



RAPPORTI ISTISAN 17|12

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Corpuscoli dell'asbesto nel tessuto polmonare umano e liquidi biologici: metodo analitico e atlante fotografico

Gruppo Biofibre



AMBIENTE
E SALUTE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Corpuscoli dell'asbesto
nel tessuto polmonare umano e liquidi biologici:
metodo analitico e atlante fotografico**

Gruppo Biofibre

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**Rapporti ISTISAN
17/12**

Istituto Superiore di Sanità

Corpuscoli dell'asbesto nel tessuto polmonare umano e liquidi biologici: metodo analitico e atlante fotografico.

Gruppo Biofibre

2017, iv, 58 p. Rapporti ISTISAN 17/12

L'analisi della concentrazione di corpuscoli dell'asbesto nelle matrici organiche e in particolare nel tessuto polmonare umano è fondamentale per lo studio delle patologie asbesto-correlate e per la valutazione della passata esposizione. In letteratura sono presenti numerose metodiche diverse e questo rende i dati poco confrontabili tra loro. Il Gruppo Biofibre ha predisposto e descritto in dettaglio un metodo condiviso di preparazione e analisi del tessuto polmonare umano per la determinazione della concentrazione di corpuscoli dell'asbesto in microscopia ottica e ha proceduto alla sua validazione. Nella validazione del metodo è stato definito il misurando attraverso la realizzazione di un atlante di immagini e sono stati determinati: campo di misura, ripetibilità stretta, limite di rilevabilità, sensibilità analitica. Attraverso la realizzazione di un materiale di riferimento certificato in accordo con la norma ISO 13528:2005, è stata determinata l'incertezza di misura. Il metodo è applicabile anche all'analisi di liquidi biologici (lavaggio bronchioloalveolare, espettorato).

Parole chiave: Corpuscoli dell'asbesto; Tessuto polmonare

Istituto Superiore di Sanità

Asbestos bodies in human lung tissue and biological fluids: analytical method and photo atlas.

Biofibre Working group

2017, iv, 58 p. Rapporti ISTISAN 17/12 (in Italian)

The asbestos body burden analysis in human lung tissue is a very important task for the study of asbestos related diseases and for the evaluation of past exposure to asbestos fibres. In literature many different methods are described and thus corresponding results are not always comparable. The Biofibre Working group has prepared and described in detail a shared method of preparation and analysis of human lung tissue to determine the asbestos bodies burden using an Optical Microscope and proceeded to its validation. The measurand (asbestos bodies) has been defined through the realization of an atlas of images. Measuring range, repeatability, limit of detection and analytical sensitivity was determined. Through the production of a Certified Reference Material according the ISO Standard 13528:2005, measurement uncertainty was determined. The method is also applicable to the analysis of biological fluids (broncho-alveolar lavage, sputum).

Key words: Asbestos bodies; Human lung tissue

Si ringrazia il Prof. Emerito Benedetto Terracini per aver collaborato alla stesura del presente documento.

Per informazioni su questo documento scrivere a: biagio.bruni@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Gruppo Biofibre. *Corpuscoli dell'asbesto nel tessuto polmonare umano e liquidi biologici: metodo analitico e atlante fotografico*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2017. (Rapporti ISTISAN 17/12).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Paola De Castro* e *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



Il gruppo Biofibre è nato nel 2008 per volere del Ministero della Salute come continuazione dell'ultimo mandato alla Commissione Amianto, ex art 4 della legge 257/92 (conclusosi il 31/12/2006). I partecipanti sono stati selezionati sulla base di comprovata esperienza su patologie asbesto-correlate e/o amianto e corpuscoli dell'asbesto in matrici di rilevanza ambientale, sanitaria e biologica.

Mariano ALESSI	<i>Direzione Generale della Prevenzione Sanitaria Ufficio IV, Ministero della Salute, Roma</i>
Valeria ASCOLI	<i>Dipartimento di Scienze Radiologiche, Oncologiche e Anatomico- Patologiche, Università Sapienza, Roma</i>
Donata BELLIS	<i>Presidio Ospedaliero Martini, ASL Unica TO2-TO1, Torino</i>
Elena BELLUSO	<i>Dipartimento di Scienze della Terra e Centro Interdipartimentale "G. Scansetti", Università di Torino, Torino</i>
Alessandro BROLLO	<i>Ospedale di Gorizia-Monfalcone AAS n. 2 "Bassa Friulana-Isontina", Monfalcone (GO)</i>
Biagio Maria BRUNI	<i>Dipartimento di Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma</i>
Antonella CAMPOPIANO	<i>Dipartimento Medicina, Epidemiologia, Igiene del Lavoro e Ambiente, INAIL Settore Ricerca, Monte Porzio Catone (Roma)</i>
Fulvio CAVARIANI	<i>Centro di Riferimento Regionale Amianto, ASL Viterbo, Viterbo</i>
Patrizia GAROFANI	<i>Unità Operativa Prevenzione e Sicurezza Ambienti di Lavoro, ASL Umbria 1, Perugia</i>
Orietta SALA*	<i>Polo Analitico Regionale Amianto, Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale Emilia-Romagna, Reggio Emilia</i>
Giuseppina SCANCARELLO	<i>Laboratorio di Sanità Pubblica, Area Vasta Toscana Sud Est, AUSL Toscana Sud Est, Siena</i>
Stefano SILVESTRI*	<i>Istituto per lo Studio e la Prevenzione Oncologica, Firenze</i>
Anna SOMIGLIANA	<i>Centro di Microscopia Elettronica, Settore laboratori, ARPA Lombardia, Milano</i>

* in quiescenza al momento della pubblicazione

INDICE

A. Metodo analitico: tessuto polmonare umano	1
A1. Scopo e principio del metodo	1
A1.1. Campo di applicazione	1
A1.2. Campo di misura	1
A2. Definizione di corpuscolo dell'asbesto e interferenze	2
A3. Accessori, reagenti e strumentazione	2
A3.1. Accessori	2
A3.2. Reagenti	2
A3.3. Strumentazione	2
A4. Prelievo e conservazione del tessuto da inviare al laboratorio di analisi	3
A4.1. Prelievo	3
A4.2. Conservazione	4
A4.2.1. Campioni conservati in formalina	4
A4.2.2. Campioni conservati in paraffina	4
A5. Preparazione del campione per l'analisi dei corpuscoli dell'asbesto	5
A5.1. Preparazione del tessuto polmonare conservato in formalina	5
A5.1.1. Digestione chimica della parte organica	5
A5.1.2. Trattamento con inceneritore al plasma della parte organica	7
A5.2. Preparazione del tessuto polmonare in paraffina	8
A6. Analisi della membrana al microscopio ottico	9
A6.1. Calcoli ed espressione del risultato	10
A7. Qualità del metodo	11
A7.1. Linearità e campo di misura	11
A7.2. Limite di rilevabilità	11
A7.3. Sensibilità analitica	12
A7.4. Ripetibilità stretta	13
A7.5. Esattezza	13
A7.6. Incertezza	14
A8. Informazioni da riportare sul rapporto di prova	14
A9. Sicurezza: avvertenze e precauzioni	14
B. Metodo analitico: liquidi biologici	15
B1. Scopo e principio del metodo	15
B1.1. Campo di applicazione	15
B1.2. Campo di misura	15
B2. Definizione di corpuscolo dell'asbesto e interferenze	16
B3. Accessori e reagenti e strumentazione	16
B3.1. Accessori	16
B3.2. Reagenti	16
B3.3. Strumentazione	16
B4. Prelievo e conservazione del materiale da inviare al laboratorio di analisi	17
B4.1. Broncoaspirato	17
B4.2. Lavaggio bronchioloalveolare	17
B4.3. Escreato/espettorato	18

B5. Preparazione del campione per l'analisi dei corpuscoli dell'asbesto.....	18
B5.1. Digestione chimica della parte organica.....	19
B5.2. Filtrazione	19
B5.3. Allestimento del preparato per l'analisi in microscopia ottica	20
B6. Analisi al microscopio ottico	20
B6.1. Calcoli ed espressione del risultato	20
B7. Qualità del metodo	21
B7.1. Linearità e campo di misura	21
B7.2. Limite di rilevabilità.....	21
B7.3. Sensibilità analitica	22
B7.4. Ripetibilità stretta	22
B7.5. Incertezza	22
B8. Informazioni da riportare sul rapporto di prova.....	23
B9. Sicurezza: avvertenze e precauzioni.....	23
Bibliografia	24
Appendice A	
Atlante di immagini di corpuscoli dell'asbesto.....	25
A1. Corpuscoli dell'asbesto certi	27
A2. Corpuscoli dell'asbesto probabili	37
A3. Corpuscoli non asbesto su fibra o particella di talco	40
A4. Corpuscoli non asbesto con fibra/particella interna visibile	44
A5. Altri corpuscoli non asbesto con fibra interna visibile	49
Appendice B	
Schede di preparazione dei campioni e resoconti di prova	53
B1. Scheda di preparazione per tessuto polmonare.....	55
B2. Resoconto di prova	56
B3. Scheda di preparazione per liquidi biologici	57
B4. Resoconto di prova per liquidi biologici.....	58

A. METODO ANALITICO: TESSUTO POLMONARE UMANO

A1. Scopo e principio del metodo

Questo metodo definisce le modalità di preparazione ed analisi di campioni di tessuto polmonare umano per l'analisi quantitativa dei Corpuscoli dell'Asbesto (CA). Queste analisi sono realizzate mediante l'utilizzo di un microscopio ottico a luce trasmessa.

Il metodo si basa sul conteggio diretto dei CA così come visti al microscopio ottico. Il tessuto polmonare deve essere ripulito dalla componente organica e il residuo filtrato su membrana in esteri misti di cellulosa.

A1.1. Campo di applicazione

L'analisi deve essere effettuata su campioni di parenchima polmonare sano conservato preferibilmente in formalina proveniente da intervento chirurgico o da autopsia.

Per quanto riguarda l'analisi di tessuto incluso in paraffina, deve essere garantito dal richiedente l'analisi o, preferibilmente, dall'anatomopatologo che ha preparato il campione, che il materiale fornito sia parenchima polmonare sano (poiché il procedimento di eliminazione della paraffina modifica la struttura del campione non è facile a posteriori definire se si tratti di parenchima sano piuttosto che altro tessuto).

L'analisi è completamente distruttiva.

La metodica è applicabile in linea teorica a qualsiasi tessuto biologico diverso dal polmone. È necessario assicurarsi in questo caso che il tessuto biologico sottoposto ad analisi sia digerito adeguatamente. L'analisi dei corpuscoli in altri tessuti biologici è utilizzata, allo stato attuale, esclusivamente per scopi di ricerca scientifica.

A1.2. Campo di misura

L'unità di misura in cui è espresso il risultato è corpuscoli per grammo di tessuto polmonare secco:

$$\text{CA/g tess s o corp/g tess s.}$$

Gli estremi del campo di misura dipendono dalla quantità di campione sottoposta ad analisi, dalla superficie di filtro analizzata e dall'area effettiva del filtro (area di filtrazione).

Il limite inferiore del campo di applicabilità coincide con la sensibilità analitica del metodo (vedi paragrafo A7.3.) e si calcola ipotizzando di trovare 1 solo corpuscolo in tutta l'analisi. Il limite inferiore del campo di misura può essere abbassato aumentando la superficie di filtro analizzata.

Il limite superiore è inversamente proporzionale al peso di tessuto polmonare sottoposto a preparazione. Nel caso in cui il filtro risulti troppo carico di corpuscoli, è opportuno preparare un filtro con una quantità di campione inferiore.

Per l'analisi del tessuto polmonare umano, il campo di misura è indicativamente:

$$200-20.000.000 \text{ CA/g tess s.}$$

A2. Definizione di corpuscolo dell'asbesto e interferenze

Il CA è costituito da una fibra di amianto ricoperta da mucopolisaccaridi e da proteine contenenti ferro. Il CA si forma nel tessuto polmonare attraverso un processo di fagocitosi della fibra di amianto per azione dei macrofagi alveolari liberi.

Normalmente i corpuscoli ferruginosi si formano su fibre di amianto di lunghezza superiore a 5 µm (prevalentemente anfiboli), ma possono in generale avere forme e dimensioni estremamente variabili.

Il processo di fagocitosi in generale si può realizzare anche su fibre diverse dalle fibre di asbesto.

In letteratura sono stati segnalati corpuscoli formati su fibre di altra natura come altre fibre inorganiche, fibre vetrose, fibre carboniose, fibre metalliche o fibre vegetali.

I corpuscoli su fibre di talco sono in genere ben distinguibili, e possono essere contati separatamente. In alcuni casi, benché rari, può non essere possibile distinguere i CA da corpuscoli su fibre di altra natura con l'uso del solo microscopio ottico.

Per facilitare l'identificazione dei corpuscoli dell'asbesto è predisposto un atlante di corpuscoli fornito in Appendice A. Per la compilazione dell'atlante è stato utilizzato come riferimento il libro *Pathology of Asbestos-Associated Disease* di Roggli *et al.* (1).

Il testo è stato integrato con immagini originali realizzate sia in microscopia ottica che in microscopia elettronica a scansione.

A3. Accessori, reagenti e strumentazione

A3.1. Accessori

- Becker di vetro o plastica da 100-200 mL;
- Provette tipo falcon da circa 100 mL, o beute con tappo a vite da 100 mL;
- Capsula di porcellana del diametro di 40 mm (per digestione con inceneritore al plasma di ossigeno);
- Membrane in esteri misti di cellulosa non retinate da 3 µm o inferiore e diametro 25 mm.

A3.2. Reagenti

- Ipoclorito di sodio;
- Perossido di idrogeno;
- Acqua bidistillata filtrata;
- Alcool etilico (per digestione con inceneritore al plasma di ossigeno);
- Triacetato di glicerina;
- Acetone;
- Mezzo di montaggio per microscopia a base di xilolo.

A3.3. Strumentazione

- Cappa flusso laminare;
- Stufa;

- Sistema di filtrazione con pompa aspirante;
- Liofilizzatore;
- Inceneritore al plasma di ossigeno;
- Microscopio ottico binoculare con le seguenti caratteristiche:
 - Illuminazione Kohler;
 - Obiettivo acromatico a 40 ingrandimenti, con un'apertura numerica compresa tra 0,65 e 0,70;
 - Oculari a compensazione a 10 ingrandimenti o a 12.5 ingrandimenti (per un ingrandimento complessivo di 400-500 X rispettivamente);
 - Nel caso in cui si intenda utilizzare per l'analisi un riduttore del campo visivo (tipo reticolo oculare circolare Walton-Beckett), almeno un oculare deve permettere l'inserimento del reticolo ed essere del tipo con messa a fuoco.

A4. Prelievo e conservazione del tessuto da inviare al laboratorio di analisi

Per fornire un'accurata analisi il tessuto in esame deve essere trattato in modo ottimale. Infatti dal momento in cui il materiale viene prelevato sino al momento in cui verrà adeguatamente trattato con le opportune metodiche di conservazione, potrebbe subire processi di alterazione.

La conservazione del materiale diventa quindi fondamentale al fine di garantire una corretta analisi ma altrettanto importante risulta essere il suo trasporto che dovrà essere tale da garantire la tracciabilità (dal momento del prelievo sino alla sua archiviazione) e/o rintracciabilità del campione stesso (vedi *Linee Guida Tracciabilità, Raccolta, Trasporto, Conservazione e Archiviazione di cellule e tessuti per indagini diagnostiche di Anatomia Patologica. Ministero della Salute Consiglio Superiore di Sanità; 2015 (2)*).

