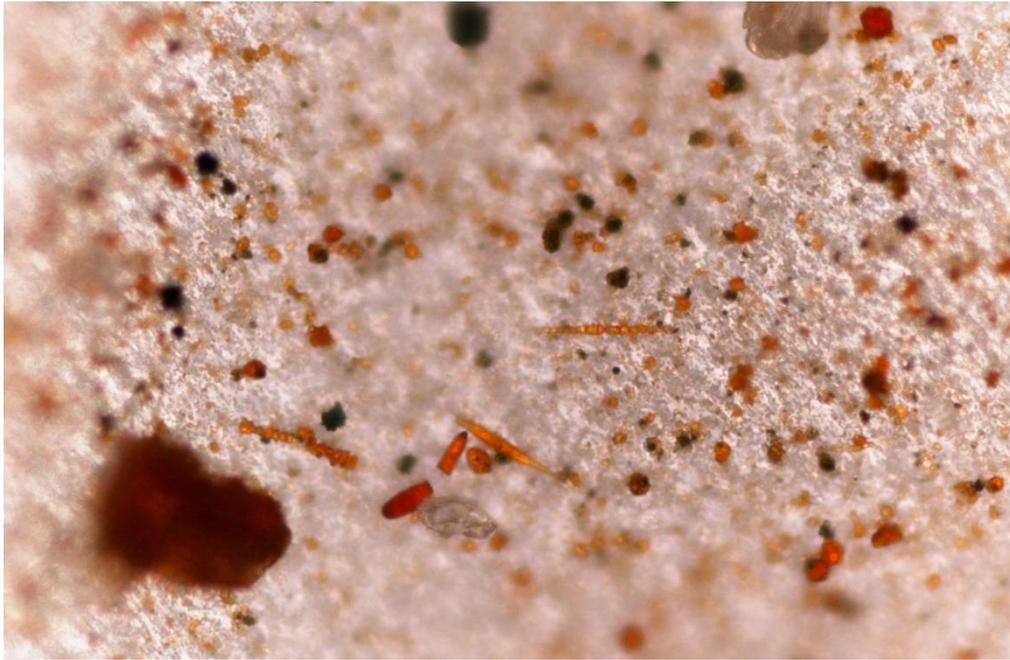
B. ANALISI

METODO: DIGESTIONE MEDIANTE IPOCLORITO, FILTRAZIONE SU FILTRO CON PORI DI DIAMETRO 0,4  $\mu\text{m}$ , QUANTIFICAZIONE MEDIANTE MICROSCOPIO OTTICO AD INGRANDIMENTO 200x.

SOSTANZA	RISULTATO
Corpi dell'Asbesto (C.A.)	1997 C.A.
EQUIVALENTE A (APPROX.):	6634,7 C.A./g tessuto umido 66347 C.A./g tessuto secco



**Figura 17.** Corpi dell'asbesto su filtro ricavati da processazione di tessuto polmonare di A02-21.



**Figura 18.** Corpi dell'asbesto su filtro ricavati da processazione di tessuto polmonare di A02-21.

Il vantaggio dell'impiego in laboratorio di questa nuova procedura risiede proprio nelle modifiche apportate: sostituzione del tipo di filtro con riduzione del numero degli steps analitici (poiché viene meno la dissoluzione in cloroformio) offrendo la possibilità di poter osservare direttamente il vetrino al microscopio ottico. Inoltre anche l'utilizzo di un magnete, di un nuovo buffer e di uno smagnetizzatore la caratterizzano come innovativa.

Dai risultati e dalle immagini riportate si evince che la procedura sperimentale oggetto della tesi risulta essere sensibile e capace di identificare corpi in modo certo anche nei casi in cui il campione risulti contaminato.

Proprio in virtù di questa sua capacità e del fatto che si basa su degli strumenti alla portata dei laboratori di Medicina Legale può essere impiegata come tecnica di conferma per quei casi di sospetta esposizione all'amianto, con tale procedura si ottiene una prima valutazione qualitativa e semi-quantitativa che verrà demandata ai laboratori in grado di applicare esami di secondo livello.

