

**APPLICAZIONE DEL METODO DI PIOMELLI
E DELL'EMATOFUORIMETRO (ZnPP) PER IL DOSAGGIO
DELLA PROTOPORFIRINA IX ERITROCITARIA
IN MASCHI ADULTI**

A. Trevisan, G.P. Gori e A. Buzzo

Estratto da « *La Medicina del Lavoro* »
Vol. 70 - N. 3 - 1979

APPLICAZIONE DEL METODO DI PIOMELLI E DELL'EMATOFUORIMETRO (ZnPP) PER IL DOSAGGIO DELLA PROTOPORFIRINA IX ERITROCITARIA IN MASCHI ADULTI

A. Trevisan, G.P. Gori e A. Buzzo

« Application of the Piomelli Method and the Hematofluorometer (ZnPP) for the Determination of Erythroprotoporphyrin in Adult Males ». - Three different methods for EPP determination are compared: the Grinstein and Wintrobe method, the Piomelli « FEP test », and ZnPP determined with Hematofluorometer; 200 adult males were examined. The comparison between « FEP test » and the Grinstein and Wintrobe method (110 samples) showed significantly more elevated values with the first method, difference statistically significant ($p < 0.02$); the difference was more evident in the high values. The comparison between « FEP test » and automatic determination of ZnPP (70 samples) showed a good correspondence (difference not significant). The correlation between « FEP test » and PbB on 134 normal and lead poisoned subjects was very good ($r = 0.833$). The mean FEP concentration in normal subjects (70 unexposed subjects with normal PbB values) was $54.5 \pm 13.8 \mu\text{g} \pm 100 \text{ ml of RBC}$ ($m + 2SD = 82$, range 27-84).

In questi ultimi anni — e stanno trovando larga applicazione nello studio dell'esposizione a piombo — sono stati elaborati alcuni metodi che consentono di determinare in modo semplice e rapido la concentrazione eritrocitaria di protoporfirina non legata al ferro, metodi che risulterebbero quindi assai vantaggiosi rispetto alle classiche metodiche spettrofotometriche (1, 7) fino ad oggi impiegate, indubbiamente complesse e laboriose.

Dei metodi proposti due, in particolare,

Abbreviazioni:

- FEP: *Free Erythrocyte Porphyrin*, la porfirina libera eritrocitaria è stata dosata col metodo di Piomelli.
PPE: Protoporfirina eritrocitaria dosata col metodo di Grinstein e Wintrobe.
ZnPP: Zincoprotoporfirina determinata col fluorimetro ad ottica frontale.
PbB: piombemia.

Istituto di Medicina del Lavoro dell'Università di Padova, II Cattedra - Direttore: Prof. A. Chiesura - Via Facciolati, 71.

appaiono avviati ad applicazione estensiva sia per l'attendibilità dei risultati che per estrema maneggevolezza: il « FEP test » di Piomelli (6) che si fonda sulla determinazione fotofluorimetrica della porfirina in HCl dopo una singola estrazione in miscela di acetato di etile/acido acetico e il metodo di fluorimetria diretta sul sangue in toto che, basandosi sull'individuazione della Zincoprotoporfirina (ZnPP) (5), utilizza appositi ematofluorimetri ad ottica frontale tarati per la determinazione automatica di questo solo parametro.

Intendiamo qui riferire i risultati che abbiamo ottenuto con questi due metodi, nell'intento di indicarne la validità e di facilitarne la valutazione a chi, come noi stessi, ha formato la sua esperienza al riguardo soprattutto utilizzando le classiche metodiche di determinazione spettrofotometrica della Protoporfirina eritrocitaria.

CASISTICA E METODI

La casistica indagata era composta da soggetti di sesso maschile: tale casistica è stata suddivisa in tre gruppi.

Il primo comprendeva 134 soggetti, di cui 70 professionalmente non esposti a piombo e non affetti da malattie ematologiche od epatiche che sono stati valutati come normali e sui quali è stato valutato il valore medio ed indicato un limite normale della Protoporfirina IX determinata col « FEP test » di Piomelli; i rimanenti 64 soggetti erano tutti variamente esposti a rischio saturnino al momento della determinazione e non erano stati sottoposti a terapia depiombizzante. In questi 134 soggetti è stato determinato il valore di piombemia secondo il metodo di Hessel (2). Tra i valori di piombemia e quelli della FEP è stata valutata la correlazione statistica r .

Nel secondo gruppo, comprendente 110 soggetti, sono stati messi a confronto i valori ottenuti con la determinazione della PPE secondo il metodo di Grinstein e Wintrobe (1) e quelli ottenuti col metodo di Piomelli. Il confronto tra le medie è stato valutato statisticamente con lo Student t test. È stato inoltre determinato il coefficiente di correlazione r .