A4.1. Prelievo

In caso di riscontro autoptico, si esegue un campionamento random di tessuto polmonare periferico, distante dalla pleura viscerale, dai grossi bronchi e da eventuali lesioni, prelevando dalle zone di seguito elencate:

- lobo superiore polmone dx (destro);
- lobo medio polmone dx;
- lobo inferiore polmone dx;
- lobo superiore polmone sx (sinistro);
- lobo inferiore polmone sx;
- lingua.

Il pezzo deve essere un parallelepipedo avente possibilmente una base di 5x5 cm² oppure un peso possibilmente di circa 6 g.

In caso di materiale chirurgico, si effettua un unico campionamento distante dalla neoplasia, dalla pleura viscerale e dai grossi bronchi.

È opportuno che il pezzo prelevato non abbia diametro inferiore a 3 cm oppure un peso inferiore a 3 g.

A4.2. Conservazione

Generalmente il tessuto polmonare da inviare al laboratorio, che avrà il compito di eseguire l'analisi, consiste in un:

- campione fissato in formalina;
- campione incluso in paraffina.

A4.2.1. Campioni conservati in formalina

La formaldeide o aldeide formica, può essere usata per la raccolta e come mezzo di trasporto di tessuti derivati da interventi chirurgici e biopsie nelle sale operatorie e negli ambulatori di prelievo biotico (endoscopico, radiologico, ecc.) ed è il fissativo per eccellenza dei tessuti prelevati per diagnosi anatomopatologica. Ad oggi non è ancora disponibile una valida alternativa alla formaldeide come fissativo dei tessuti nei servizi di anatomia patologica, risultandone indispensabile l'utilizzo ferma restando l'applicabilità obbligatoria delle procedure preventive a tutela della salute dei soggetti esposti.

Durante la procedura bisogna fare attenzione a:

- Inserire separatamente ogni frammento in un contenitore di plastica con tappo a vite contenente una soluzione di formalina tamponata al 10% fosfato. Il frammento deve risultare completamente coperto dalla soluzione o con rapporto 1 a 10.
Nota: l'utilizzo di altre soluzioni fissative potrebbe non garantire la conservazione dei corpuscoli.
- Su ogni contenitore annotare:
 - nome del "paziente" oppure codice identificativo;
 - polmone, lobo e zona di provenienza del frammento (es. apice, lobo inferiore, polmone dx).

Il campionamento subottimale (per numero di sedi polmonari rappresentate; per mancata identificazione della topografia dei campioni; per scarsa quantità di tessuto) non pregiudica la ricerca ma aumenta l'ampiezza dei limiti fiduciali del risultato e riduce la rappresentatività del risultato del conteggio, come indice dell'esposizione pregressa.

Non vi è evidenza che la conservazione prolungata in formalina 10% comporti una variazione del numero di corpi reperibili, ma sono necessari studi al riguardo; come misura prudenziale, si ritiene opportuno procedere tempestivamente all'inoltro del materiale al laboratorio, ed in ogni caso specificare la data del prelievo e quindi di fissazione del materiale.

A4.2.2. Campioni conservati in paraffina

Questa modalità non risulta essere quella più idonea per la conservazione del tessuto polmonare che successivamente dovrà essere analizzato per la ricerca di corpuscoli dell'asbesto.

Il materiale incluso in paraffina potrà essere utilizzato esclusivamente nel caso in cui non sia possibile avere materiale fissato in formalina.

Si fa presente che qualora si abbia la necessità di inviare campioni inclusi in paraffina si dovrà verificare che ci siano almeno 2 inclusi, come aliquota minima, provenienti da un lobo con parenchima polmonare non interessato dalla neoplasia, fermo restando che, maggiore è il numero di blocchetti che verranno successivamente sottoposti ad analisi, più rappresentativo sarà il risultato.

È opportuno che insieme alle inclusioni si invii al laboratorio anche un preparato istologico ottenuto dalla stessa inclusione per ricerca diretta dei CA sulla sezione istologica e a verifica del tipo di materiale che verrà utilizzato per la gestione chimica.

A5. Preparazione del campione per l'analisi dei corpuscoli dell'asbesto

Una volta giunto nel laboratorio che dovrà eseguire questa analisi, il campione dovrà essere opportunamente trattato. Scopo della preparazione del campione è l'eliminazione della parte organica del tessuto e l'allestimento di un vetrino con il residuo inorganico per l'analisi in microscopia ottica.

Il campione di tessuto polmonare dovrà subire un primo processo che ha il fine di distruggere la parte organica del campione stesso. Questa fase può essere effettuata tramite una digestione chimica in ipoclorito o tramite un trattamento termico (incenerimento con forno a plasma asher). Nel caso del trattamento con inceneritore al plasma, il campione dovrà essere precedentemente disidratato tramite liofilizzazione.

La parte inorganica presente come residuo della digestione chimica o dal trattamento termico viene raccolta tramite filtrazione su una membrana in estere di cellulosa non retinata. La membrana viene, a questo punto, processata per l'allestimento del vetrino che verrà letto in microscopia ottica.

Durante la preparazione del campione è opportuno compilare un resoconto di preparazione in cui vengono annotati tutti i passaggi e le fasi fondamentali della preparazione. Al riguardo si fornisce in Appendice B1 un modulo di resoconto di preparazione del campione biologico.

A5.1. Preparazione del tessuto polmonare conservato in formalina

Non sono richieste specifiche condizioni ambientali per questo tipo di prova.

A5.1.1. Digestione chimica della parte organica

Il campione immerso in formalina arriva al laboratorio in contenitore chiuso per la sicurezza del laboratorio e degli operatori (la formalina è riconosciuta come rischio cancerogeno Classe 1).

L'operatore apre il contenitore sotto cappa, indossando guanti in lattice monouso e dispone i frammenti di tessuto polmonare in un becker contenente acqua distillata.

Prelevare circa 1-2 cm³ di tessuto polmonare per ogni singola preparazione.

Se possibile disporre in un unico becker 2 frammenti provenienti da apice e base di uno stesso lobo, sarà in questo modo fornito un valore di concentrazione per ogni lobo polmonare.

A5.1.1.1. Fase I: eliminazione della formalina

Eliminare opportunamente la formalina in eccesso.

Nel caso si renda necessario il lavaggio del campione con acqua bidistillata, è opportuno sottoporre ad analisi i liquidi di lavaggio per verificare l'eventuale presenza di corpuscoli.

A5.1.1.2. Fase II: determinazione del peso secco equivalente

Pesare da 1-5 g di tessuto polmonare umido (P_{umido}). Mettere il tessuto a seccare in stufa per 24 ore a 105°C.

Pesare il campione disidratato (P_{secco}).

Il rapporto secco/umido viene utilizzato per determinare il peso secco del campione sottoposto a digestione chimica secondo la relazione:

$$P_{TS} = P_{Prep} \times \frac{P_{secco}}{P_{umido}}$$

Nota: una fase molto delicata risulta essere quella, prima della pesata del tessuto umido, dell'eliminazione quanto più possibile del liquido presente nel tessuto (sia esso formalina o acqua di lavaggio). A tale scopo si consiglia di appoggiare delicatamente più volte il campione su carta bibula senza azioni di compressione del campione stesso.

A5.1.1.3. Fase III: digestione chimica

Pesare 0,5 g di tessuto umido ripulito dalla formalina (P_{Prep}) facendo attenzione ad eliminare quanto più liquido possibile appoggiando delicatamente più volte il campione su carta bibula senza azioni di compressione del campione stesso. Disporlo in una provetta tipo falcon o in una beuta con tappo a vite e aggiungere 50 mL di ipoclorito di sodio al 13%.

Si può accelerare l'effetto dell'agente ossidante sminuzzando il campione. È possibile aggiungere, con cautela, 1-2 gocce di perossido di idrogeno (acqua ossigenata) al preparato facendo molta attenzione agli effetti della reazione e cercando di agitare costantemente la soluzione.

Disporre la provetta in stufa a 60°C per almeno 24 ore, avendo cura di agitare bene la provetta almeno 3-4 volte nel periodo.

La digestione del parenchima polmonare può ritenersi completa quando, scuotendo la provetta, non si vedranno più porzioni di materiale; in caso contrario, si aggiunge altro ipoclorito di sodio (circa 20 mL) e si procede con la digestione per altre 24 ore.

Per ridurre il rischio di formazione di artefatti nel preparato come quella dei cristalli di cloruro di sodio, si consiglia di tenere la soluzione in stufa fino al momento della filtrazione.

A5.1.1.4. Fase IV: filtrazione

La sospensione viene quindi filtrata su membrana di esteri misti di cellulosa non retinata avente diametro di 25 mm e porosità massima di 3 µm.

Per la filtrazione è opportuno utilizzare un sistema in grado di garantire una distribuzione omogenea del residuo inorganico in soluzione sul filtro. Quindi si consiglia un sistema a sezione circolare con un diametro effettivo di filtrazione di circa 15-20 mm e colletto di filtrazione lungo almeno 5 volte il diametro effettivo.

Terminata la filtrazione dell'ipoclorito, il filtro viene poi lavato filtrando acqua distillata preriscaldata a circa 60°C per eliminare i cristalli di ipoclorito di sodio che si sono formati nel corso della digestione.

Per facilitare la filtrazione è consigliabile alternare nella filtrazione 10 mL di soluzione di ipoclorito con 10-50 mL di acqua tiepida, fino al completo esaurimento della soluzione. Terminato di filtrare la soluzione, il contenitore va lavato con circa 20 mL di acqua tiepida. L'acqua di lavaggio deve essere filtrata sulla medesima membrana.

Far essiccare la membrana in stufa a 60°C per 1 ora.

A5.1.1.5. Fase V: allestimento del preparato per l'analisi in microscopia ottica

Questa fase prevede l'allestimento della membrana sul vetrino per poter essere successivamente analizzato.

Dopo la filtrazione, la membrana viene fatta asciugare e successivamente può essere ridotta tramite bisturi in modo tale da ottenere due metà di filtro. Una parte può essere conservata mentre l'altra metà verrà sottoposta ad analisi.

La membrana, per poter essere osservata al microscopio in luce trasmessa, dovrà essere per prima cosa chiarificata e questo può avvenire principalmente con 2 tecniche:

- utilizzando i vapori di acetone (tramite l'impiego di un diafanizzatore);
- utilizzando un mezzo di montaggio per microscopia a base di xilolo con indice di rifrazione (nD20) compreso fra 1,4 e 1,5.

Se si è utilizzata la tecnica dei vapori di acetone si dovrà procedere con l'aggiunta di 2/3 gocce di un liquido di contrasto come la triacetina (triacetato di glicerina) con nD20 pari a circa 1,43. Successivamente il tutto viene coperto con il vetrino copri-oggetto.

Se per chiarificare la membrana si è utilizzato un mezzo di montaggio per microscopia a base di xilolo si dovrà procedere a coprire successivamente il preparato con il vetrino copri-oggetto.

A5.1.2. Trattamento con inceneritore al plasma della parte organica

Il campione immerso in formalina arriva al laboratorio in contenitore chiuso per la sicurezza del laboratorio e degli operatori (la formalina è riconosciuta come rischio cancerogeno Classe 1).

L'operatore apre il contenitore sotto cappa, indossando guanti in lattice monouso e dispone i frammenti di tessuto polmonare in un becker contenente acqua distillata.

Preparare circa 1-2 cm³ di tessuto polmonare per ogni singola preparazione.

Se possibile disporre in un unico becker 2 frammenti provenienti da apice e base di uno stesso lobo, sarà in questo modo fornito un valore di concentrazione per ogni lobo polmonare.

A5.1.2.1. Fase I: eliminazione della formalina

Eliminare opportunamente la formalina in eccesso.

Nel caso si renda necessario il lavaggio del campione con acqua bidistillata, è opportuno sottoporre ad analisi i liquidi di lavaggio per verificare l'eventuale presenza di corpuscoli.

A5.1.2.2. Fase II: disidratazione mediante liofilizzatore

Il processo di liofilizzazione consiste nell'eliminazione dell'acqua attraverso sublimazione che si verifica sotto una certa soglia di pressione e temperatura.

La liofilizzazione permette di ottenere la completa disidratazione del campione senza nessuna modifica della struttura morfologia del campione. In pratica non si ha nessun restringimento del campione (come invece si verifica con la disidratazione in stufa) che potrebbe provocare la rottura e la frammentazione delle fibre e dei CA.

Una volta ultimata la disidratazione pesare 50 mg di campione con bilancia a 5 cifre, si determina dunque il peso secco del campione sottoposto ad analisi: P_{TS}.

A5.1.2.3. Fase III: incenerimento della parte organica con forno al plasma di ossigeno

Questa fase ha il fine di eliminare la parte organica del tessuto polmonare.

Inserire nella camera dell'inceneritore al plasma una capsula di porcellana contenente il tessuto disidratato pesato.

Per l'incenerimento si seguono le procedure descritte sul manuale dello strumento.

Si consiglia di proseguire l'incenerimento utilizzando una potenza di 100 w, per un tempo di circa 16-20 ore.

A5.1.2.4. Fase IV: filtrazione

Dopo l'incenerimento sospendere la cenere con 30 mL di acqua bidistillata filtrata e aggiungere circa 2 mL di alcool etilico (per facilitare la filtrazione riducendo la tensione superficiale).

Agitare vigorosamente per 1 minuto.

Filtrare il tutto su una membrana in esteri misti di cellulosa, possibilmente non retinata, di 25 mm di diametro con porosità inferiore a 3 µm.

Per la filtrazione è opportuno utilizzare un sistema in grado da garantire una distribuzione omogenea del residuo di polmone sul filtro. Quindi si consiglia un sistema a sezione circolare con un diametro effettivo di filtrazione di circa 15-20 mm e colletto di filtrazione lungo almeno 5 volte il diametro effettivo.

A5.1.2.5. Fase IV: allestimento del preparato per l'analisi in microscopia ottica

La membrana in cellulosa viene chiarificata e montata come già descritto nel paragrafo A5.1.1.5.

A5.2. Preparazione del tessuto polmonare in paraffina

Il campione che giunge nel laboratorio incluso in paraffina prima di essere sottoposto alla preparazione deve essere sparaffinato.

Per la sparaffinatura si procede staccando con una lametta monouso il frammento di tessuto polmonare dalla paraffina e cercando di eliminare la paraffina in eccesso.

L'eliminazione totale della paraffina (sparaffinatura) si esegue immergendo la porzione di tessuto polmonare, staccata dalla celletta di inclusione, in xilolo per almeno 24 ore e ripetendo tale passaggio almeno 3 volte.

La sparaffinatura può avvenire comunque in stufa a 60°C per accelerare lo scioglimento della paraffina. Ogni volta lo xilolo residuo viene filtrato su membrana in cellulosa per raccogliere eventuali fibre e/o corpuscoli che si possono liberare durante la sparaffinatura.

Essendo questa una fase critica del processo, deve essere eseguita correttamente altrimenti si rischia di inficiare l'analisi a causa della non leggibilità della membrana.

Una volta sparaffinato il campione viene passato in alcool assoluto (per 24 h) e successivamente fatto asciugare. Ad ogni passaggio, per lo stesso motivo indicato prima, i liquidi vengono filtrati su membrane in cellulosa.

Il frammento di tessuto polmonare, dopo essere stato sparaffinato e asciugato, viene successivamente pesato. Si osserva che il campione dopo la sparaffinatura è completamente disidratato e dunque non è necessario determinare rapporto umido/secco; il P_{TS} sottoposto a preparazione è determinato direttamente.

Una volta sparaffinato il campione segue le stesse modalità di preparazione descritte precedentemente ovvero può subire una digestione chimica (*vedi* A5.1.1.3) o un incenerimento mediante inceneritore al plasma di ossigeno (*vedi* A5.1.2.3).

Tutte le membrane dei liquidi utilizzati durante la sparaffinatura verranno lette per il conteggio dei CA e, se presenti, andranno sommati a quelli rilevati durante l'analisi della membrana contenente il campione sparaffinato di tessuto polmonare digerito.