La modestia dei casi disponibili e la limitata raccolta del campione biologico all'atto dell'autopsia rende sostanzialmente impossibile la verifica dell'affidabilità test-retest sul medesimo soggetto, dovendo desumere la precisione e l'accuratezza della tecnica esclusivamente in riferimento ad altre tecniche standard.

Per quanto riguarda la *procedura in sperimentazione* sono stati testati i campioni *A07-20; A08-20; A09-20; A10-20* con entrambe le procedure, quello che si è potuto dedurre è che nei casi di indubbia positività entrambe le metodiche sono estremamente sensibili ed affidabili, ma nei casi in cui il numero di fibre rilevabili è molto basso risulta poco attendibile tale procedura in sperimentazione.

Si è pensato da subito che tale metodica potesse sostituire la precedente apportando delle modifiche finalizzate a migliorare quella che già è una tecnica innovativa. Il problema sulla sua effettiva attendibilità è sorto nel momento in cui è stato esaminato il campione *A08-20*, il quale è risultato negativo per la

conta delle fibre, mentre la storia clinica del soggetto ed altri esami avevano già dimostrato la presenza di mesotelioma per esposizione lavorativa ad amianto.

Nonostante ciò non è da escludere la possibile applicazione di tale procedura poiché i campioni con essa esaminati sono in numero troppo ridotto per poter trarre delle conclusioni sulla sensibilità e riproducibilità della metodica.

In ogni processo analitico di laboratorio è contemplata la probabilità di ottenere risultati non corretti, gli errori possono verificarsi dalla fase pre-analitica alla refertazione, per cui non necessariamente legati alla procedura stessa, dunque sono necessari ulteriori approfondimenti.

## CONCLUSIONE

Ventinove anni fa la legge 257/92 metteva al bando l'amianto in Italia, ma di amianto si continua a morire. Ogni anno si stimano per difetto oltre tremila vittime ed è una certezza come nel 2020, ad aggravare il bilancio, sia subentrato il Covid-19, che ha inciso su questi soggetti fragili, portando l'Ona (Osservatorio nazionale amianto) a stimare circa settemila decessi nell'anno indicato.

Cruciale e ben lontano dall'essere risolto il problema dello smaltimento. Stando ai dati della Società italiana di medicina ambientale, nel Bel Paese esistono ancora 96.000 siti contaminati e più di 370.000 strutture contenenti amianto censite dalle Regioni, tra cui oltre 2.400 scuole a rischio.

In ambito clinico la difficoltà risiede nell'individuare un rapporto di causalità tra una pregressa esposizione ad asbesto ed una patologia ad essa correlabile, tra cui il mesotelioma maligno della pleura e del peritoneo, la cui rarità combinata con una forte associazione all'esposizione rende molto affidabile l'ipotesi dell'effettiva inalazione di tali fibre. Il ventaglio delle patologie asbesto-correlate presenti in letteratura comprende anche placche pleuriche, asbestosi, carcinoma del polmone e altre neoplasie la cui incidenza aumenta in caso di pregressa esposizione ad amianto.

Individuare le circostanze dell'esposizione appare spesso di difficile risoluzione, soprattutto perché le patologie causate dall'asbesto sono caratterizzate da lunghissimi periodi di latenza e a volte il soggetto è già deceduto.

La nuova procedura utilizzata nel laboratorio di Medicina Legale di Ancona assume un ruolo rilevante nel momento in cui aiuta a stabilire eventuali responsabilità civili e penali, soprattutto per quei casi con concentrazioni border-line rispetto ai valori quantitativi stabiliti dai criteri internazionali.

La semplicità, la rapidità, l'affidabilità e la sensibilità nella rilevazione dei corpuscoli dell'asbesto rendono tale metodica ampiamente utilizzabile nei laboratori di Medicina Legale.