Nel terzo gruppo, 70 soggetti, abbiamo confrontato i valori ottenuti col metodo di Piomelli e quelli ottenuti con la determinazione diretta della ZnPP. Tale determinazione è stata eseguita su sangue venoso opportunamente ossigenato. I valori trovati coi vari metodi di dosaggio della Protoporfirina sono stati tutti corretti per l'ematocrito. Anche in questo caso, la differenza tra le medie è stata valutata statisticamente con lo Student t test ed è stato calcolato il coefficiente di correlazione r .

Le determinazioni sono state eseguite con spettrofotometro ad assorbimento atomico Perkin-Elmer modello 305 (la piombemia), con spettrofotofluorimetro Perkin-Elmer modello 204-A (il « FEP test »), con spettrofotometro Gilford Instruments modello 300 N (la PPE) e con ematofluorimetro ad ottica frontale ESA 4000 (la ZnPP).

Le variazioni dei valori di Protoporfirina determinata sullo stesso campione col « FEP test » non superavano il 5%, mentre quella determinata col metodo tradizionale era attorno al 10%. Il controllo di qualità per la PbB era inferiore al 10%.

RISULTATI

Nei 70 soggetti considerati normali, il valore medio di FEP da noi riscontrato è stato di $54,5 \pm 13,8$ mcg/100 ml di G.R. con

valori estremi compresi tra 27 e 84 mcg/100 ml di G.R. Il valore di PbB determinato nello stesso gruppo di soggetti è risultato di $29,99 \pm 6,87$ mcg/100 ml di sangue intero.

Ottima è risultata la correlazione ($r = 0,833$) tra la PbB e la FEP nei 134 soggetti indagati con $p < 0,001$ (fig. 1).

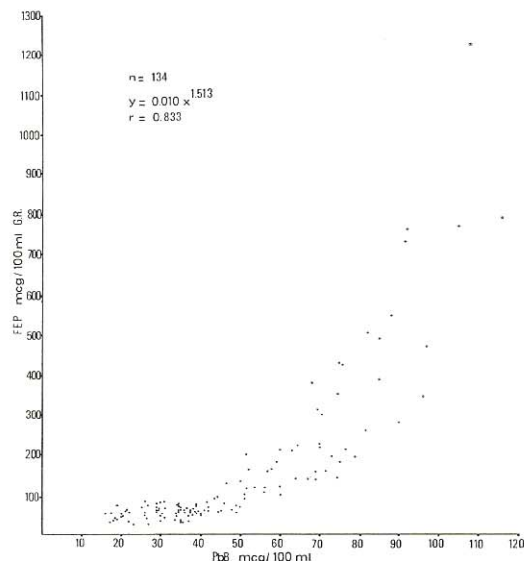


Fig. 1 - Correlazione tra piombemia e Protoporfirina IX determinata col « FEP test » di Piomelli.

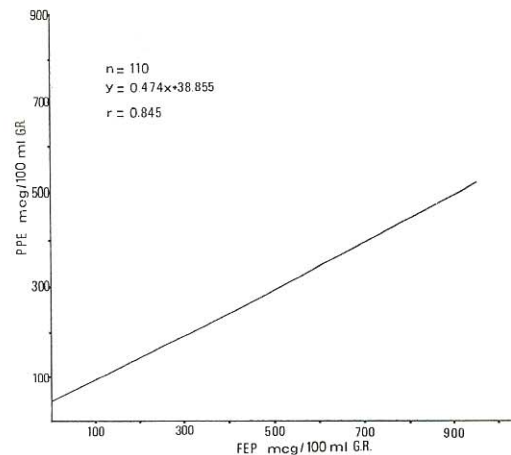


Fig. 2 - Correlazione tra valori di Protoporfirina IX ottenuti col metodo tradizionale di Grinstein e Wintrobe ed col « FEP test » di Piomelli.

Nel secondo gruppo di 110 soggetti, dalla comparazione grafica dei risultati (fig. 2) risulta evidente che col « FEP test » si ottengono valori più elevati ($m = 170,0 \pm \pm 191,4$ mcg/100 ml di G.R.) di Protoporfirina IX rispetto a quelli ottenuti col metodo di Grinstein e Wintrobe ($m = 119,97 \pm 109,17$ mcg/100 ml di G.R.), la differenza risultando più evidente e costante quando siano esaminati campioni con tenore di Protoporfirina IX più elevato. La differenza tra le medie è risultata statisticamente significativa ($p < 0,02$), nonostante la correlazione sia buona ($r = 0,845$).