Sulla base di quanto detto precedentemente (*vedi* A4.2.2.) si fa presente che nel caso in cui il campione disponibile per l'analisi sia scarso (come spesso avviene per campioni inclusi in paraffina), è opportuno valutare la necessità di eseguire l'analisi in contraddittorio, poiché la metodica analitica è irrimediabilmente distruttiva.

È opportuno che insieme all'inclusione si invii al laboratorio anche un preparato istologico ottenuto dalla stessa inclusione per ricerca diretta dei CA e verifica del conteggio. Qualora tale sezione istologica non sia disponibile, è opportuno allestirla prima di procedere alla sparaffinatura e reidratazione del tessuto incluso (si esegue una sezione istologica di 3 µm di spessore e la si colora con ematossilina-eosina).

A6. Analisi della membrana al microscopio ottico

Scopo dell'analisi è quello di individuare e contare quei "corpi", identificati come CA, che, in una selezione casuale di campi fissi, cadono all'interno campo di vista.

L'analisi viene condotta in campo chiaro e ad elevati ingrandimenti pari a 400X/500X.

Il campo di vista può essere l'intero campo delimitato dall'obiettivo del microscopio, o una sua parte delimitata da un reticolo circolare tipo reticolo di Walton-Beckett. Al riguardo si precisa che il reticolo di Walton-Beckett a 500 X delimita un campo circolare con un diametro 100 µm; tale circonferenza, benché perfettamente adeguata per il conteggio delle fibre di amianto, risulta invece essere piccola per il conteggio dei corpuscoli dell'asbesto che, essendo fibre di amianto rivestite, presentano dimensioni maggiori (superiore anche ai 100 µm) e sono più facilmente individuabili.

Utilizzando come delimitatore di campo il reticolo di Walton-Beckett, il numero di campi necessari per ottenere un limite di rilevabilità (*Limit of Detection*, LOD) adeguato per l'analisi risulta essere eccessivamente elevato (3) (vedi A7.2).

Si consiglia dunque di predisporre un delimitatore di campo di diametro compreso tra 200 e 300 µm.

È necessario determinare accuratamente l'area effettiva campo di vista, utilizzando un vetrino micrometrico certificato. I campi devono essere scelti casualmente sul filtro senza sovrapposizioni, dunque si consiglia di scegliere i campi di vista seguendo un percorso a greca sul filtro.

L'analisi si conclude quando si contano circa 50 CA, oppure, se non si trovano 50 CA, quando si è letto il numero di campi necessari ad ottenere il limite di rilevabilità desiderato (cfr paragrafo limite di rilevabilità).

Per ogni campo è necessario esplorare bene il campione "agendo sulla messa a fuoco" in modo da focalizzare tutto lo spessore del deposito sul filtro. Al riguardo si precisa che, ad elevato ingrandimento, la profondità di campo è molto piccola (inferiore ad 1 µm), mentre il deposito di campione sulla membrana può essere di diversi micron.

In Figura 1 è mostrata l'importanza della regolazione del fuoco per visualizzare tutti i corpuscoli presenti sul campione: sono mostrati due tipici campi di campioni in cui si osserva che attraverso la regolazione del fuoco si riescono a visualizzare corpuscoli, altrimenti non visibili.

Durante l'analisi viene compilato il resoconto di prova di cui è fornito un esempio in Appendice B2.

Sul resoconto di prova è opportuno annotare:

- identificativo del campione analizzato;
- area effettiva del filtro;
- peso del campione preparato (secco o umido con relativo calcolo per la conversione in peso secco).

Inoltre, sul resoconto di prova durante l'analisi vengono annotati:

- data di esecuzione analisi;
- parametri strumentali di analisi (marca e modello del microscopio utilizzato, ingrandimento di analisi);

- area del singolo campo all'ingrandimento di analisi;
- numero di CA trovati nella rispettiva colonna in base alla identificazione per ogni campo letto in cui si trovano oggetti di rilievo;
- numero dei campi letti;
- firma dell'analista.

I resoconti di preparazione e il resoconto di prova vengono usati per l'emissione del rapporto di prova.

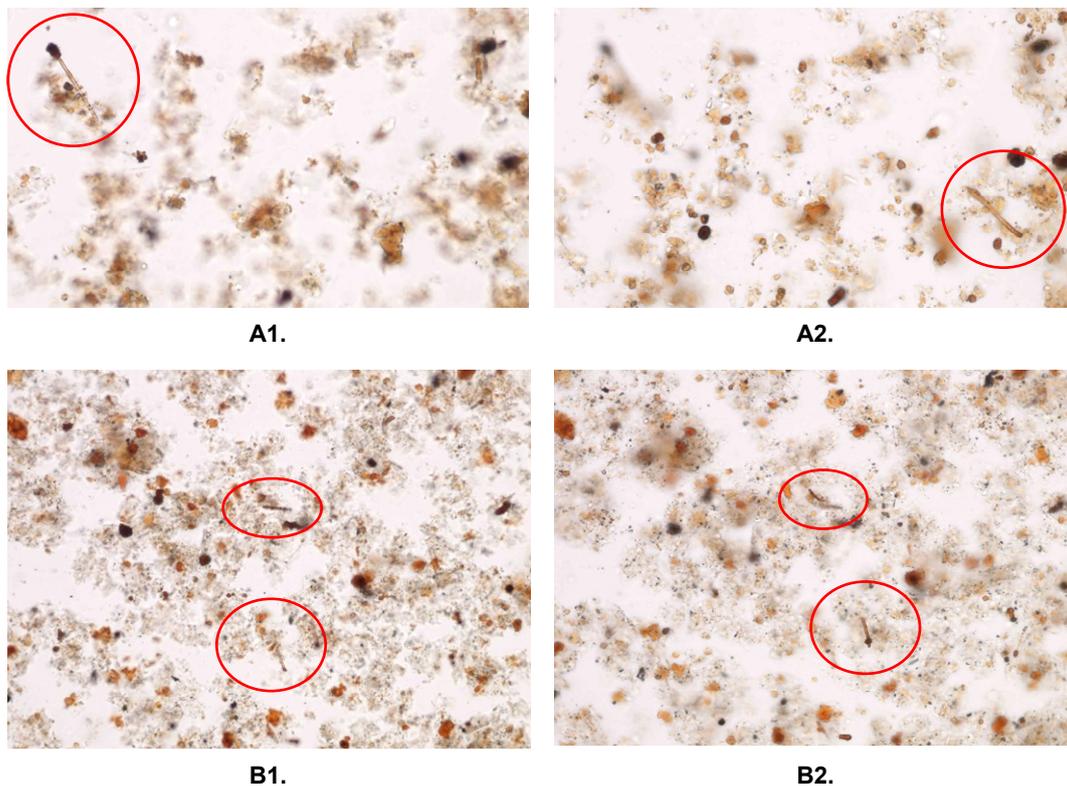


Figura 1. Individuazione dei CA in base alla regolazione del fuoco in due campi di lettura (A e B)

A6.1. Calcoli ed espressione del risultato

La concentrazione di corpuscoli per grammo di tessuto secco viene calcolata dalla formula:

$$C \text{ (corp/g tess s)} = N_{CORP} \times \frac{1}{a \times N_C} \times A \times \frac{1}{P_{TS}}$$

dove:

N_{CORP} è il numero di corpuscoli di asbesto totali trovati nell'analisi,

a è l'area del singolo campo all'ingrandimento di analisi determinata con vetrino micrometrico (in mm^2),

N_C è il numero di campi letti,

A è l'area effettiva di filtrazione sulla membrana che varia a seconda del sistema di filtrazione usato (in mm^2),

P_{TS} è il peso secco del campione sottoposto a preparazione (in g).

Nel caso in cui non vengono trovati corpuscoli durante il procedimento analitico, il risultato dell'analisi sarà dato da:

$$C (\text{corp/g tess s}) < LFS(0) \times \frac{1}{a \times N_C} \times \frac{A}{P_{TS}}$$

dove *LFS* rappresenta il Limite Fiduciario Superiore e per $n = 0$ si avrà un $LFS = 2,99$ (pari al limite superiore dell'intervallo di confidenza del 95% della distribuzione di Poisson).

Nel caso si decida di eseguire la lettura di tutta la membrana, il risultato può essere determinato da:

$$C (\text{corp/g tess s}) = \frac{N_{CORP}}{P_{TS}}$$

Nel caso non si trovino corpuscoli si esprime:

$$C (\text{corp/g tess s}) < \frac{2,99}{P_{TS}}$$

A.7. Qualità del metodo

A7.1. Linearità e campo di misura

Il concetto di linearità non è applicabile.

Gli estremi del campo di misura dipendono dalla quantità di campione sottoposto ad analisi, dal numero di campi letti e dall'area effettiva del filtro.

Il limite inferiore del campo di misura coincide con la sensibilità analitica (*vedi A7.3.*) mentre il limite superiore è determinato ipotizzando di trovare mediamente 10 corpuscoli per campo (numero massimo di corpuscoli contabile in un campo senza errori).

Poiché il campo di applicabilità è inversamente proporzionale al peso di tessuto polmonare depositato sul filtro, nel caso un filtro risulti troppo carico di corpuscoli è opportuno preparare un filtro con una quantità di tessuto polmonare inferiore.

Per l'analisi del tessuto polmonare, il campo di misura è dunque indicativamente:

$$200-20.000.000 \text{ CA/g tess s.}$$

A7.2. Limite di rilevabilità

Il limite di rilevabilità (LOD) dipende dalla quantità di tessuto polmonare depositato su filtro (P_{TS}), dal numero di campi letti e dall'area effettiva del filtro.

Assume dunque un significato teorico, ovvero rappresenta il risultato che avrebbe l'analisi nel caso non vengano trovati corpuscoli nei campi letti.

Viene definito come l'estremo superiore dell'intervallo di confidenza del 95% della distribuzione di Poisson per 0 corpuscoli trovati.

È calcolabile dalla relazione:

$$LOD (\text{corp/g tess s}) = \frac{2,99 \times A}{N_C \times a \times P_{TS}}$$

dove:

a è l'area del singolo campo all'ingrandimento di analisi determinata con vetrino micrometrico (in mm^2),

N_C è il numero di campi letti,

A è l'area effettiva di filtrazione sulla membrana che varia a seconda del sistema di filtrazione usato (in mm^2),

P_{TS} è il peso secco del campione sottoposto a preparazione (in g).

Il LOD può essere abbassato aumentando la superficie di filtro analizzata ($a \times N_C$) o aumentando il tessuto polmonare sottoposto ad analisi (P_{TS}). La quantità di tessuto polmonare preparata per l'analisi tuttavia non può essere aumentata a piacere, perché deve essere tale da non dar luogo ad un filtro troppo carico di particelle e corpuscoli. Essa varia da soggetto a soggetto; in genere 0.5 g di tessuto umido o 0,05 g di tessuto secco sono adeguati per ottenere un filtro analizzabile (5).

Il limite di rilevabilità deve essere inferiore al risultato utile più basso che si ritiene significativo per l'attribuzione dell'esposizione.

Ottimale è avere un LOD pari ad 1/3 del valore da verificare. Importante è indicare sul rapporto di prova il LOD relativo all'analisi eseguita.

A titolo di esempio si forniscono in Tabella A1 i valori di LOD che si ottengono utilizzando diversi delimitatori di campo per un fissato numero di campi letti (area del filtro $A = 210 \text{ mm}^2$ e $P_{TS} \approx 0,05 \text{ g}$)

Tabella A1. Valori di LOD in base al diametro del delimitatore di campo adottato

Ingrandimento 500X Delimitatore di campo	Diametro (μm)	Area del campo di vista (mm^2)	N_C	LOD CA/g tess s
Reticolo di Walton-Beckett	100	0,00785	500	3200
Reticolo da 200 μm	200	0,0314	500	800
Reticolo da 300 μm	300	0,071	250	700
Nessun delimitatore (Campo Intero)	390*	0,1195	200	500

*la dimensione varia da microscopio a microscopio

Si osserva che l'utilizzo di un campo di vista più grande può essere utile nel caso di campioni molto puliti e con un carico di corpuscoli basso o bassissimo.

Se il campione risulta essere particolarmente carico di particelle/CA è consigliabile utilizzare un riduttore di campo con diametro inferiore.

Nel caso in cui si legga tutta la membrana:

$$LOD \text{ (corp/g tess s)} = \frac{2,99}{P_{TS}}$$

A7.3. Sensibilità analitica

La sensibilità analitica (SA) è definita dalla formula:

$$SA \text{ (corp/g tess s)} = \frac{1 \times A}{N_C \times a \times P_{TS}}$$

dove:

a è l'area del singolo campo all'ingrandimento di analisi determinata con vetrino micrometrico (in mm^2),

N_C è il numero di campi letti,

A è l'area effettiva di filtrazione sulla membrana che varia a seconda del sistema di filtrazione usato (in mm^2),

P_{TS} è il peso secco del campione sottoposto a preparazione (in g).

Nel caso in cui si legga tutta la membrana:

$$SA \text{ (corp/g tess s)} = \frac{1}{P_{TS}}$$

A7.4. Ripetibilità stretta

La ripetibilità stretta del metodo è risultata compatibile con la ripetibilità legata al metodo di conteggio di Poisson.

Dunque se N_{CORP} è il numero di corpuscoli contati, la deviazione standard di Poisson è data da:

$$\sqrt{N_{CORP}} .$$

La ripetibilità stretta della metodica analitica è data dunque da:

$$s_c \text{ (corp/g tess s)} = \sqrt{N_{CORP}} \times \frac{1}{a \times N_C} \times A \times \frac{1}{P_{TS}}$$

dove:

N_{CORP} è il numero di corpuscoli trovati nell'analisi,

a è l'area del singolo campo all'ingrandimento di analisi determinata con vetrino micrometrico (in mm^2),

N_C è il numero di campi letti,

A è l'area effettiva di filtrazione sulla membrana che varia a seconda del sistema di filtrazione usato (in mm^2),

P_{TS} è il peso secco del campione sottoposto a preparazione (in g).

A7.5. Esattezza

Poiché non esistono sul mercato campioni di tessuto polmonare in cui è certificato il contenuto di corpuscoli dell'asbesto, il gruppo Biofibre ha realizzato un campione di riferimento che successivamente è stato analizzato da 10 laboratori utilizzando la metodica illustrata.

Il materiale consiste in tessuto polmonare umano, omogeneizzato e liofilizzato.

Per la certificazione del materiale di riferimento si è utilizzata la norma ISO 13528:2005 "Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison" Annex B: "Homogeneity and stability checks of samples" (4).

Il campione di riferimento preparato è risultato omogeneo.

Le tecniche di preparazione con ipoclorito e con plasma di ossigeno sono risultate equivalenti.

A7.6. Incertezza

L'incertezza espressa in termini d'incertezza estesa relativa è stata determinata sperimentalmente.

Dieci laboratori hanno letto 2 volte il campione di riferimento preparato.

Dai risultati delle misure l'incertezza estesa relativa con un fattore di copertura $k = 2$ è data da:

$$\frac{U_C}{C} = 2 \times \sqrt{\left(\frac{\sqrt{N_{CORP}}}{N_{CORP}}\right)^2 + (0,15)^2}$$

Dunque il risultato dell'analisi può essere espresso come:

$$(CA/g \text{ tess s}) = C \pm C \times 2 \times \sqrt{\left(\frac{\sqrt{N_{CORP}}}{N_{CORP}}\right)^2 + (0,15)^2}$$

A8. Informazioni da riportare sul rapporto di prova

Il rapporto di prova deve riportare le seguenti informazioni:

- titolo (es. "Rapporto di prova");
- nome e indirizzo del laboratorio e luogo dove le prove sono state eseguite, se differente dall'indirizzo del laboratorio;
- identificazione univoca del rapporto di prova;
- nome e indirizzo del cliente;
- identificazione del metodo utilizzato;
- ..descrizione e identificazione non ambigua dell'oggetto sottoposto a prova (es. tessuto polmonare relativo al sig.);
- data di ricevimento del campione e caratteristiche del campione (es. conservato in formalina, blocchetto paraffinato, ecc.);
- risultati della prova, con unità di misura, incertezza di misura espressa come indicato nel presente metodo, LOD relativo al campione analizzato;
- nome/i, funzione/i e firma/e o identificazione equivalente della/e persona/e che autorizza/autorizzano l'emissione del rapporto di prova;
- dichiarazione attestante che i risultati si riferiscono solo agli oggetti sottoposti a prova.

