

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI  
CATANIA  
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN MALATTIE  
GENETICHE DELL'ETÀ EVOLUTIVA - XXIV  
CICLO**

---

**Dott. Milana Francesco**

**IL MEDICO COMPETENTE NELL'INDIVIDUAZIONE  
DEL DEFICIT Uditivo DA ESPOSIZIONE  
PROFESSIONALE AL RUMORE O DA IPOACUSIE  
GENETICHE**

---

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA**

---

**Coordinatore:  
Chiar.ma Prof.ssa Teresa Mattina**

**Tutor:  
Chiar.mo Prof. Salvatore Travali**

---

**ANNO ACCADEMICO 2010-2011**

## **INTRODUZIONE**

Il Deficit Uditivo da rumore (Noise Induced Hearing Loss, NIHL) è la più comune malattia professionale esistente al mondo e il rumore è il più comune agente di rischio nei luoghi di lavoro.

La normativa relativa alla sicurezza e tutela della salute dei lavoratori (D.Lgs: 81/2008) ha affidato al Medico Competente anche il compito di collaborare all'attuazione di programmi di "Promozione della Salute".

Ciò nel rispetto di quanto previsto dall'art. 190, comma 1, lett. d), del D.Lgs. 81/2008 che, nell'ambito della valutazione dei rischi, focalizza l'attenzione anche sull'azione aggravante delle sostanze ototossiche presenti nell'ambiente di lavoro in caso di esposizione professionale a rumore.

Da recenti ricerche e proiezioni statistiche si stima che nel mondo circa 600 milioni di persone siano esposte al rumore ed altrettante siano quelle affette da deficit uditivo, di cui 80 milioni solo in Europa. Il deficit uditivo, oltre a comportare un costo per la società stimato in alcuni miliardi di dollari negli USA, presenta gravi implicazioni per la qualità della vita dei soggetti affetti. Determina, infatti, difficoltà nei rapporti sociali con conseguenze sia sullo stato emotivo (depressione) che su quello cognitivo (deterioramento). Ancora, sembra determinare deficit dei meccanismi legati ad attenzione, allerta, memoria recente e analisi e riconoscimento delle informazioni uditive, incidendo talvolta sulla stabilità posturale e sul movimento, amplificando i problemi d'equilibrio e il rischio di cadute e incidenti.

In studi precedenti, effettuati presso il Dipartimento di Medicina Interna e

Patologie Sistemiche, Sezione di Medicina del Lavoro, dell' Università di Catania, è stato dimostrato che esiste un effetto sinergico tra l'effetto lesivo del rumore professionale e l'abitudine al fumo nel determinismo dell'ipoacusia da rumore. Infatti l'incidenza di ipoacusia neurosensoriale in un campione di lavoratori esposti a rumore, nei confronti di un gruppo di controllo non esposto, ha permesso di dimostrare in modo incontrovertibile l'associazione con il fumo di sigaretta. Infatti i risultati ottenuti, analizzando un campione di 1022 soggetti, hanno evidenziato che nella popolazione non fumatrice la percentuale di soggetti affetti da deficit uditivo rappresenta soltanto il 19,9 % del totale (84 soggetti su 422), andando ad analizzare lo stesso dato nella popolazione fumatrice si nota un forte incremento: i fumatori affetti da deficit uditivo sono infatti il 46,2 % del totale (277 soggetti su 600).

<b>N° sogget- ti</b>	<b>Fumo no</b>	<b>IPOACUSICI</b>	<b>%</b>	<b>Fumo si</b>	<b>IPOACUSICI</b>	<b>%</b>
<b>1022</b>	422	84	19,9	600	277	46,2

Esaminando l'incidenza di deficit uditivo tra i soggetti esposti professionalmente a rumore rispetto al fumo di sigaretta si nota che tra questi i soggetti affetti da ipoacusia sono 206 su 514, pari al 40,1%, di cui ben 167 (81,1 %) presenta abitudine al fumo. Di contro gli ipoacusici non esposti sono 155 su 508, pari al 30,5 %, ma tra questi i fumatori rappresentano il 70,9 % (110 su 155).

<b>N° soggetti</b>	<b>Ipoacusia</b>	<b>Rumore</b>	<b>Fumo si</b>	<b>%</b>	<b>Fumo no</b>	<b>%</b>
<b>353 (69,5 %)</b>	<b>No</b>	<b>No</b>	<b>174</b>	<i>49,3</i>	<b>179</b>	<i>50,7</i>
<b>155 (30,5 %)</b>	<b>Si</b>	<b>No</b>	<b>110</b>	<i>70,9</i>	<b>45</b>	<i>29,1</i>
<b>308 (59,9 %)</b>	<b>No</b>	<b>Si</b>	<b>149</b>	<i>48,4</i>	<b>159</b>	<i>52,6</i>
<b>206 (40,1 %)</b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>	<b>167</b>	<i>81,1</i>	<b>39</b>	<i>18,9</i>

Anche l'età sembra avere un ruolo ben preciso. Infatti, se analizziamo i risultati in rapporto all'età ci accorgiamo che tra i 361 ipoacusici, solo 33, pari al 9,1 % hanno un'età uguale o inferiore a 35 anni, 108, pari al 29,9 % hanno un'età compresa tra 36 e 50 anni, 220, pari al 61,0 %, hanno un'età superiore a 50 anni.