## BIBLIOGRAFIA

1. WHO, IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 14. Asbestos. Summary of Data Reported and Evaluation. 1998.
2. Compagnoni R., Groppo C. Rend. Soc. Geol. It., 3 (2006), Nuova Serie, 21-28, 11 ff., 3 tabb.
3. Baronnet A. e Devouard B. (1996) – Topology and crystal growth of natural chrysotile and polygonal serpentine. *J. Crystal Growth*, 166, 952-960.
4. Coin P, Roggli VL: Mineralogy of Asbestos. In: Pathology of Asbestos-Associated Diseases (Roggli VL, Oury TD, Sporn TA, eds.). Springer, New York NY, 2004; pp. 1-16.
5. ISPEL Registro Nazionale dei mesoteliomi Re.Na.M. Terzo Rapporto. Roma, maggio 2010.
6. Marchand F (1906) Ueber eigentmliche Pigmentkristalle in den Lungen. *Verhandl d Deutsch path Gesellsch* 10:223-228.
7. Fahr T (1914) Demonstrationen: Preparate and Microphotogrammes von einen Falle von Pneumokoniose. *Muench Med Woch* 11:625.
8. Cooke WE (1927) Pulmonary asbestosis. *Br Med J* 2:1024–1025.

9. Stewart MJ, Haddow AC (1929) Demonstration of the peculiar bodies of pulmonary asbestosis (“asbestosis bodies”) in material obtained by lung puncture and in the sputum. *J Pathol Bacteriol* 32:172.
10. Cooke WE (1929) Asbestos dust and the curious bodies found in pulmonary asbestosis. *Br Med J* 2:578–580.
11. Gloyne SR (1929) The presence of the asbestos fibre in the lesions of asbestos workers. *Tubercle* 10:404–407.
12. Castleman BI (1984) *Asbestos: medical and legal aspects*. Harcourt, Brace, and Jovanovich, New York.
13. Roggli VL (1989) Pathology of human asbestosis: a critical review. In: Fenoglio-Preiser CM (ed) *Advances in pathology*, vol 2. Yearbook Pub., Inc, Chicago, pp 31–60.
14. Gross P, de Terville RTP, Cralley LJ, Davis JMG (1968) Pulmonary ferruginous bodies: development in response to filamentous dusts and a method of isolation and concentration. *Arch Pathol* 85:539–546.
15. Gaensler EA, Addington WW (1969) Asbestos or ferruginous bodies. *N Engl J Med* 280:488–492.
16. Churg A, Warnock ML (1977) Analysis of the cores of ferruginous (asbestos) bodies from the general population. I: Patients with and without lung cancer. *Lab Invest* 37:280–286.

17. Churg A, Warnock ML, Green N (1979) Analysis of the cores of ferruginous (asbestos) bodies from the general population. II. True asbestos bodies and pseudoasbestos bodies. *Lab Invest* 40:31–38.
18. Greenberg SD (1981) *Asbestos-associated pulmonary diseases*. Cypress, CA.
19. Davis JMG (1970) Further observations on the ultrastructure and chemistry of the formation of asbestos bodies. *Exp Mol Pathol* 13:346–358.
20. Governa M, Rosanda C (1972) A histochemical study of the asbestos body coating. *Br J Ind Med* 29:154–159.
21. Churg AM, Warnock ML (1981) Asbestos and other ferruginous bodies: their formation and clinical significance. *Am J Pathol* 102:447–456.
22. Vorwald AJ, Durkan TM, Pratt PC (1951) Experimental studies of asbestosis. *Arch Ind Hyg Occup Med* 3:1–43.
23. McLemore TL, Mace ML, Roggli V, Marshall MV, Lawrence EC, Wilson RK, Martin RR, Brinkley BR, Greenberg SD (1980) Asbestos body phagocytosis by human free alveolar macrophages. *Cancer Lett* 9:85–93.