In 70 soggetti sono stati determinati contemporaneamente i valori di Protoporfirina IX col « FEP test » e la ZnPP.I due metodi offrono una soddisfacente corrispondenza di risultati (fig. 3): i valori di ZnPP ($m = 151,4 \pm 168$ mcg/100 ml di G.R.) risultano leggermente superiori a quelli ottenuti con FEP test ($m = 126,6 \pm 148$ mcg/100 ml di G.R.), ma alla analisi statistica la differenza tra le medie dei due gruppi non è significativa. Inoltre buona è la correlazione ($r = 0,844$).

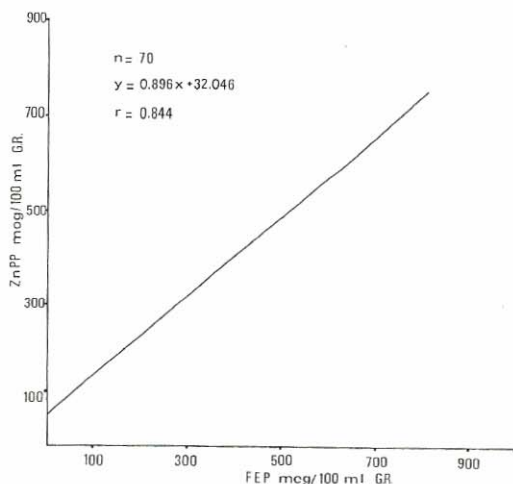


Fig. 3 - Correlazione tra valori di Protoporfirina IX ottenuti col « FEP test » di Piomelli e con la fluorimetria diretta (ZnPP).

DISCUSSIONE

Il metodo tradizionale di dosaggio della Protoporfirina IX (1) soffre di alcuni difetti che ne hanno limitato l'impiego estensivo nella pratica e tra i quali ricordiamo: notevole tempo di esecuzione, gran numero di passaggi, notevole consumo di materiali e di vetreria, necessità di prelievo venoso. La relativa complessità del metodo comporta inoltre: che spesso mal comparabili siano i risultati dei vari laboratori per la frequente introduzione di accorgimenti particolari; che maggiore sia la possibilità di errore; che nella pratica ci si accontenti di un dato sotto-stimato (con perdite in assoluto particolarmente sensibili sui valori alti) pur di non appesantire in modo inaccettabile la manualità (è noto dalla letteratura che solo con nove estrazioni in luogo delle tre abituali si ottiene il recupero completo della Protoporfirina).

Evidenti sono i vantaggi che offre il « FEP test » di Piomelli. La quantità di sangue necessaria è modesta, tanto da consentire di effettuare il prelievo con puntura di un polpastrello. La manualità è così semplice da rendere improbabili errori dovuti all'operatore. La rapidità del metodo, aggiunta alla facilità di impostare operazioni in serie, consente l'esame di un numero elevato di campioni. Infine, l'estrazione della Protoporfirina dagli eritrociti risulta pressoché completa (circa 95 %) con una sola estrazione di breve durata, verosimilmente in rapporto al fatto che il volume di reattivo è assai elevato (anche se in assoluto modesto) rispetto al volume di sangue in esame: tale maggior efficienza di estrazione si rende evidente soprattutto all'esame di campioni con tasso di porfirina elevato, il che spiega la differenza tra i valori di PPE e di FEP evidenziati nella figura 2.

L'ematofluorimetro (o zincoprotoporfirino-metro) automatico ci ha fornito risultati so-

stanzialmente comparabili a quelli ottenuti col metodo di Piomelli (fig. 3); la semplicità del metodo è analoga se non maggiore, trattandosi di lettura diretta, ma la manualità ci è parsa leggermente più delicata per la necessità di ottenere una buona omogeneità del film di sangue steso sul vetrino. Da segnalare inoltre qualche perplessità sugli standard di riferimento, soprattutto sulla stabilità e il tipo, che emerge dai dati fin qui consegnati alla letteratura (3, 4).

La correlazione tra PbB e valori di FEP, mostrata in figura 1, mostra una buona corrispondenza tra i due valori ($r = 0,833$), a conferma di quanto noto dalla letteratura. Tuttavia a questo proposito riteniamo opportuno sottolineare che una corrispondenza assoluta non va ricercata né è proponibile perché PbB e tasso eritrocitario di Protoporfirina IX sono dati di diverso significato biologico. La PbB rispecchia infatti l'assorbimento in atto di piombo, l'aumento della porfirina eritrocitaria è un effetto biologico relativamente persistente, cosicché se in certe situazioni e fasi di intossicazione la correlazione può e deve essere stretta, in certe altre situazioni e fasi il divario tra i due parametri può risultare anche notevole.