<b>Età</b>	<b>N° lavoratori</b>	<b>Fumatori</b>	<b>Non fumatori</b>
<b>&lt; 35 anni</b>	<b>299 (29,26 %)</b>	<b>151 (50,5 %)</b>	<b>148 (49,5 %)</b>
<b>36-50 anni</b>	<b>403 (39,43 %)</b>	<b>225 (55,8 %)</b>	<b>178 (44,2 %)</b>
<b>&gt; 50 anni</b>	<b>320 (31,31 %)</b>	<b>224 (74,7 %)</b>	<b>96 (25,3 %)</b>

Poiché in Italia, gli ipoacusici sono circa 6.000.000 e tra questi un numero considerevole è affetto da sordità congenita (1/1000) o acquisita, è di fondamentale importanza il riconoscimento di tali forme da parte del medico competente, da una parte al fine di definire un programma di

prevenzione sanitaria adeguato al singolo caso, contribuendo a quelle attività di promozione della salute che il Decreto Legislativo 81/2008 si propone di attuare e dall'altra, di tutelare le aziende e i datori di lavoro da possibili denunce di malattia professionale non riconducibile ad un effettivo danno acustico provocato dall'esposizione al rumore. Ciò permette, contemporaneamente, sia di ridurre al minimo il rischio di infortunio sul lavoro per un soggetto affetto da ipoacusia congenita che per legge deve utilizzare DPI (tappi o cuffie), sia di migliorare la qualità della vita dello stesso, indirizzandolo verso l'utilizzo di apposite protesi acustiche che chiaramente determineranno un adeguato miglioramento della qualità della vita. In questi casi si rende obbligatorio il consulto di un otorinolaringoiatra, indispensabile per la formulazione di una diagnosi precisa e per un'eventuale terapia tempestiva: non bisogna dimenticare che molte patologie otologiche rendono il soggetto più suscettibile al rumore e che le sindromi vestibolari possono causare incidenti a chi lavora "in altezza".

La sordità congenita si sviluppa prima della normale epoca di apprendimento del linguaggio, con severa compromissione per lo sviluppo dello stesso, delle capacità comunicative e difficoltà nei rapporti sociali con conseguenze sia sullo stato emotivo (depressione) che su quello cognitivo (deterioramento).

Con questa prospettiva abbiamo voluto analizzare in un campione di 180 soggetti lavoratori presso un'azienda che opera nel settore del commercio al minuto dei prodotti di cui alla tabella merceologica XIV<sup>^</sup> per pneumatici

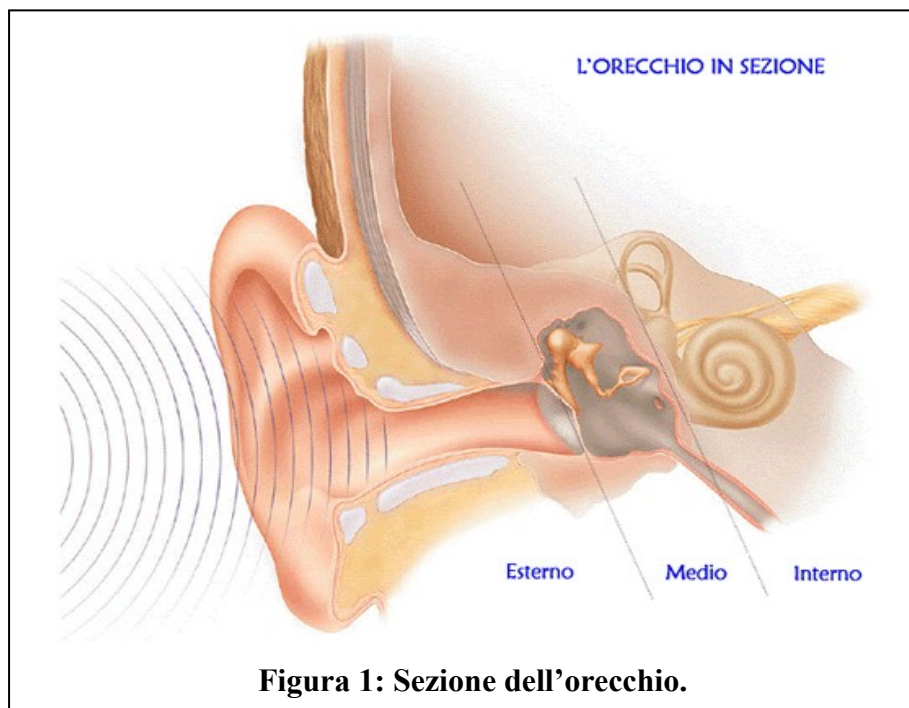
per autoveicoli ed accessori per auto, attività di gommista con fabbricazione, ricostruzione, vulcanizzazione, riparazione di gomme, pneumatici, prodotti della gomma e della plastica per uso industriale, agricolo, commerciale e civile, correlando gli aspetti clinici ed i fattori di rischio principali, quali gli effetti del fumo di sigaretta e l'esposizione al rumore, e ponendo attenzione alle possibili cause genetiche.