24. Ghio AJ, LeFurgey A, Roggli VL (1997) In vivo accumulation of iron on crocidolite is associated with decrements in oxidant generation by the fiber. *J Toxicol Environ Health* 50:125–142.
25. Governa MM, Amati M (1999) Role of iron in asbestos-body-induced oxidant radical generation. *J Toxicol Environ Health* 58:279–287.
26. Ghio AJ, Churg A, Roggli VL (2004) Ferruginous bodies: implications in the mechanism of fiber and particle toxicity. *Toxicol Pathol* 32:643–649.
27. Greenberg SD (1982) Asbestos lung disease. *Semin Respir Med* 4:130–136.
28. Roggli V.L. (2014) Asbestos Bodies and Non-asbestos Ferruginous Bodies. In: Oury T., Sporn T., Roggli V. (eds) *Pathology of Asbestos-Associated Diseases*. Springer, Berlin, Heidelberg.
29. Roggli VL, Pratt PC (1983) Numbers of asbestos bodies on iron-stained tissue sections in relation to asbestos body counts in lung tissue digests. *Hum Pathol* 14:355–361.
30. Morgan A, Holmes A (1980) Concentrations and dimensions of coated and uncoated asbestos fibres in the human lung. *Br J Ind Med* 37:25–32.
31. Morgan A, Holmes A (1985) The enigmatic asbestos body: its formation and significance in asbestos-related disease. *Environ Res* 38:283–292.

32. Dodson RF, O'Sullivan MF, Williams MG Jr, Hurst GA (1982) Analysis of cores of ferruginous bodies from former asbestos workers. *Environ Res* 28:171–178.
33. Suzuki Y, Churg J (1969) Structure and development of the asbestos body. *Am J Pathol* 55:79–107.
34. Koerten HK, Hazekamp J, Kroon M, Daems WT (1990) Asbestos body formation and iron accumulation in mouse peritoneal granulomas after the introduction of crocidolite asbestos fibers. *Am J Pathol* 136:141–157.
35. Pascolo L, Gianocelli A, Kaulich B, Rizzardi C, Schneider M, Bottin C, Polentarutti M, Kishinova M, Longoni A, Melato M (2011) Synchrotron soft X-ray imaging and fluorescence microscopy reveal novel features of asbestos body morphology and composition in human lung tissues. *Part Fibre Toxicol* 8:7–17.
36. Borelli V, Brochetta C, Melato M, Rizzardi C, Polentarutti M, Busatto C, Vita F, Abbate R, Gotter R, Zabucchi G (2007) A procedure for the isolation of asbestos bodies from lung tissue by exploiting their magnetic properties: a new approach to asbestos body study. *J Toxicol Environ Health A* 70:1232–1240.
37. Gloyne SR (1931) The formation of the asbestosis body in the lung. *Tubercle* 12:399–401.

38. Botham SK, Holt PF (1971) Development of asbestos bodies on amosite, chrysotile, and crocidolite fibres in guinea-pig lungs. *J Pathol* 105:159–167.
39. Mace ML, McLemore TL, Roggli V, Brinkley BR, Greenberg SD (1980) Scanning electron microscopic examination of human asbestos bodies. *Cancer Lett* 9:95–104.
40. Koerten HK, de Bruijn JD, Daems WT (1990) The formation of asbestos bodies by mouse peritoneal macrophages: an in vitro study. *Am J Pathol* 137:121–134.
41. Thomson JG, Kaschula ROC, MacDonald RR (1963) Asbestos as a modern urban hazard. *S Afr Med J* 37:77–8.
42. Churg A, Warnock ML (1977) Correlation of quantitative asbestos body counts and occupation in urban patients. *Arch Pathol Lab Med* 101:629–634.
43. Arenas-Huertero FJ, Salazar-Flores M, Osornio-Vargas AR (1994) Ferruginous bodies as markers of environmental exposure to inorganic particles: experience with 270 autopsy cases in Mexico. *Environ Res* 64:10–17.