A9. Sicurezza: avvertenze e precauzioni

Il metodo richiede l'impiego di sostanze pericolose e pertanto si devono adottare le precauzioni previste dalle schede di sicurezza.

La preparazione del campione deve avvenire singolarmente, in modo da evitare ogni possibile contaminazione.

Nella preparazione delle membrane evitare capovolgimenti o movimenti bruschi tali da turbare la deposizione del materiale sul filtro.

B. METODO ANALITICO: LIQUIDI BIOLOGICI

B1. Scopo e principio del metodo

Questo metodo definisce le modalità di preparazione ed analisi di alcuni liquidi biologici umani per l'analisi quantitativa dei Corpuscoli dell'Asbesto (CA).

Il metodo di analisi può essere utilizzato per il conteggio dei CA in liquidi biologici quali liquidi di lavaggio bronchiolo-alveolare (*Broncho-Alveolar Lavage*, BAL), liquidi da broncoaspirato ed escreato.

Il BAL è il tipo di campione biologico liquido più adeguato a valutare la presenza di CA all'interno del tessuto polmonare (frazione endoalveolare, libera o fagocitata dai macrofagi).

La ricerca dei CA nell'escreato è una metodica che può fornire una serie di informazioni come:

- indicare una esposizione pregressa o recente all'asbesto;
- confermare dei dati clinici e radiologici di sospetto di pneumoconiosi;
- contribuire alla determinazione della causa di pneumoconiosi;
- dare eventuali indicazioni della presenza di cellule neoplastiche.

Queste analisi sono realizzate mediante l'utilizzo di un microscopio ottico e il metodo si basa sul conteggio diretto dei CA.

Il liquido biologico deve essere ripulito dalla componente organica tramite la digestione chimica e il residuo filtrato su membrana in esteri misti di cellulosa.

B1.1. Campo di applicazione

L'analisi deve essere effettuata su campioni di liquido biologico opportunamente conservato. È necessario assicurarsi che il liquido biologico sottoposto ad analisi sia digerito adeguatamente.

Per l'analisi dei corpuscoli nelle matrici liquide non è stato possibile, ad oggi, eseguire la validazione.

B1.2. Campo di misura

L'unità di misura in cui è espresso il risultato è corpuscoli per unità di volume campionata:

CA/mL o corp/mL.

Gli estremi del campo di misura dipendono dalla quantità di campione sottoposta ad analisi, dalla superficie di filtro analizzata e dall'area effettiva del filtro (area di filtrazione).

Il limite inferiore del campo di applicabilità coincide con la sensibilità analitica del metodo (*vedi* B7.3) e si calcola ipotizzando di trovare 1 solo corpuscolo in tutta l'analisi. Il limite inferiore del campo di misura può essere abbassato aumentando la superficie di filtro analizzata.

Il limite superiore è inversamente proporzionale al volume del liquido biologico sottoposto a preparazione. Nel caso in cui il filtro risulti troppo carico di corpuscoli, è opportuno preparare un filtro con una quantità di campione inferiore.

B2. Definizione di corpuscolo dell'asbesto e interferenze

Il CA è costituito da una fibra di amianto ricoperta da un materiale proteico-mucopolisaccaride contenente ferro. Il CA si forma nel tessuto polmonare attraverso un processo di fagocitosi della fibra di amianto per azione dei macrofagi alveolari liberi.

Normalmente i corpuscoli ferruginosi si formano su fibre di amianto di lunghezza superiore a 5 µm (prevalentemente anfiboli), ma possono in generale avere forme e dimensioni estremamente variabili.

Il processo di fagocitosi in generale si può realizzare anche su fibre diverse dalle fibre di asbesto.

In letteratura sono stati segnalati corpuscoli formati su fibre di altra natura come altre fibre inorganiche, fibre vetrose, fibre carboniose, fibre metalliche o fibre vegetali.

I corpuscoli su fibre di talco sono in genere ben distinguibili, e possono essere contati separatamente. In alcuni casi, benché rari, può non essere possibile distinguere i CA da corpuscoli su fibre di altra natura con l'uso del solo microscopio ottico.

Per facilitare l'identificazione dei corpuscoli dell'asbesto è predisposto un atlante di corpuscoli fornito in Appendice A. Per la compilazione dell'atlante è stato utilizzato come riferimento il libro *Pathology of Asbestos-Associated Disease* di Roggli *et al.* (1).

Il testo è stato integrato con immagini originali realizzate sia in microscopia ottica che in microscopia elettronica a scansione.

B3. Accessori e reagenti e strumentazione

B3.1. Accessori

- Becker di vetro o plastica da 100-200 mL;
- Provette tipo falcon da circa 100 mL, o beute con tappo a vite da 100 mL;
- Membrane in esteri misti di cellulosa non retinate da 3 µm o inferiore e diametro 25 mm.

B3.2. Reagenti

- Ipoclorito di sodio;
- Perossido di idrogeno;
- Acqua bidistillata filtrata;
- Triacetato di glicerina;
- Acetone;
- Mezzo di montaggio per microscopia a base di xilolo.

B3.3. Strumentazione

- Cappa flusso laminare;
- Stufa;
- Sistema di filtrazione con pompa aspirante;
- Microscopio ottico binoculare con le seguenti caratteristiche:
 - Illuminazione Kohler;

- Obiettivo acromatico a 40 ingrandimenti, con un'apertura numerica compresa tra 0,65 e 0,70;
- Oculari a compensazione a 10 ingrandimenti o a 12.5 ingrandimenti (per un ingrandimento complessivo di 400-500 X rispettivamente);
- Nel caso in cui si intenda utilizzare per l'analisi un riduttore del campo visivo (tipo reticolo oculare circolare Walton-Beckett), almeno un oculare deve permettere l'inserimento del reticolo ed essere del tipo con messa a fuoco.

B4. Prelievo e conservazione del materiale da inviare al laboratorio di analisi

B4.1. Broncoaspirato

Il materiale viene raccolto durante l'esecuzione della broncoscopia a scopo diagnostico e per la ricerca dei CA e non necessita di alcun trattamento di conservazione.

Sarebbe opportuno che chi esegua il prelievo (il broncoscopista) prelevi le secrezioni tracheo-bronchiali con tecnica "no-touch". In caso di scarsa secrezione, si dovrà intervenire immettendo sterilmente 3-5 mL soluzione fisiologica sterile nel sondino endo-bronchiale, facendo rimuovere, quanto possibile, le secrezioni profonde con colpi di tosse ed aspirando il materiale nel contenitore del set monouso.

Il broncoscopista dovrà suddividere il campione raccolto in due aliquote destinate a:

- servizio di anatomia patologica per la diagnosi citologica e la ricerca di eventuali Ca nel materiale organico;
- laboratorio che effettuerà il conteggio dei CA.

Il materiale dovrà essere inviato subito al laboratorio che esegue l'analisi e nel caso di impossibilità di consegna immediata può essere conservato a temperatura compresa fra i 2 e 4°C considerando che la fase preparativa deve essere effettuata entro una settimana dal prelievo.

B4.2. Lavaggio bronchioloalveolare

Il materiale viene raccolto durante l'esecuzione della broncoscopia a scopo diagnostico e il prelievo dedicato alla ricerca di CA non necessita di alcun trattamento di conservazione.

Sarebbe opportuno eseguire il prelievo di un adeguato volume di soluzione tale da garantire sia un esame citologico (per la verifica della presenza e numero dei macrofagi alveolari) sia l'analisi per la ricerca dei CA.

È opportuno che chi esegua il prelievo (il broncoscopista) prelevi il BAL con tecnica "no-touch" immettendo 10-20 mL di soluzione salina sterile (NaCl 0,9% pH 7) isoterma (35°C) con una siringa applicata esternamente al broncoscopio.

Il materiale (la soluzione) aspirato deve essere raccolto direttamente in due contenitori sterili (provetta o contenitore a bocca larga e tappo a vite).

Metà del volume totale raccolto e che verrà dedicato per la ricerca delle cellule neoplastiche deve essere fissato in 20 mL di etanolo al 96% (a volte vengono tratti a fresco per la conta cellulare e l'immunofenotipizzazione).

L'altra metà, in genere 10 mL, viene inviato al laboratorio per la determinazione dei corpuscoli di asbesto in microscopia ottica e generalmente non risulta fissato.

Il materiale raccolto per l'analisi dei CA, non essendo fissato, dovrà essere inviato subito al laboratorio. Nel caso di impossibilità di consegna immediata può essere conservato a

temperatura compresa fra i 2 e 4°C e considerando che la fase preparativa deve essere effettuata entro una settimana dal prelievo.

B4.3. Escreato/espettorato

Per ottenere un idoneo materiale da analizzare esso dovrà essere correttamente raccolto dal paziente e a tal fine, al momento della consegna dei contenitori, il laboratorio deve fornire idonee istruzioni scritte al paziente.

Il materiale di provenienza salivare non è idoneo alla diagnosi.

La raccolta dell'escreato può consistere in:

- raccolta di tre distinti campioni di escreato spontaneo (da effettuare la mattina) per tre mattine consecutive;
- raccolta di un unico campione di escreato spontaneo (da effettuare la mattina).

Nel primo caso i campioni vengono fissati (contenitori contenente etanolo al 70% e mai meno del 50%) mentre nel secondo caso il materiale non necessita di essere fissato.

La raccolta dovrà essere effettuata prima della colazione e dopo un'accurata igiene del cavo orale (per ridurre la contaminazione con saliva e residui alimentari).

Indurre l'emissione del secreto profondo effettuando profondi colpi di tosse.

Il materiale proveniente dalle basse vie respiratorie deve essere raccolto in contenitori sterili.

La consegna al laboratorio per la ricerca dei CA dovrà avvenire:

- alla fine della raccolta del 3° giorno per la raccolta di tre distinti campioni di escreato ed essendo fissati possono essere tenuti a temperatura ambiente;
- entro le 24 ore nel caso dell'unico prelievo (senza fissativo).

B5. Preparazione del campione per l'analisi dei corpuscoli dell'asbesto

Una volta giunto nel laboratorio che dovrà eseguire questa analisi, il campione dovrà essere opportunamente trattato. Scopo della preparazione del campione è l'eliminazione della parte organica presente nel liquido e l'allestimento di un vetrino con il residuo inorganico per l'analisi in microscopia ottica.

Il campione di liquido biologico subisce quindi un trattamento che ha il fine di distruggere la parte organica del campione stesso tramite una *digestione chimica* in ipoclorito.

La parte inorganica presente come residuo della digestione chimica viene raccolta tramite filtrazione su una membrana in estere di cellulosa non retinata. La membrana viene, a questo punto, processata per l'allestimento del vetrino che verrà letto in microscopia ottica.

Visto che quasi tutte le tipologie di questi campioni risultano giungere in laboratorio non fissati ciò comporta, come detto precedentemente, che i tempi di conservazioni risultano essere brevi. A tal proposito si consiglia di procedere alla fase di preparazione del campione appena questo giunge in laboratorio. Una volta preparato il campione i tempi dell'analisi del vetrino potranno essere anche superiori alla settimana dal prelievo.

Durante la preparazione del campione è opportuno compilare un resoconto di preparazione su cui vengono annotati tutti i passaggi e le fasi fondamentali della preparazione. Al riguardo si fornisce in Appendice B3 un modulo di resoconto di preparazione del campione biologico.

Inoltre, di seguito, si fanno presente alcune considerazioni che possono risultare utili al laboratorio che avrà il compito di effettuare l'analisi:

– *Liquido bronco aspirato*

Il laboratorio, dovendo eseguire sia un l'esame citologico (per ricerca di cellule neoplastiche) sia l'analisi per la ricerca dei CA, necessita di un idoneo volume di campione.

– *BAL*

È opportuno l'allestimento di un preparato di controllo citologico per la verifica della presenza e numero dei macrofagi alveolari oltre al preparato per l'analisi dei CA.

– *Escreato*

Il laboratorio dovrà verificare l'adeguatezza del campione. Questa verifica dovrà essere eseguita sia sul materiale giunto fresco (non fissato) sia per il materiale fissato.

Per il materiale giunto fresco il laboratorio dovrà verificare l'adeguatezza del campione tramite l'allestimento di uno striscio citologico da una da una piccola aliquota del materiale raccolto, cercando la parte più bianca e densa (attenzione a scartare la saliva). L'esame dello striscio (dopo colorazione con Papanicolau oppure anche dopo disidratazione-chiarificazione-montaggio senza colorazione) consente:

- in tutti i casi, la verifica di adeguatezza, provata dalla presenza di un discreto numero di macrofagi alveolari, ben visibili anche senza colorazione per la costante presenza di materiale citoplasmatico fagocitato;
- nei casi con un discreto numero di CA, essi sono ben visibili, soprattutto nei preparati non colorati, per la loro morfologia e la colorazione giallo-oro del loro rivestimento siderinico.

Per il materiale giunto già fissato, per la verifica di adeguatezza del campione, potrà utilizzare il materiale dei 3 contenitori per le seguenti analisi:

- un campione viene utilizzato per la ricerca dei CA in microscopia ottica, dopo digestione chimica in ipoclorito di sodio;
- un campione può essere trattato con la tecnica del Thin Prep oppure incluso dopo citocentrifugazione per l'allestimento di sezioni citologiche su cui eventualmente eseguite indagini istochimiche o immunoistochimiche aggiuntive, per la ricerca di cellule neoplastiche;
- un campione viene generalmente lasciato di riserva per eventuale indagine in microscopia elettronica a scansione (*Scanning Electron Microscopy*, SEM).

B5.1. Digestione chimica della parte organica

Un volume V pari a circa 10 mL di lavaggio broncoalveolare, o 10 mL di broncoaspirato o un volume noto di escreato vengono inseriti in una provetta tipo falcon con tappo a vite. Vengono quindi addizionati 5 mL ipoclorito di sodio al 13% e lasciato agire a temperatura ambiente per 24 ore, avendo cura di agitare alcune volte durante il periodo.

Se si ritiene opportuno, per accelerare l'azione ossidante, è possibile aggiungere, con cautela, alcune gocce di perossido di idrogeno (acqua ossigenata) al preparato facendo molta attenzione agli effetti della reazione e cercando di agitare costantemente la soluzione.

B5.2. Filtrazione

La sospensione viene quindi filtrata su membrana di esteri misti di cellulosa non retinata avente diametro di 25 mm e porosità massima pari a 3 µm.

Per la filtrazione è opportuno utilizzare un sistema in grado da garantire una distribuzione omogenea del residuo di polmone sul filtro. Quindi si consiglia un sistema a sezione circolare

con un diametro effettivo di filtrazione di circa 15-20 mm e coltetto di filtrazione lungo almeno 5 volte il diametro effettivo.

Il filtro viene poi lavato con acqua distillata preriscaldata per eliminare i cristalli di ipoclorito di sodio che si sono formati nel corso della digestione.

Far essiccare la membrana in stufa a circa 60 gradi per 1 ora.

B5.3. Allestimento del preparato per l'analisi in microscopia ottica

Questa fase prevede l'allestimento della membrana in cellulosa (su cui si sono depositati gli eventuali CA) sul vetrino per poter essere successivamente analizzato.