Il metodo di Piomelli (o « FEP test ») per la determinazione fotofluorimetrica della Protoporfirina libera eritrocitaria merita senz'altro, a nostro avviso, di sostituire le tradizionali e più indaginose metodiche di valutazione della Protoporfirina. La notevole semplicità del metodo si riflette infatti positivamente, oltre che sulla possibilità di una applicazione estensiva, anche sulla costanza e ripetibilità dei risultati. Nel valutare i dati ottenuti con questo metodo va tenuto presente che il tasso eritrocitario di porfirina risulta più elevato che col metodo tradizionale, verosimilmente in rapporto ad una più completa estrazione; la differenza tra i risultati ottenuti coi due metodi è più evidente e di riscontro più regolare nei casi con tasso più

elevato di porfirina. I livelli di questa, determinata col « FEP test » nella popolazione « normale » (e cioè non esposta ad abnorme assorbimento di piombo in occasione di lavoro), si situa attorno a 50 mcg/100 ml di G.R. ed il limite superiore dell'ambito normale (considerando come tale il limite individuato dalla media più due deviazioni standard) si situa attorno a 80 mcg/100 ml di G.R.

L'impiego di una valutazione diretta mediante zincoprotoporfrinometro automatico (oggi fornito dal commercio) che utilizza un sistema ottico per fluorimetria di superficie frontale (invece che ottiche ad angolo retto come nei comuni fluorimetri) per evitare la interferenza dell'emoglobina, risulta pure metodo valido e soddisfacente. Nella nostra esperienza (70 casi controllati con questo strumento e metodo di Piomelli) la corrispondenza dei risultati risulta buona. A suo svantaggio va notato il fatto che il metodo richiede la disponibilità di uno strumento, di costo non indifferente, utilizzabile a questo scopo esclusivo, mentre la metodica di Piomelli, che pure consente con grande esattezza e semplicità di effettuare un elevato numero di analisi, utilizza una attrezzatura laboratoristica di base.

RIASSUNTO

In 200 soggetti maschi adulti (normali ed esposti a piombo), è stato effettuato un confronto tra diversi metodi di determinazione della Protoporfirina IX eritrocitaria, e precisamente: metodo tradizionale di Grinstein e Wintrobe; « FEP test » secondo Piomelli; determinazione della ZnPP con lettura diretta all'ematofluorimetro. Il confronto tra « FEP test » e metodo di Grinstein e Wintrobe (110 casi), ha documentato che il primo metodo dà valori significativamente più elevati (la differenza tra le medie è statisticamente significativa per $p < 0,02$), con scarti più evidenti soprattutto nei valori alti. Il confronto tra « FEP test » e lettura diretta della ZnPP (70 casi) ha dimostrato sostanziale concordanza di valori (differenza tra le medie non

significativa). Per quanto riguarda il « FEP test », è stata pure valutata in 134 normali ed esposti a piombo, la sua correlazione con la piombemia, che è risultata buona ($r = 0,833$); inoltre, su 70 soggetti non esposti a piombo e con piombemia normale è stato calcolato un valore medio normale pari a $54,5 \pm 13,8$ mcg/100 ml di G.R. (media + 2 SD = 82 mcg/100 ml di G.R., range osservato tra 27 e 84 mcg/100 ml di G.R.).

BIBLIOGRAFIA

1. GRINSTEIN M., WINTROBE M.M.: Spectrophotometric micromethod for the quantitative determination of the free erythrocyte protoporphyrin. *J. Biol. Chem.*, 172, 459 (1948).
2. HESSEL D.W.: A simple and rapid quantitative determination of lead in blood. *At. Absorpt. Newsl.*, 7, 55 (1968).
3. JOSELOW M.M., FLORES J.: Application of the zinc protoporphyrin (ZP) test as a monitor of occupational exposure to lead. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 38, 63 (1977).
4. LAMOLA A.A., JOSELOW M.M., YAMATE T.: Zinc Protoporphyrin (ZPP); a simple, sensitive fluorimetric screening test for lead poisoning. *Clin. Chem.*, 21, 93 (1975).
5. LAMOLA A.A., YAMANE T.: Zincprotoporphyrin in the erythrocyte of patients with lead intoxication and iron deficiency anemia. *Science*, 186, 936 (1974).
6. PIOMELLI S.: A micromethod for free erythrocyte porphyrins: the FEP test. *J. Lab. Clin. Med.*, 81, 932 (1973).
7. WRANNE L.: Free erythrocytes copro- and protoporphyrins. A methodological and clinical study. *Acta Ped. Scand.*, suppl. 49, 1 (1960).

Accettato il 22/1/1979.