44. Bhagavan BS, Koss LG (1976) Secular trends in presence and concentration of pulmonary asbestos bodies – 1940 to 1972. *Arch Pathol* 100:539–54.
45. Haque AK, Kanz MF (1988) Asbestos bodies in children’s lungs: an association with sudden infant death syndrome and bronchopulmonary dysplasia. *Arch Pathol Lab Med* 112:514–518.
46. Sebastien P, Fondimare A, Bignon J, Monchaux G, Desbordes J, Bonnaud G (1977) Topographic distribution of asbestos fibres in human lung in relation to occupational and nonoccupational exposure. In: Walton WH (ed) *Inhaled particles, vol IV*. Pergamon Press, Oxford, pp 435–446.
47. Rosen P, Melamed M, Savino A (1972) The “ferruginous body” content of lung tissue: a quantitative study of eighty-six patients. *Acta Cytol* 16:207–211.
48. Morgan A, Holmes A (1983) Distribution and characteristics of amphibole asbestos fibres, measured with the light microscope, in the left lung of an insulation worker. *Br J Ind Med* 40:45– 50.
49. Morgan A, Holmes A (1984) The distribution and characteristics of asbestos fibers in the lungs of Finnish anthophyllite mine-workers. *Environ Res* 33:62–75.

50. Pinkerton KE, Plopper CG, Mercer RR, Roggli VL, Patra AL, Brody AR, Crapo JD (1986) Airway branching patterns influence asbestos fiber location and the extent of tissue injury in the pulmonary parenchyma. *Lab Invest* 55:688–695.
51. Um CH (1971) Study of the secular trend in asbestos bodies in lungs in London, 1936-1966. *Br Med J* 2:248–252.
52. Roggli VL, Greenberg SD, Seitzman LH, McGavran MH, Hurst GA, Spivey CG, Nelson KG, Hieger LR (1980) Pulmonary fibrosis, carcinoma, and ferruginous body counts in amosite asbestos workers: a study of six cases. *Am J Clin Pathol* 73:496–503.
53. King JA, Wong SW (1996) Autopsy evaluation of asbestos exposure: retrospective study of 135 cases with quantitation of ferruginous bodies in digested lung tissue. *South Med J* 89:380–385.
54. Manke J, Rodelsperger K, Brtickle B, Woitowitz H-J (1987) Evaluation and application of a plasma ashing method for STEM fiber analysis in human lung tissue. *Am Ind Hyg Assoc J* 48:730–738.
55. Gylseth B, Baunan RH, Overaae L (1982) Analysis of fibres in human lung tissue. *Br J Ind Med* 39:191–195.
56. Gylseth B, Churg A, Davis JMG, Johnson N, Morgan A, Mowe G, Rogers A, Roggli V (1985) Analysis of asbestos fibers and asbestos

- bodies in tissue samples from human lung: an international interlaboratory trial. *Scand J Work Environ Health* 11:107–110.
57. Mollo F, Cravello M, Andreozzi A, Burlo P, Bo P, Attanasio A, De Giuli P (2000) Asbestos body burden in decomposed human lungs. *Am J Forensic Med Pathol* 21:148–150.
  58. Gloyne SR (1933) The morbid anatomy and histology of asbestosis. *Tubercle* 14:550–558.
  59. Godwin MC, Jagatic J (1970) Asbestos and mesotheliomas. *Environ Res* 3:391–416.
  60. Roggli VL, Benning TL (1990) Asbestos bodies in pulmonary hilar lymph nodes. *Mod Pathol* 3:513–517.
  61. Roggli VL, Piantadosi CA, Bell DY (1986) Asbestos bodies in bronchoalveolar lavage fluid: a study of 20 asbestos-exposed individuals and comparison to patients with other chronic interstitial lung diseases. *Acta Cytol* 30:470–476.
  62. Kobayashi H, Ming ZW, Watanabe H, Ohnishi Y (1987) A quantitative study on the distribution of asbestos bodies in extrapulmonary organs. *Acta Pathol Jpn* 37:375–383.
  63. Holt PF (1981) Transport of inhaled dust to extrapulmonary sites. *J Pathol* 133:123–129.