Dopo la filtrazione, la membrana viene fatta asciugare e successivamente ridotta tramite bisturi in modo tale da ottenere due metà di filtro. Una parte viene conservata mentre l'altra metà verrà sottoposta ad analisi.

La membrana, per poter essere osservata al microscopio in luce trasmessa, dovrà essere per prima cosa chiarificata e questo può avvenire principalmente con 2 tecniche:

- utilizzando i vapori di acetone (tramite l'impiego di un diafanizzatore);
- utilizzando un mezzo di montaggio per microscopia a base di xilolo con indice di rifrazione (nD20) compreso fra 1,4 e 1,5.

Se si è utilizzata la tecnica dei vapori di acetone si dovrà procedere con l'aggiunta di 2/3 gocce di un liquido di contrasto come la triacetina (triacetato di glicerina) con nD20 pari a circa 1,43. Successivamente il tutto viene coperto con il vetrino copri-oggetto.

Se per chiarificare la membrana si è utilizzato un mezzo di montaggio per microscopia a base di xilolo si dovrà procedere a coprire successivamente il preparato con il vetrino copri-oggetto.

B6. Analisi al microscopio ottico

L'analisi della membrana è eseguita con le stesse modalità descritte per l'analisi del tessuto polmonare umano ed indicate al paragrafo A6.

B6.1. Calcoli ed espressione del risultato

La concentrazione di corpuscoli per unità di volume campionata è data da:

$$C \text{ (corp/mL)} = N_{CORP} \times \frac{1}{a \times N_C} \times A \times \frac{1}{V}$$

dove:

N_{CORP} è il numero di corpuscoli trovati nell'analisi,

a è l'area del singolo campo all'ingrandimento di analisi determinata con vetrino micrometrico (in mm^2),

N_C è il numero di campi letti,

A è l'area effettiva di filtrazione sulla membrana che varia a seconda del sistema di filtrazione utilizzato (in mm^2),

V è il volume di liquido sottoposto ad analisi (in mL).

Nel caso in cui non vengono trovati corpuscoli durante il procedimento analitico, il risultato dell'analisi sarà dato da:

$$C (\text{corp/mL}) < LFS(0) \times \frac{1}{a \times N_C} \times \frac{A}{V}$$

dove *LFS* rappresenta il Limite Fiduciario Superiore e per $n = 0$ si avrà un $LFS = 2,99$ (pari al limite superiore dell'intervallo di confidenza del 95% della distribuzione di Poisson).

Nel caso si decida di eseguire la lettura di tutta la membrana, il risultato può essere determinato da:

$$C (\text{corp/mL}) = \frac{N_{CORP}}{V}$$

Nel caso non si trovino corpuscoli si esprime:

$$C (\text{corp/mL}) < \frac{2,99}{V}$$

B7. Qualità del metodo

B7.1. Linearità e campo di misura

Il concetto di linearità non è applicabile.

Gli estremi del campo di misura dipendono dal volume di campione sottoposto ad analisi, dal numero di campi letti e dall'area effettiva del filtro.

Il limite inferiore del campo di applicabilità coincide con la sensibilità analitica (*vedi* B7.3.).

B7.2. Limite di rilevabilità

Il limite di rilevabilità (LOD) dipende dalla quantità di liquido depositato su filtro, dal numero di campi letti e dall'area effettiva del filtro.

Assume dunque un significato teorico, ovvero rappresenta il risultato che avrebbe l'analisi nel caso non vengano trovati corpuscoli nei campi letti.

Viene definito come l'estremo superiore dell'intervallo di confidenza del 95% della distribuzione di Poisson per 0 (zero) corpuscoli trovati.

È calcolabile dalla relazione:

$$LOD (\text{corp/mL}) = \frac{2,99 \times A}{N_C \times a \times V}$$

dove:

a è l'area del singolo campo all'ingrandimento di analisi determinata con vetrino micrometrico (in mm^2),

N_C è il numero di campi letti,

A è l'area effettiva di filtrazione sulla membrana che varia a seconda del sistema di filtrazione utilizzato (in mm^2),

V è il volume di liquido sottoposto ad analisi (in *mL*)

Se necessario, aumentando il numero di campi letti (N_C), può essere abbassato il limite di rilevabilità.

Il limite di rilevabilità deve essere inferiore al risultato utile più basso che si ritiene significativo per l'attribuzione dell'esposizione.

Ottimale è avere un LOD pari ad 1/3 del valore da verificare. Importante è indicare sul rapporto di prova il LOD relativo all'analisi eseguita.

Nel caso in cui si legga tutta la membrana:

$$LOD (corp/mL) = \frac{2,99}{V}$$

B7.3. Sensibilità analitica

La sensibilità analitica (SA) è definita dalla formula:

$$SA (corp/mL) = \frac{1 \times A}{N_C \times a \times V}$$

dove:

a è l'area del singolo campo all'ingrandimento di analisi determinata con vetrino micrometrico (in mm^2),

N_C è il numero di campi letti,

A è l'area effettiva di filtrazione sulla membrana che varia a seconda del sistema di filtrazione utilizzato (in mm^2),

V è il volume di liquido sottoposto ad analisi (in mL).

Nel caso in cui si legga tutta la membrana:

$$SA (corp/mL) = \frac{1}{V}$$

B7.4. Ripetibilità stretta

La ripetibilità stretta della metodica analitica è data da:

$$s_c (corp/mL) = \sqrt{N_{CORP}} \times \frac{1}{a \times N_C} \times A \times \frac{1}{V}$$

dove:

N_{CORP} è il numero di corpuscoli trovati nell'analisi,

a è l'area del singolo campo all'ingrandimento di analisi determinata con vetrino micrometrico (in mm^2),

N_C è il numero di campi letti,

A è l'area effettiva di filtrazione sulla membrana che varia a seconda del sistema di filtrazione utilizzato (in mm^2),

V è il volume di liquido sottoposto ad analisi (in mL).

La ripetibilità stretta dipende dal numero di corpuscoli trovati nell'analisi e coincide con la incertezza statistica (Poisson) legata al metodo di conteggio.

B7.5. Incertezza

Non è stato possibile realizzare un materiale di riferimento per l'analisi dei corpuscoli in liquidi biologici, poiché non è possibile reperire materiale in quantitativo sufficiente.

L'incertezza espressa in termini di incertezza estesa relativa è derivata da quella determinata sperimentalmente per l'analisi dei CA nel tessuto polmonare.

Questo è possibile perché:

- In prima approssimazione la componente all'incertezza legata alla determinazione del volume sottoposto ad analisi è equivalente alla componente legata alla determinazione del peso di tessuto polmonare sottoposto ad analisi.
- Entrambe queste componenti sono trascurabili rispetto alla componente statistica legata al metodo di conteggio (Poisson) e alla componente interoperatore.

L'incertezza estesa relativa con un fattore di copertura $k = 2$ è data da:

$$\frac{U_C}{C} = 2 \times \sqrt{\left(\frac{\sqrt{N_{CORP}}}{N_{CORP}}\right)^2 + (0,15)^2}$$

Dunque il risultato dell'analisi può essere espresso come:

$$(CA/mL) = C \pm C \times 2 \times \sqrt{\left(\frac{\sqrt{N_{CORP}}}{N_{CORP}}\right)^2 + (0,15)^2}$$

B8. Informazioni da riportare sul rapporto di prova

Il rapporto di prova deve riportare le seguenti informazioni:

- titolo (es. "Rapporto di prova");
- nome e indirizzo del laboratorio e luogo dove le prove sono state eseguite, se differente dall'indirizzo del laboratorio;
- identificazione univoca del rapporto di prova;
- nome e indirizzo del cliente;
- identificazione del metodo utilizzato;
- descrizione e identificazione non ambigua dell'oggetto sottoposto a prova (es. tessuto polmonare relativo al sig.);
- data di ricevimento del campione e caratteristiche del campione;
- risultati della prova, con unità di misura, incertezza di misura espressa come indicato nel presente metodo, LOD relativo al campione analizzato;
- nome/i, funzione/i e firma/e o identificazione equivalente della/e persona/e che autorizza/autorizzano l'emissione del rapporto di prova;
- dichiarazione attestante che i risultati si riferiscono solo agli oggetti sottoposti a prova.

B9. Sicurezza: avvertenze e precauzioni

Il metodo richiede l'impiego di sostanze pericolose e pertanto si devono adottare le precauzioni previste dalle schede di sicurezza.

La preparazione del campione deve avvenire singolarmente, in modo da evitare ogni possibile contaminazione.

Nella preparazione delle membrane evitare capovolgimenti o movimenti bruschi tali da turbare la deposizione del materiale sul filtro.

BIBLIOGRAFIA

1. Roggli VL, Oury TD, Sporn TA. *Pathology of asbestos-associated disease*. 2nd edition. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2004.
2. Consiglio Superiore di Sanità. *Linee guida tracciabilità, raccolta, trasporto, conservazione e archiviazione di cellule e tessuti per indagini diagnostiche di anatomia patologica*. Roma: Ministero della Salute; 2015.
3. Vainio H, Oksa P, Tuomi T, Vehmas T, Wolff H. Helsinki Criteria update 2014: asbestos continues to be a challenge for disease prevention and attribution. *Epidemiol Prev* 2016;40(1 Suppl 1):15-9.
4. ISO 13528:2005. *Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison. Annex B: Homogeneity and stability checks of samples*. Geneva: International Organization for Standardization; 2005.
5. ISO 14966:2002. *Ambient air – Determination of numerical concentration of inorganic fibrous particles – Scanning electron microscopy method*. Geneva: International Organization for Standardization; 2002.

APPENDICE A
Atlante di immagini di corpuscoli dell'asbesto

A1. Corpuscoli dell'asbesto certi

CORE

Composizione

- 96% anfibolo commerciale
- 2% crisotilo
- 2% anfibolo non commerciale*

Caratteristiche

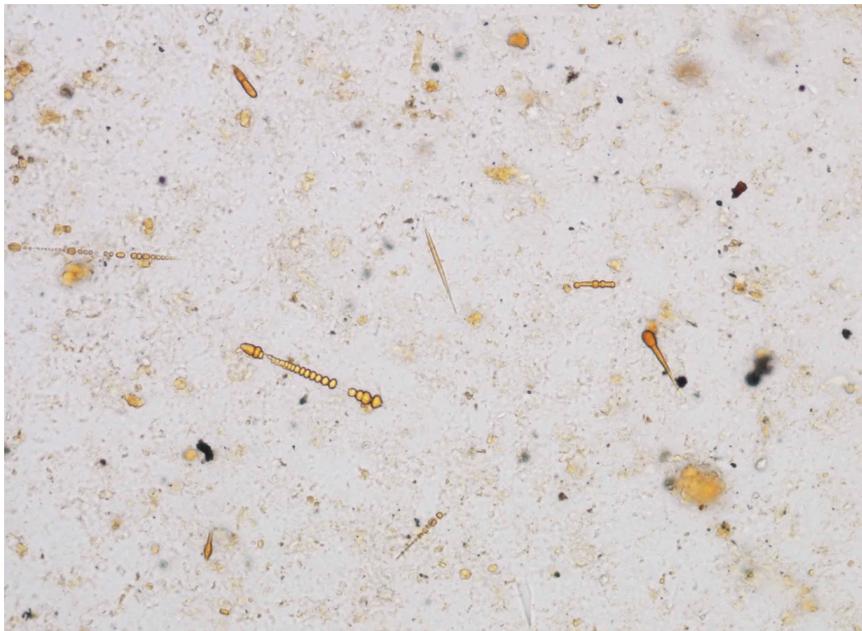
- Fibra interna ben visibile, sottile
- Fibra chiara in campo chiaro
- Fibra scura in contrasto di fase
- diametro della fibra regolare con possibilità di divisione in fibrille sugli estremi
- lunghezza fibra da alcuni μm in su
- larghezza fibra da 0,2 μm in su

RIVESTIMENTO

- colore oro/arancio/marrone
- a margini regolari
- frammentato (a tratti la fibra non è rivestita)
- simmetrico lungo l'asse longitudinale della fibra
- talvolta presente solo su uno dei due estremi della fibra
- talvolta a collana

* Roggli VL, Oury TD, Sporn TA. *Pathology of asbestos-associated disease*. 2nd edition. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2004

Corpuscoli dell'asbesto in microscopia ottica



Il colore dei corpuscoli può variare dal giallo chiaro al rosso mattonne.

Il rivestimento può apparire frammentato.

In genere il rivestimento presenta margini regolari lisci ed è tendenzialmente simmetrico lungo l'asse longitudinale della fibra.



La lunghezza varia da alcuni μm a diverse centinaia di μm .

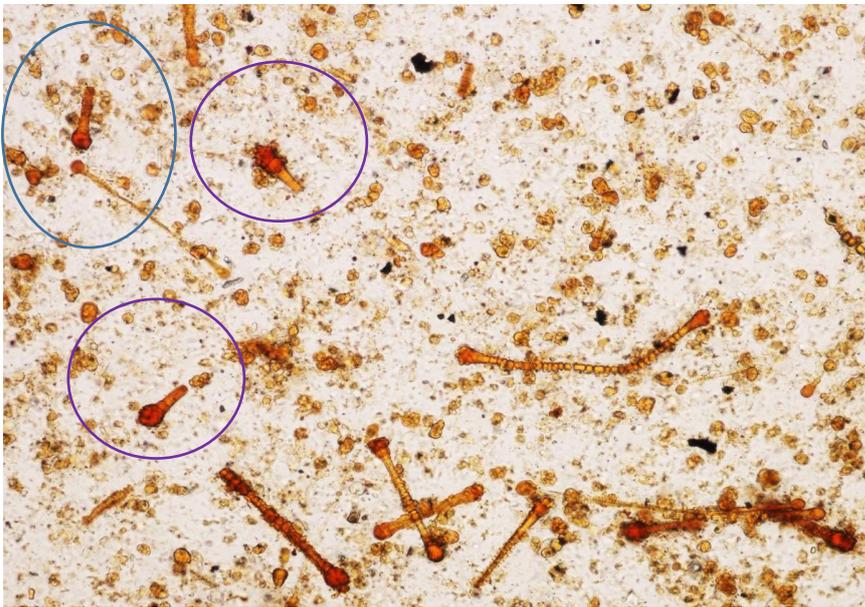
Il rivestimento può essere solo su un estremo della fibra

La fibra interna appare chiara in campo chiaro o appena visibile sfocchettando.