64. Lee KP, Barras CE, Griffith FD, Waritz RS, Lapin CA (1981) Comparative pulmonary responses to inhaled inorganic fibers with asbestos and fiberglass. *Environ Res* 24:167–191.
65. Churg AM, Warnock ML (1979) Analysis of the cores of ferruginous (asbestos) bodies from the general population: III. Patients with environmental exposure. *Lab Invest* 40:622–626.
66. Craighead JE, Mossman BT (1982) Pathogenesis of asbestos-associated diseases. *N Engl J Med* 306:1446–1455.
67. Roggli VL, Brody AR (1988) Imaging techniques for application to lung toxicology. In: Gardner DE, Crapo JD, Massaro EJ (eds) *Toxicology of the lung*. Raven Press, New York, pp 117–145.
68. Roggli VL (1989) Scanning electron microscopic analysis of mineral fibers in human lungs, Ch 5. In: Ingram P, Shelburne JD, Roggli VL (eds) *Microprobe analysis in medicine*. Hemisphere Pub. Corp, Washington, DC, p 97–110.
69. McDonald JC. Health implications of environmental exposure to asbestos. *Environ Health Perspect*. 1985 Oct; 62:319-28.
70. Adami JG. *Principles of Pathology*. Lea & Febiger, Philadelphia, 1908.
71. Klemperer P, Coleman BR. Primary neoplasms of the pleura. A report of five cases. *Am J Ind Med*. 1992;22(1):1-31.

72. McCaughey WTE, Kannerstein M, Churg J. Tumors and Pseudotumors of the Serous Membranes. Atlas of Tumor Pathology, Second Series, Fascicle 20. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1985.
73. Cooke WE. Fibrosis of the lungs due to the inhalation of asbestos dust. British Medical Journal. 1924;2:147.
74. Bartrip PW. History of asbestos related disease. Postgrad Med J. 2004 Feb;80(940):72-6.
75. Merewether ERA, Price CW. Report on effects of asbestos dust on the lungs and dust suppression in the asbestos industry. London: HMSO, 1930.
76. Magnani C, Fubini B, Mirabelli D, et al Pleural mesothelioma: epidemiological and public health issues. Report from the Second Italian Consensus Conference on Pleural Mesothelioma. Med Lav. 2013;104:191-202.
77. Magnani C, Bianchi C, Chellini E, et al. III Italian Consensus Conference on Malignant Mesothelioma of the Pleura. Epidemiology, Public Health and Occupational Medicine related issues. Med Lav. 2015;106:325-32.

78. Sporn TA, Roggli VL: Mesothelioma. In Pathology of Asbestos-Associated Diseases (Roggli VL, Oury TD, Sporn TA, eds). Springer, New York NY, 2004; pp. 104-168.
79. Weiss SW, Goldblum JR. Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors. Fourth edition. Mosby, Missouri, 2001; pp. 1063-1110.
80. Marinaccio A, Binazzi A, Bonafede M et al. Sesto Rapporto Il Registro Nazionale dei Mesoteliomi. 2018. INAIL Milano, 2018.
81. AIOM-AIRTUM, "I numeri del cancro in Italia 2018".
82. Nicita C, Buzzoni C, Chellini E et al. Confronto fra registri specializzati e registri tumori di popolazione: i risultati del progetto ReNaM-AIRTUM A comparative analysis between regional mesothelioma registries and cancer registries: results of the ReNaM-AIRTUM project. *Epidemiol Prev.* 2014;38:191-9.
83. Montanaro F, Rosato R, Gangemi M, et al. Survival of pleural malignant mesothelioma in Italy: a population-based study. *Int J Cancer* 2009;124:201-7.
84. Mirabelli D, Roberti S, Gangemi M, et al. Survival of peritoneal malignant mesothelioma in Italy: A population-based study. *Int J Cancer.* 2009; 124, 194–200.

85. <https://www.cpo.it/it/articles/show/incidenza-sopravvivenza-ed-esposizione-dei-mesoteliomi-1990-2016/>.
86. Marinaccio A, Montanaro F, Mastrantonio M, et al. Predictions of mortality from pleural mesothelioma in Italy: a model based on asbestos consumption figures supports results from age-period-cohort models. *Int J Cancer* 2005;115:142-7.
87. Pelucchi C, Malvezzi M, La Vecchia C, et al. The Mesothelioma epidemic in Western Europe: an update. *Br J Cancer* 2004;90:1022-4.
88. Chrysotile Asbestos Expert Panel. Chrysotile Asbestos Consensus Statement and Summary, Montreal, Quebec, November 13-14,2007.
89. Luberto F, Ferrante D, Silvestri S, et al. Cumulative asbestos exposure and mortality from asbestos related diseases in a pooled analysis of 21 asbestos cement cohorts in Italy. *Environ Health*. 2019;18:71. doi: 10.1186/s12940-019-0510-6.
90. Grosse Y, Loomis D, GuytonKZ; et al. Carcinogenicity of fluoro-edenite, silicon carbide fibres and whiskers,and carbon nanotubes. *Lancet Oncol* 2014; 15:1427-28.
91. IARC: man-made mineral fibres. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans, 81. Lyon: WHO. IARC; 2002.p. 1-381.

92. Johnson NF; Hahn FF. Induction of mesothelioma after intrapleural inoculation of F344 rats with silicon carbide whiskers of continuous ceramic filaments. *Occup Environ Med* 1996;53:813-6.
93. Poland CA, Duffin R, Kinloch I, et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol* 2008;3:423-8.
94. Muller J, Delos M, Panin N, et al. Absence of carcinogenic response to multiwall carbon nanotubes in a 2-years bioassay in the peritoneal cavity of the rat. *Toxicol Sci* 2009;110:442-8.
95. De Klerk N, Alfonso H, Olsen N, et al. Familial aggregation of malignant mesothelioma in former workers and residents in Wittenoom, Western Australia. *Int J Cancer* 2013;132:1423-28.
96. Pastorino S, Yoshikawa Y, Pass HI, et al, A subset of mesothelioma with improved survival occurring in carriers of BAP1 and other germline mutations. *J Clin Oncol* 2018. doi: 10.1200/JCO.2018.79.0352.
97. Reid A, de Klerk NH, Magnani C, et al. Mesothelioma risk after 40 years since first exposure to asbestos: a pooled analysis. *Thorax*. 2014;69:843-50.
98. Galateau-Salle F, Churg A, Roggli V, Travis WD; World Health Organization Committee for Tumors of the Pleura. The 2015 World

- Health Organization Classification of Tumors of the Pleura: Advances since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*. 2016 Feb;11(2):142-54.
99. Novello S, Pinto C, Torri V, et al. The Third Italian Consensus Conference for Malignant Pleural Mesothelioma: State of the art and recommendations. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016 Aug; 104:9-20.
100. Hjerpe A, Ascoli V, Bredrossian CWM, et al. Guidelines for the cytopathologic diagnosis of epithelioid and mixedtype malignant mesothelioma. *Acta Cytologica* 2015; 59:2-16.
101. Kho-Duffin J, Tao LC, Cramer H, Catellier MJ, Irons D, Ng P. Cytologic diagnosis of malignant mesothelioma, with particular emphasis on the epithelial noncohesive cell type. *Diagn Cytopathol* 1999;20(2):57-62.
102. Cozzi I, Oprescu FA, Rullo E, Ascoli V. Loss of BRCA1-associated protein 1 (BAP1) expression is useful in diagnostic cytopathology of malignant mesothelioma in effusions. *Diagn Cytopathol*. 2018 Jan;46(1):9-14.
103. Churg A, Attanoos R, Borczuk AC, et al. Dataset for Reporting of Malignant Mesothelioma of the Pleura or Peritoneum: Recommendations From the International Collaboration on Cancer Reporting (ICCR). *Arch Pathol Lab Med*. 2016; 140: 1104-10.