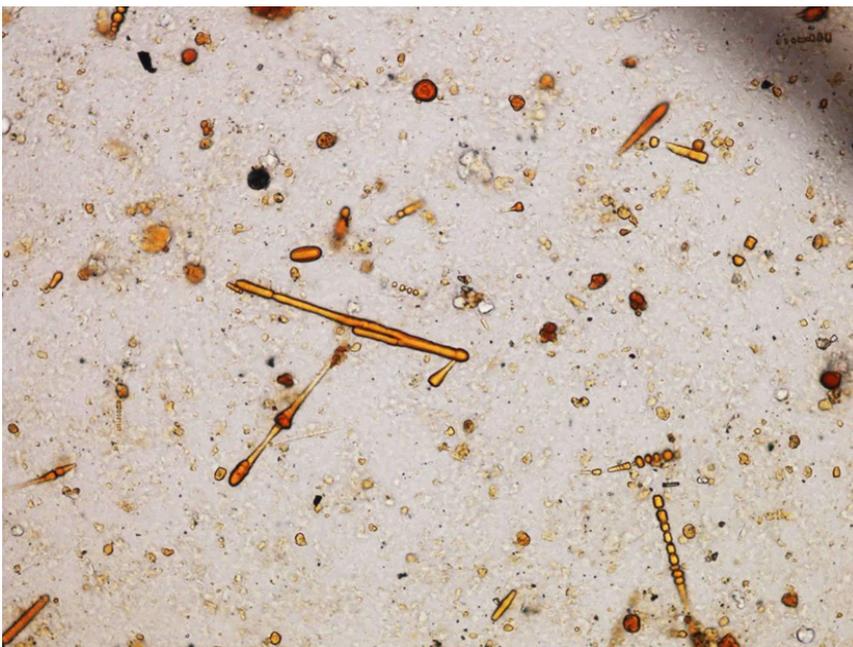
segue

continua

Corpuscoli dell'asbesto in microscopia ottica



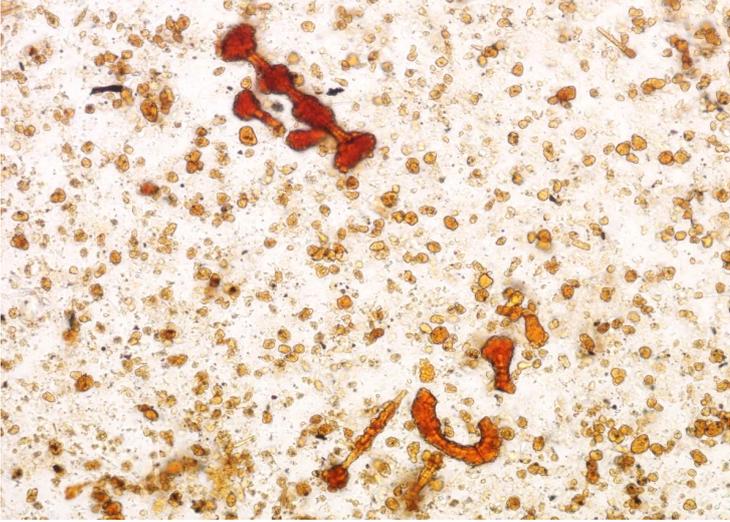
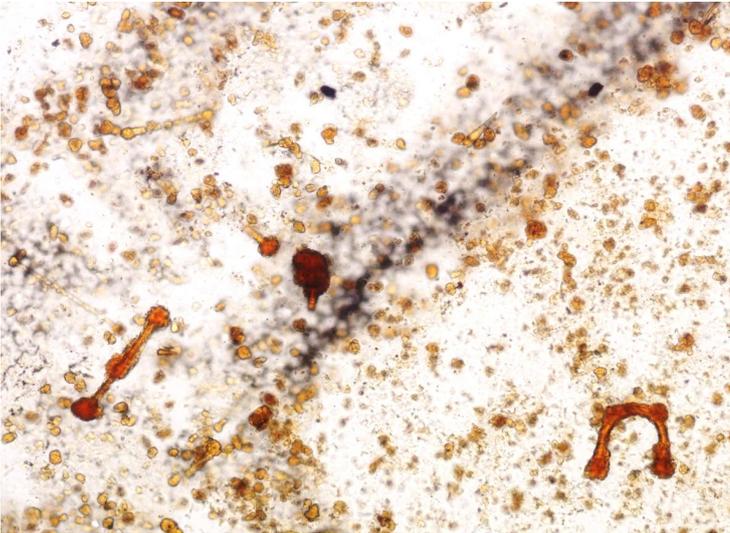
I corpuscoli dell'asbesto possono presentarsi come frammenti.



I corpuscoli dell'asbesto possono presentarsi interamente rivestiti o con il tipico rivestimento a collana.

segue

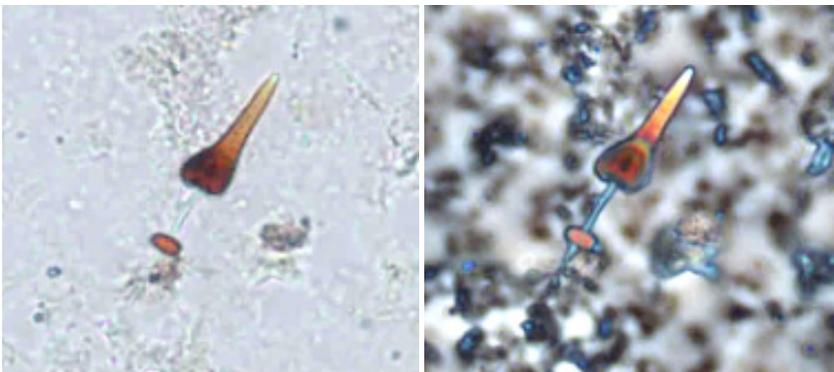
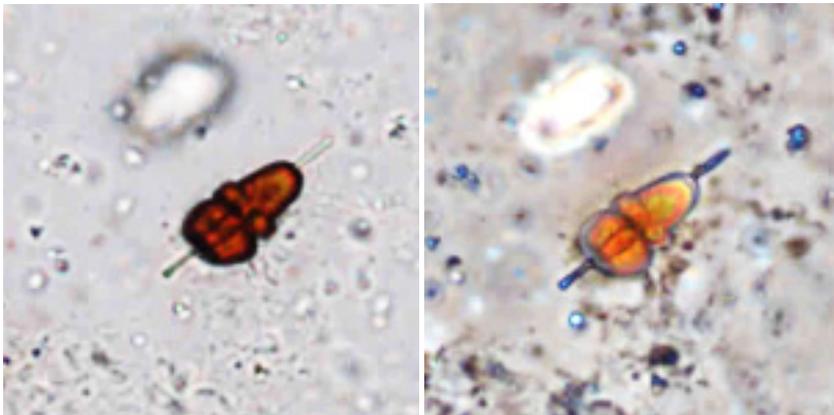
continua

Corpuscoli dell'asbesto in microscopia ottica	
	<p>I corpuscoli dell'asbesto possono presentare addensamenti sferoidali di materiale ferruginoso sia agli estremi che lungo l'estensione della fibra.</p> <p>Questi addensamenti normalmente si presentano frastagliati.</p>
	<p>I corpuscoli dell'asbesto possono presentare forme curvilinee, circolari.</p>
	<p>Questi addensamenti normalmente si presentano frastagliati.</p>

segue

continua

Corpuscoli dell'asbesto in microscopia ottica

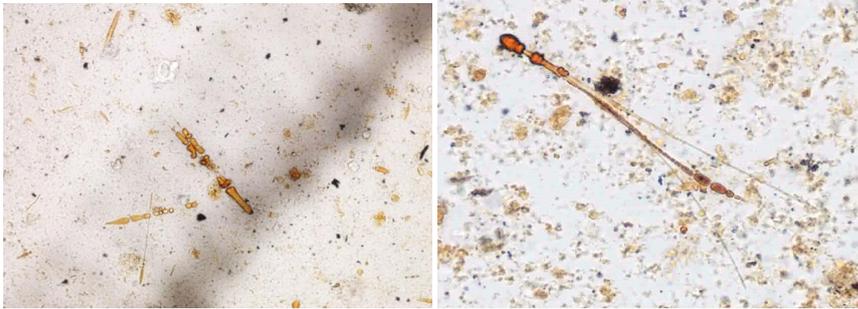


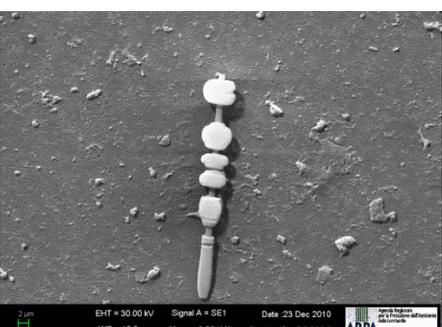
La fibra di amianto contenuta nel corpuscolo appare chiara in campo chiaro e scura nell'osservazione con contrasto di fase.

L'osservazione in contrasto di fase può aiutare a individuare la fibra contenuta nel corpuscolo.

segue

continua

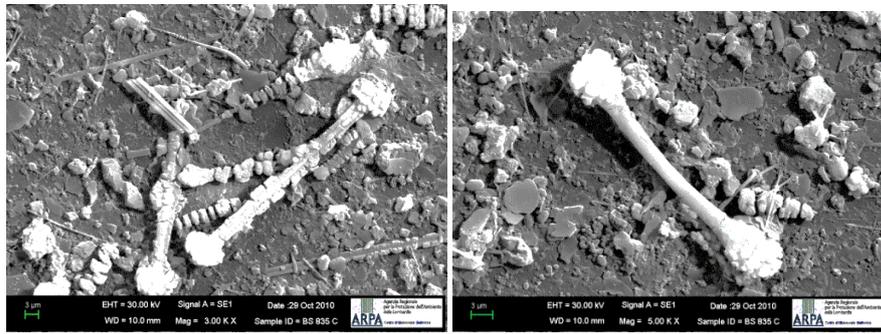
Corpuscoli dell'asbesto in microscopia ottica	
	<p>Nei corpuscoli dell'asbesto il diametro della fibra è regolare con possibilità di divisione in fibrille sugli estremi.</p> <p>Nel conteggio è da considerarsi un unico corpuscolo dell'asbesto.</p>
	<p>I corpuscoli dell'asbesto possono presentarsi danneggiati.</p> <p>Tuttavia deve risultare sempre visibile la fibra interna.</p>

<p align="center">Corpuscoli dell'asbesto in microscopia elettronica a scansione</p>		
 <p>2 μm EHT = 20.00 kV Signal A = SE1 Date: 14 Feb 2008 WD = 12.0 mm Mag = 9.00 K X Sample ID = BS 479B ARPA</p>	 <p>1 μm EHT = 20.00 kV Signal A = SE1 Date: 20 Jun 2012 WD = 9.0 mm Mag = 12.00 K X Sample ID = CP 1312 C ARPA</p>	<p>Possano presentarsi come apparenti frammenti.</p> <p>I corpuscoli possono presentare il rivestimento ferruginoso solo su uno degli estremi della fibra.</p>
 <p>1 μm EHT = 30.00 kV Signal A = SE1 Date: 28 Jun 2012 WD = 12.0 mm Mag = 12.00 K X Sample ID = CP 1214 D ARPA</p>	 <p>1 μm EHT = 20.00 kV Signal A = SE1 Date: 26 Nov 2010 WD = 9.5 mm Mag = 11.00 K X Sample ID = BS 833 B 1 ARPA</p>	<p>Possano avere forme estremamente bizzarre.</p>
 <p>2 μm EHT = 30.00 kV Signal A = SE1 Date: 23 Dec 2010 WD = 10.0 mm Mag = 3.50 K X Sample ID = BS 838 C ARPA</p>	 <p>1 μm EHT = 20.00 kV Signal A = SE1 Date: 14 Mar 2008 WD = 10.0 mm Mag = 10.00 K X Sample ID = CP 1610a 1 ARPA</p>	<p>I corpuscoli dell'asbesto possono presentarsi interamente rivestiti o con il tipico rivestimento a collana.</p>
 <p>1 μm EHT = 30.00 kV Signal A = SE1 Date: 21 Oct 2010 WD = 9.5 mm Mag = 12.00 K X Sample ID = BS 829 c ARPA</p>	 <p>10 μm EHT = 30.00 kV Signal A = SE1 Date: 25 Jan 2011 WD = 10.0 mm Mag = 2.00 K X Sample ID = BS 844 A ARPA</p>	<p>I corpuscoli dell'asbesto possono presentare una forma a fuso.</p>

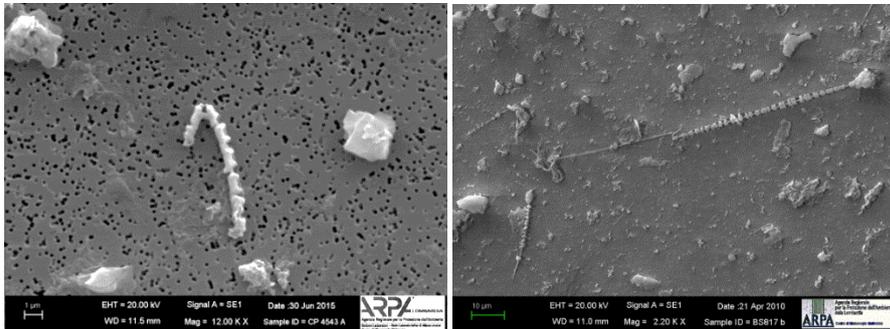
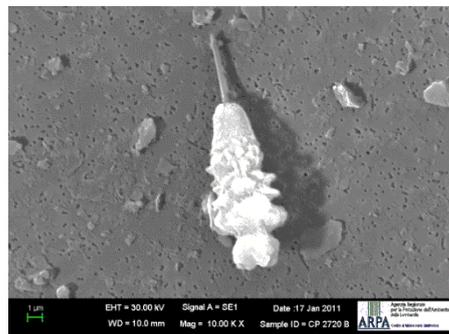
segue

continua

Corpuscoli dell'asbesto in microscopia elettronica a scansione



I corpuscoli dell'asbesto possono presentare addensamenti sferoidali di materiale ferruginoso sia agli estremi che lungo l'estensione della fibra.

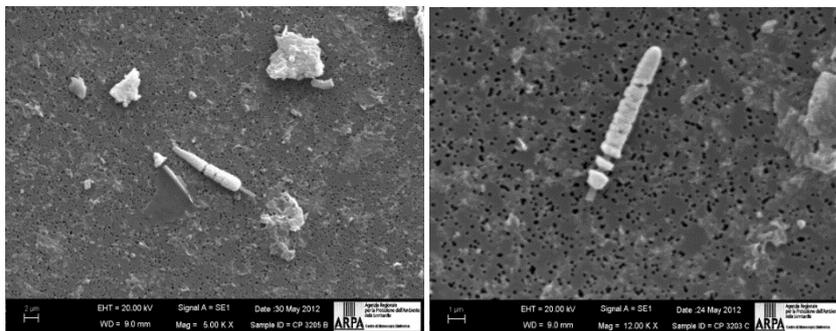
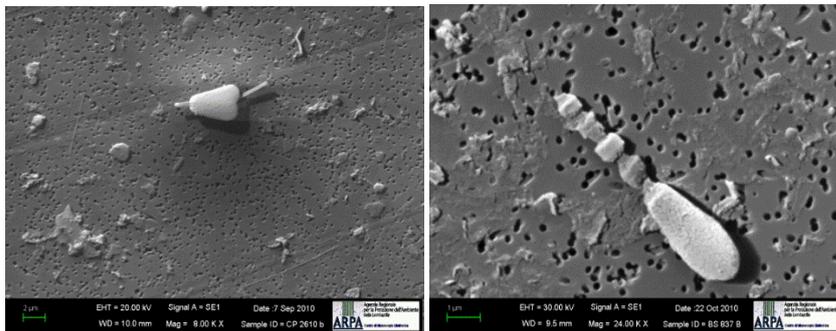
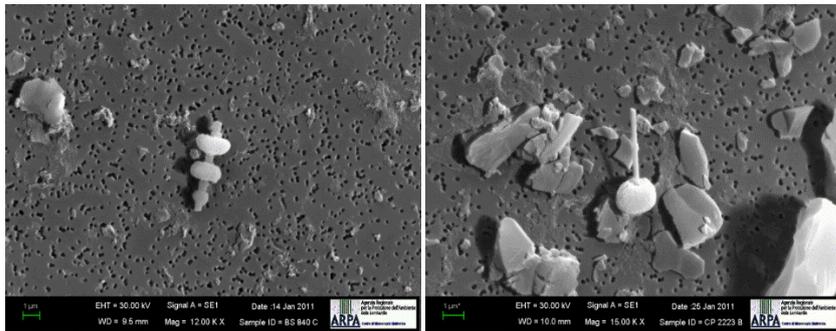
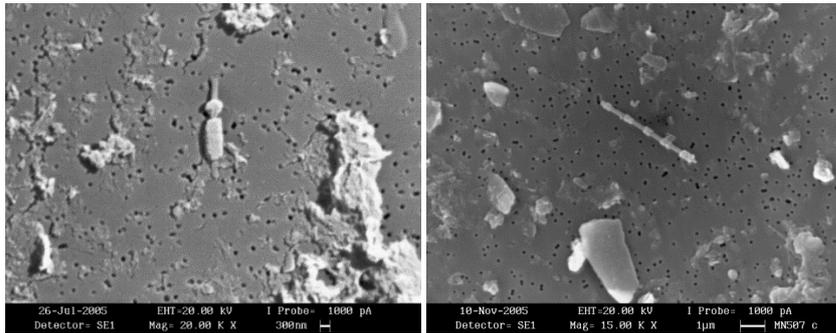