104. Kobzik L: Il polmone. Robbins, Le Basi Patologiche delle Malattie. 6° ed. (Vol.2) a cura di Cotran RS, Kumar V, Collins T. Piccin, Padova, 2000; pp. 817-86.
105. Mollo F, Bellis D, Magnani C, Delsedime L, Andrion A. Hyaline splenic and hepatic plaques. Correlation with cirrhosis, pulmonary tuberculosis, and asbestos exposure. Arch Pathol Lab Med. 1993 Oct; 117(10):1017-21.
106. Consensus Report (1997) – Henderson DW, Rantanen J, Barnhart S, Dement JM, De Vuyst, Hillerdal G, Huuskonen MS, Kivisaari Y, Kusaka Y, Lahdensuo A, Langard S, Mowe G, Okubo T, Parker JE, Roggli VL, Rodelsperger K, Rosler J, Tossavainen A, Voitowitz HJ. Asbestos, asbestosis, and cancer: the Helsinki criteria for diagnosis and attribution. Scand J Work Environ Health. 1997; 23: 311-6.
107. Mizell KN, Morris CG, Carter JE. Antemortem diagnosis of asbestosis by screening chest radiograph correlated with postmortem histologic features of asbestosis: a study of 273 cases. J Occup Med Toxicol. 2009 Jun 12; 4:14.
108. Abejie BA, Wang X, Kales SN, Christiani DC. Patterns pulmonary dysfunction in asbestos workers: a cross-sectional study. J Occup Med Toxicol. 2010 Jun 3; 5:12.

109. International Labour Office. International classification of radiographs of pneumoconioses. Geneva, Switzerland: International Labour Organization; 2003.
110. American Thoracic Society Ad Hoc Statement Committee. Diagnosis and Initial Management of Nonmalignant Diseases Related to Asbestosis. *Am J Respir Crit Care Med*. Sep. 2004; 170:691-715.
111. Roggli VL, Sanders LL. Asbestos content of lung tissue and carcinoma of the lung: a clinicopathologic correlation and mineral fiber analysis of 234 cases. *Ann Occup Hyg*. 2000 Mar; 44(2):109-17.
112. Roggli VL: Carcinoma of the Lung. In: *Pathology of Asbestos-Associated Diseases* (Roggli VL, Oury TD, Sporn TA, eds.). Springer, New York NY, 2004; pp.193-216.
113. Pierce JS, McKinley MA, Paustenbach DJ, Finley BL. An evaluation of reported no-effect chrysotile asbestos exposures for lung cancer and mesothelioma. *Crit Rev Toxicol*. 2008; 38(3):191-214.
114. Kamp DW. Asbestos-induced lung diseases: an update. *Transl Res*. 2009 Apr; 153(4):143-52. Epub 2009 Feb 11.
115. Henderson DW, Rödelsperger K, Weitowitz HJ, Leigh J. *After Helsinki: a multidisciplinary review of the relationship between asbestos*

- exposure and lung cancer, with emphasis on studies published during 1997-2004. *Pathology*. 2004 Dec; 36(6):517-50.
116. Churg A, Stevens B. Enhanced retention of asbestos fibers in the airways of human smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 May; 151(5):1409-13.
117. Selikoff IJ. Epidemiology of gastrointestinal cancer. *Environ Health Perspect*. 1974 December; 9:299-305.
118. Bunderson-Schelvan M, Pfau JC, Crouch R, Holian A. Nonpulmonary outcomes of asbestos exposure. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2011; 14(1-4):122-52.
119. Roggli VL: Tissue Digestion Techniques. In: *Pathology of Asbestos-Associated Diseases* (Roggli VL, Oury TD, Sporn TA, eds.). Springer, New York NY, 2004; pp. 402-10.