Corpuscolo curvo su fibra spezzata

segue

continua

Corpuscoli dell'asbesto in microscopia elettronica a scansione



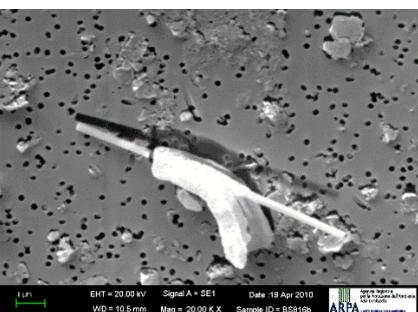
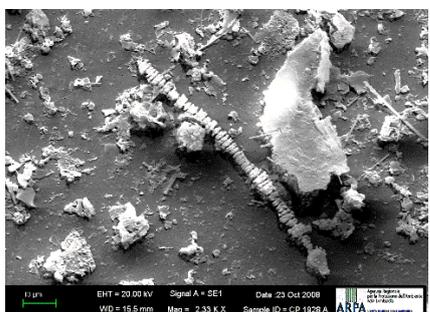
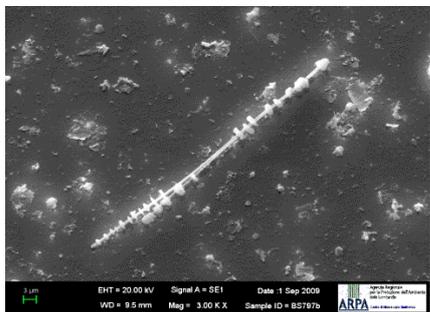
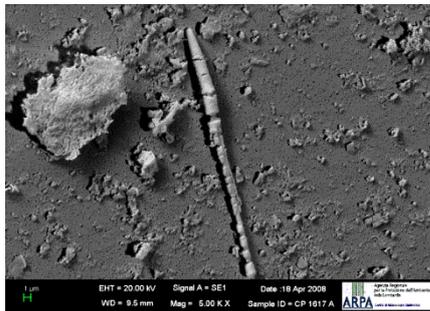
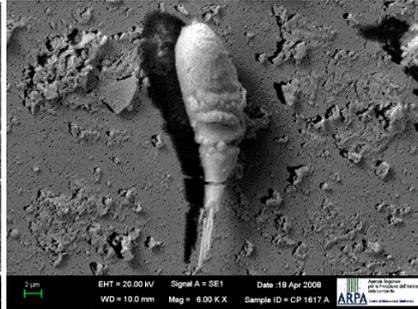
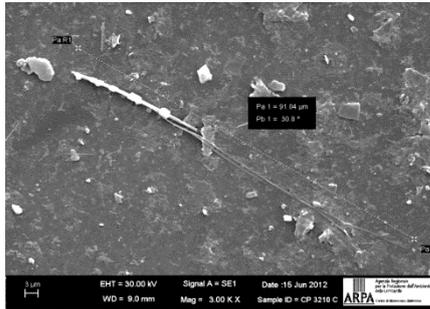
Immagini in microscopia elettronica a scansione di corpuscoli dell'asbesto di dimensioni molto piccole.

Per vedere in microscopia ottica corpuscoli così piccoli è necessario effettuare l'osservazione a un ingrandimento elevato: 400 -500X.

segue

continua

Corpuscoli dell'asbesto in microscopia elettronica a scansione



Il diametro della fibra è sempre regolare con possibilità di divisione in fibrille soprattutto sugli estremi.

I corpuscoli dell'asbesto possono presentarsi danneggiati.

Tuttavia deve risultare sempre visibile la fibra interna.

A2. Corpuscoli dell'asbesto probabili

CORE

Composizione

- 96% anfibolo commerciale
- 2% crisotilo
- 2% anfibolo non commerciale*

Caratteristiche

- fibra interamente inglobata nel materiale ferruginoso
- fibra non visibile chiaramente (si intravede internamente al cuore ferruginoso sfocchettando)

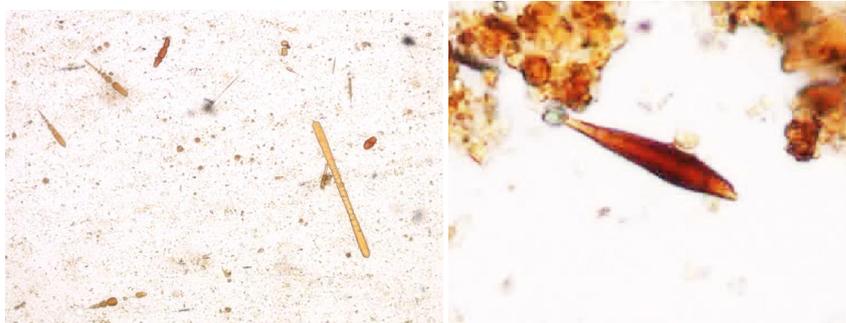
RIVESTIMENTO

Caratteristiche

- oro/arancio/marrone
- a margini regolari
- frammentato (a tratti la fibra non è rivestita)
- simmetrico lungo l'asse longitudinale della fibra

* Roggli VL, Oury TD, Sporn TA. *Pathology of asbestos-associated disease*. 2nd edition. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2004

Corpuscoli dell'asbesto in microscopia ottica



La fibra è interamente inglobata nel materiale ferruginoso.

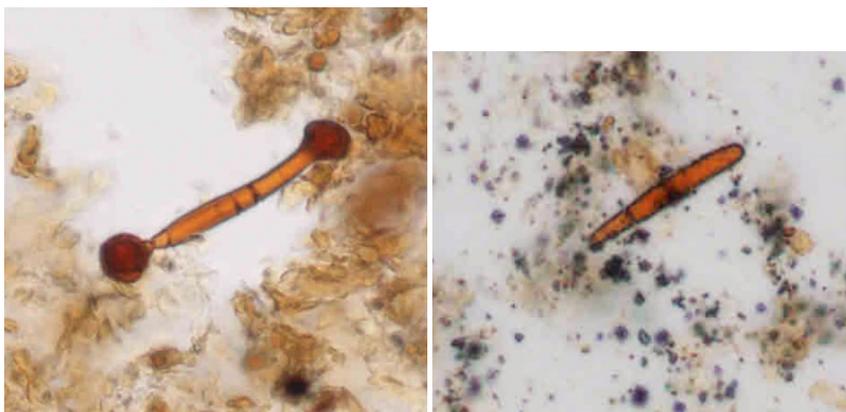
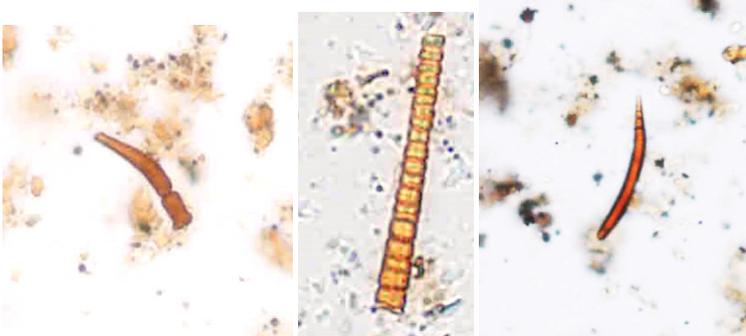


Non è sempre facilmente visibile, ma di solito si intravede internamente al cuore ferruginoso di rivestimento, sfocchettando.

segue

continua

Corpuscoli dell'asbesto in microscopia ottica



La fibra è interamente inglobata nel materiale ferruginoso.

Non è sempre facilmente visibile, ma di solito si intravede internamente al core ferruginoso di rivestimento, sfocchettando.

A3. Corpuscoli non asbesto su fibra o particella di talco

CORE

Composizione

- Fogli di silicati quali talco, mica o kaolinite
- Diatomee

Caratteristiche

- Fibra chiara di colore giallo chiaro
- Forma irregolare con aspect-ratio basso
- Forma rettangolare irregolare che non corrisponde alla definizione di fibra
- Frammento di diatomea riconoscibile dalle strutture rotondeggianti regolari interne
- Forma non fibrosa (particella irregolare)

RIVESTIMENTO

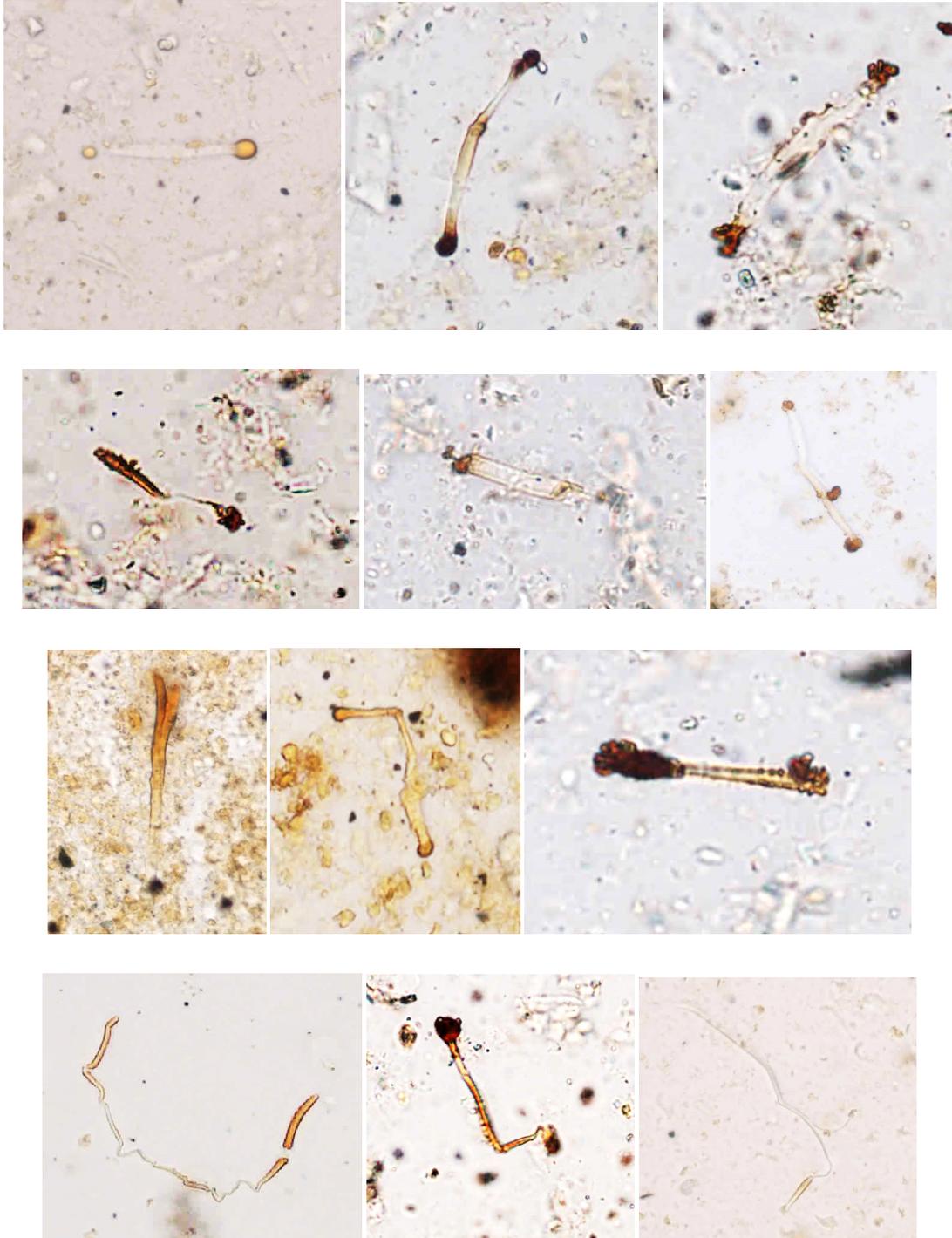
Caratteristiche

- colore oro/arancio/marrone
- forma molto irregolare
- struttura piatta con irregolarità
- rivestimento sparso
- rivestimento a tratti asimmetrico lungo l'asse longitudinale della fibra

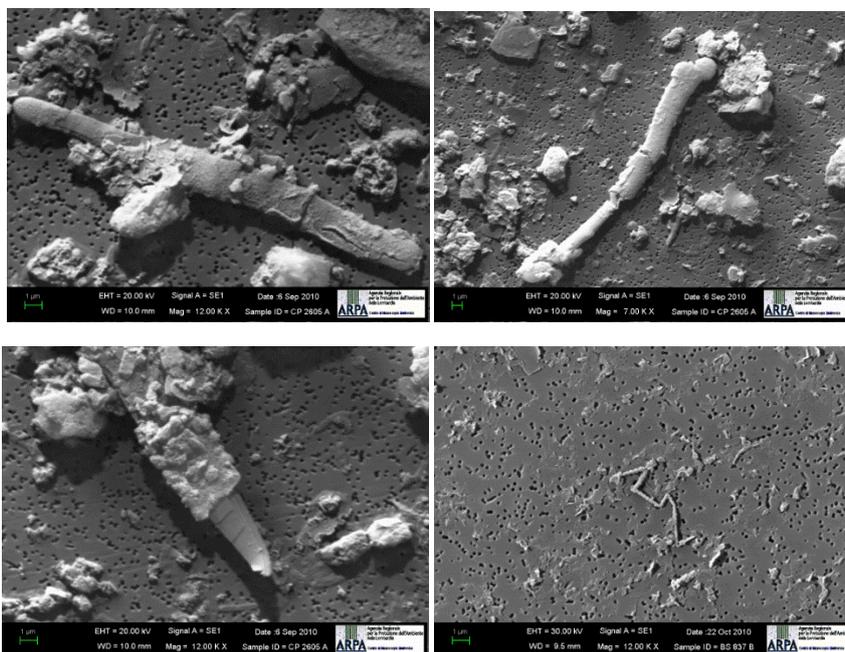
NB: Se la fibra interna è dritta e molto sottile diventano molto simili ai corpuscoli dell'asbesto e non sono distinguibili in microscopia ottica (estremamente raro).

Da notare che le fibre di talco spesso presentano spigoli netti e struttura a nastri sovrapposti evidenziabili in microscopia elettronica.

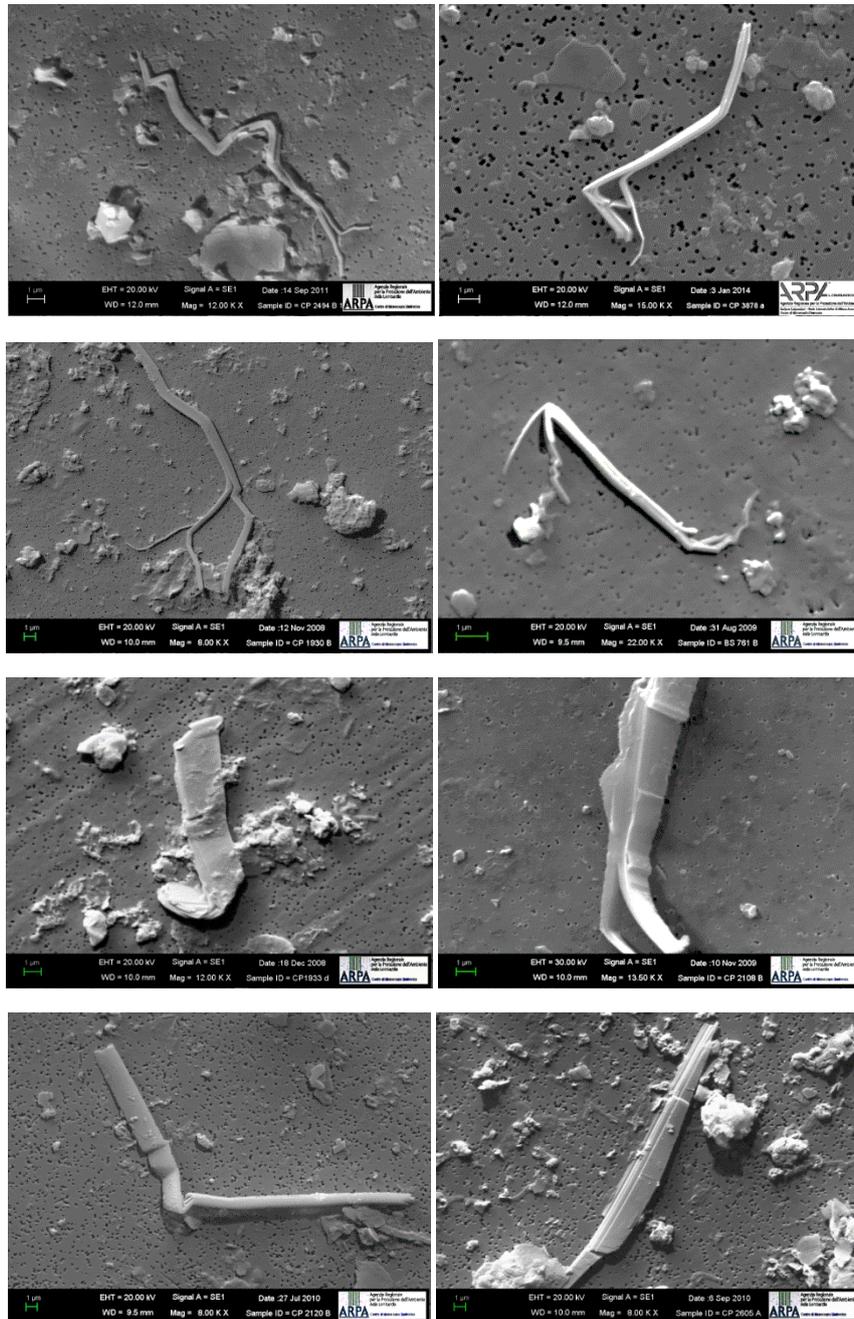
Corpuscoli ferruginosi su fibra di talco in microscopia ottica



Corpuscoli ferruginosi su fibra di talco al microscopio elettronico a scansione



Fibre di talco al microscopio elettronico a scansione



A4. Corpuscoli non asbesto con fibra/particella interna visibile

PRODOTTI DAGLI OSSIDI

CORE

Composizione

- Ossido di Ti
- Ossido di Al
- Ossido di Fe
- Ossido di Cr

Caratteristiche

- fibra scura (da marrone scuro a nera)
- talvolta diametro leggermente superiore a quello dell'asbesto

RIVESTIMENTO

Caratteristiche

- Colore oro/arancio/marrone
- A margini regolari per fibre di ossidi di metalli con rivestimento simmetrico lungo l'asse longitudinale della fibra
- Possibili angoli spezzati

PRODOTTI DAL CARBONE

CORE

Composizione

- Carbone (frequente nei minatori)*

Caratteristiche

- fibra scura (da marrone scuro a nera)
- diametro leggermente superiore a quello dell'asbesto

RIVESTIMENTO

Caratteristiche

- Colore oro/arancio/marrone
- irregolare e asimmetrico lungo l'asse longitudinale della fibra per fibre carboniose

* Roggli VL, Oury TD, Sporn TA. *Pathology of asbestos-associated disease*. 2nd edition. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2004

PRODOTTI DA PARTICELLE METALLICHE E CARBONIOSE

CORE

Composizione

- particelle metalliche e carboniose

Caratteristiche

- particella

RIVESTIMENTO

Caratteristiche

- Colore oro/arancio/marrone
- irregolare

PRODOTTI DA DIATOMEA

CORE

Composizione

- diatomea

Caratteristiche

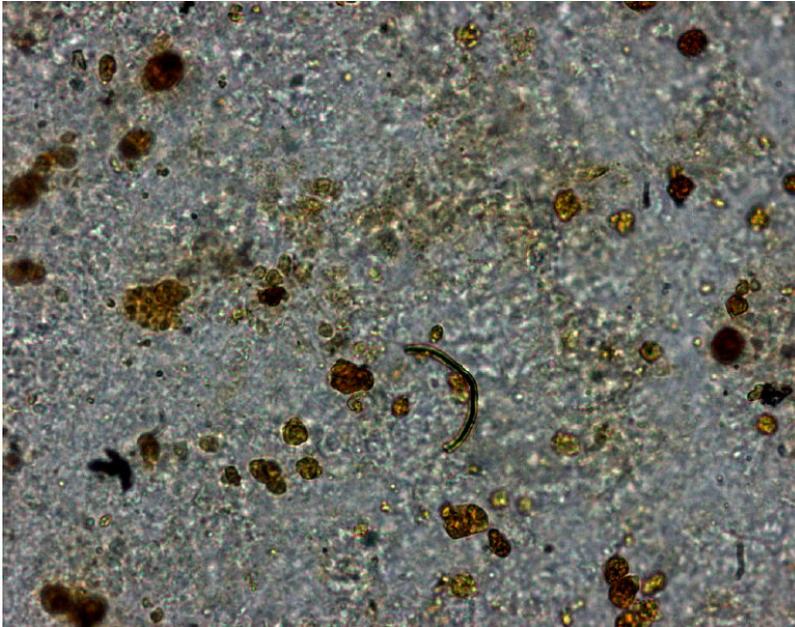
- struttura silicea di dimensioni di diversi micron

RIVESTIMENTO

Caratteristiche

- Colore oro/arancio/marrone
- irregolare

Corpuscoli ferruginosi in microscopia ottica



Corpuscolo ferruginoso su fibra verosimilmente di carbone.

Si osserva la fibra scura, i margini irregolari e l'assenza di simmetria longitudinale nel rivestimento ferruginoso.

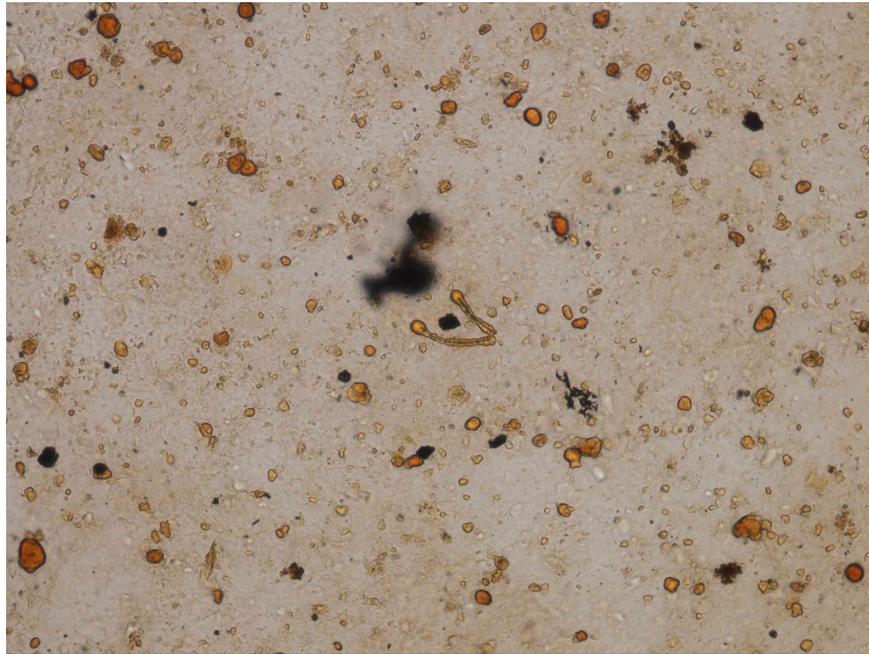


Corpuscolo ferruginoso su verosimile frammento di diatomea

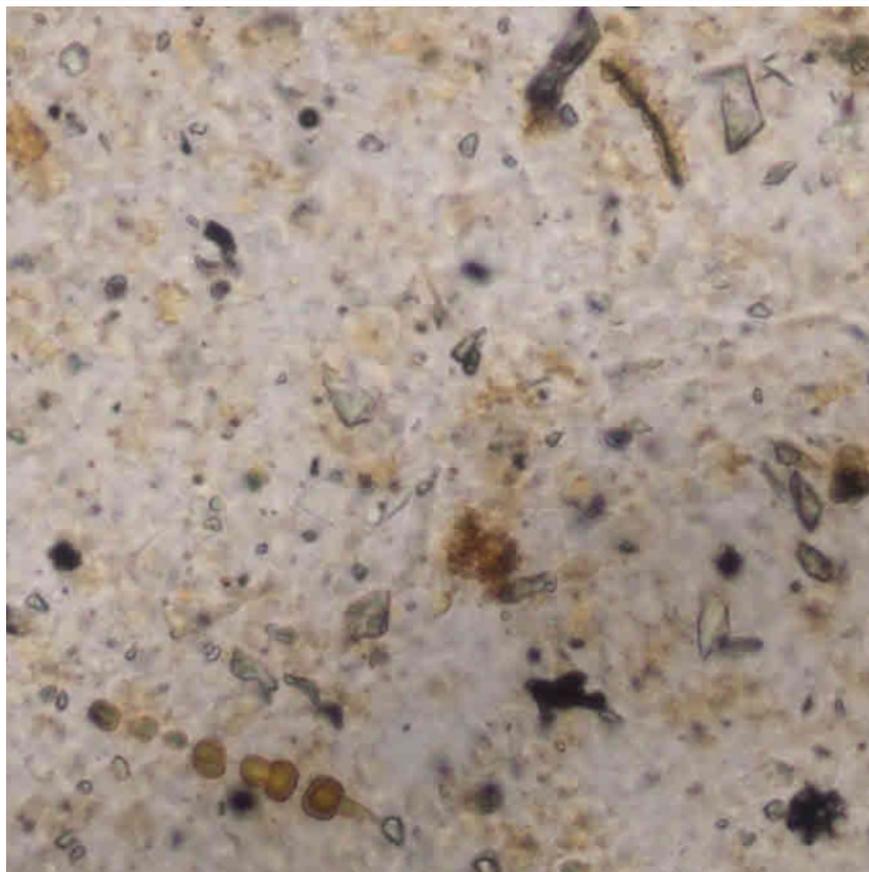
segue

continua

Corpuscoli ferruginosi in microscopia ottica



Corpuscolo
ferruginoso su
fibra
verosimilmente
metallica



Si nota la
differenza tra il
corpuscolo di
asbesto (in basso)
e un corpuscolo
ferruginoso (in
alto) su fibra scura
non asbesto.

segue

continua

Corpuscoli ferruginosi in microscopia ottica



Corpuscoli ferruginosi su fibra scura.

Il rivestimento può presentare angoli spezzati.

A5. Altri corpuscoli non asbesto con fibra interna visibile

PRODOTTI DA MMVF

CORE

Composizione

- prevalentemente Si Al

Caratteristiche

- fibra chiara
- se piccola, corta e dritta essa appare simile all'asbesto

RIVESTIMENTO

Caratteristiche

- Colore oro/arancio/marrone

NB: Se la fibra interna è dritta e molto sottile diventano molto simili ai corpuscoli dell'asbesto e non sono distinguibili in MO (possibile per fibre ceramiche refrattarie)

PRODOTTI DA ZEOLITI O ALTRI ALLUMOSILICATI

CORE

Composizione

- Zeoliti o altri silicati/alluminosilicati fibrosi*

Caratteristiche

- fibra indistinguibile dall'asbesto in microscopia ottica

RIVESTIMENTO

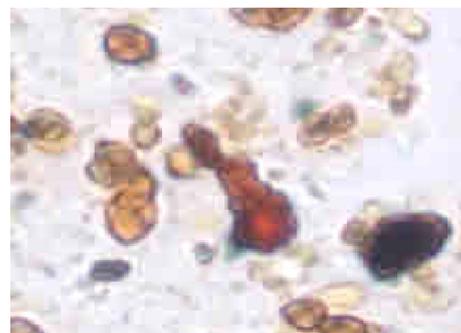
Caratteristiche

- indistinguibile da quello dell'asbesto in microscopia ottica

* Limitati alle popolazioni geograficamente esposte*

**Oggetti morfologicamente simili a corpuscoli, ma privi di fibra/particella interna
in microscopia ottica**

Oggetti da non contare: privi di fibra interna



segue

continua

**Oggetti morfologicamente simili a corpuscoli, ma privi di fibra/particella interna
in microscopia ottica**

Oggetti da non contare: privi di fibra interna



APPENDICE B
Schede di preparazione dei campioni
e resoconti di prova

B1. Scheda di preparazione per tessuto polmonare

IDENTIFICATIVO DEL CAMPIONE	Nome:
Note: _____	Esecutore:

Campione sottoposto a preparazione

N.	Posizione di prelievo	Data	Peso umido (g) / Volume di liquido (mL)	Digestione chimica: mL di ipoclorito	Ore di digestione

Determinazione rapporto secco umido

N.	Data	Peso umido (g)	Peso secco (g)	Rapporto S/U (peso secco/peso umido)

Calcolo peso secco P_{TS} (g)

N	Data	Peso umido (g) Volume di liquido (mL)	Rapporto S/U	$P_{TS}(g) =$ Peso umido x Rapporto S/U

B2. Resoconto di prova

Identificativo campione		Analista:	
Microscopio Ottico: Ingrandimento:		Data:	

N. di Campo	n. CA	n. non CA	Note	N. di Campo	n. CA	n. non CA	Note	N. di Campo	n. CA	n. non CA	Note

Compilare solo per i campi in cui si trovano oggetti di rilievo. Indicare il n. di campo, il n. di CA trovati nel campo, il n. di oggetti non CA trovati; nel campo Note indicare se trattasi di talco, fibra scura, ecc.

Area effettiva del filtro (A - mm²)		Area del singolo campo (a - mm²)	
Numero totale di campi letti (Nc)		Numero totale di corpuscoli di asbesto trovati N_{CORP}	

B3. Scheda di preparazione per liquidi biologici

IDENTIFICATIVO DEL CAMPIONE	Nome:
Note: _____	Esecutore:

Campione sottoposto a preparazione

N.	Tipologia di campione	Data	Volume di liquido (mL)	Digestione chimica: mL di ipoclorito	Ore di digestione

B4. Resoconto di prova per liquidi biologici

Identificativo campione		Analista:	
Microscopio Ottico: Ingrandimento:		Data:	

N. di Campo	n. CA	n. non CA	Note	N. di Campo	n. CA	n. non CA	Note	N. di Campo	n. CA	n. non CA	Note

Compilare solo per i campi in cui si trovano oggetti di rilievo. Indicare il n. di campo, il n. di CA trovati nel campo, il n. di oggetti non CA trovati; nel campo Note indicare se trattasi di talco, fibra scura, ecc.

Area effettiva del filtro (A - mm²)		Area del singolo campo (a - mm²)	
Numero totale di campi letti (N_c)		Numero totale di corpuscoli di asbesto trovati N_{CORP}	

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di giugno 2017, 1° Suppl.*

*Stampato in proprio
Settore Attività Editoriali – Istituto Superiore di Sanità*

Roma, giugno 2017