In questo studio abbiamo potuto identificare e tipizzare mediante indagini di biologia molecolare due soggetti con sospetta ipoacusia genetica non riconducibile a fattori di rischio precedentemente considerati (età, tempo di esposizione al rumore, abitudini di vita).

## ANATOMIA DELL'ORECCHIO

L'apparato uditivo ha la funzione di trasformare il *suono* (frequenza ed energia meccanica delle onde sonore) in *segnali elettrici* che attraverso il *nervo acustico* raggiungono il *cervello* e danno luogo alla *sensazione sonora*.

L'orecchio è formato da tre parti: l'orecchio esterno, l'orecchio medio e l'orecchio interno. (Fig. 1)



**Figura 1: Sezione dell'orecchio.**

### ***L'orecchio esterno.***

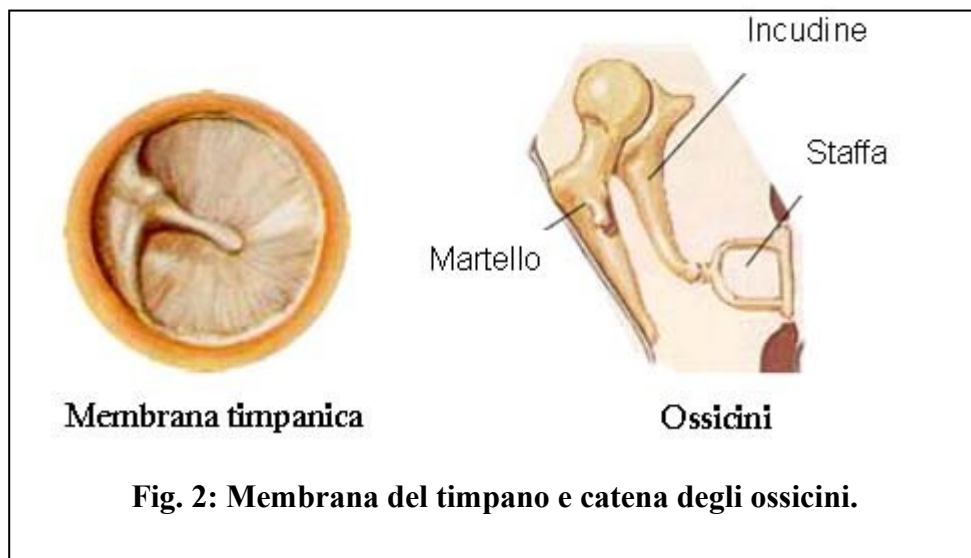
L'orecchio esterno è costituito dal padiglione auricolare e dal condotto uditivo esterno (meato acustico). Il padiglione auricolare corrisponde alla parte visibile dall'esterno ed è costituito da una struttura cartilaginea ed una superficie laterale irregolare per la presenza di multiple pieghe.

Esso raccoglie i suoni dall'ambiente e li convoglia al condotto uditivo esterno, un canale di forma cilindrica (osseo nel suo terzo mediale e cartilagineo nei due terzi laterali) che si estende dall'esterno verso l'interno e dall'avanti all'indietro, terminando in corrispondenza della membrana timpanica, complessa struttura fibrosa che separa l'orecchio esterno dall'orecchio medio. In questo condotto sono presenti alcune ghiandole sudoripare ceruminose che secernono il cerume, una sostanza acida giallo-brunastra, che ha la funzione di proteggere il canale uditivo dall'ingresso di sostanze estranee.

### ***L'orecchio medio.***

L'orecchio medio è l'apparato di *ricezione e di trasmissione* delle onde sonore dall'orecchio esterno a quello interno. È formato da una cavità, *la cavità del timpano* (compresa tra la membrana del timpano e l'orecchio interno) in cui sono presenti gli ossicini dell'udito i cui nomi sono definiti dalla loro forma particolare in: *martello*, fissato al rivestimento interno del timpano, *incudine*, situata vicino al primo, e *staffa*, unita alla membrana che riveste un'apertura ellittica chiamata finestra vestibolare oppure ovale. Gli ossicini, collegati tra loro e con la parete della cavità timpanica per mezzo di articolazioni, legamenti e alcuni muscoli formano, tra la membrana del timpano e la finestra vestibolare, quella che viene definita la *catena degli ossicini*. (Fig. 2)





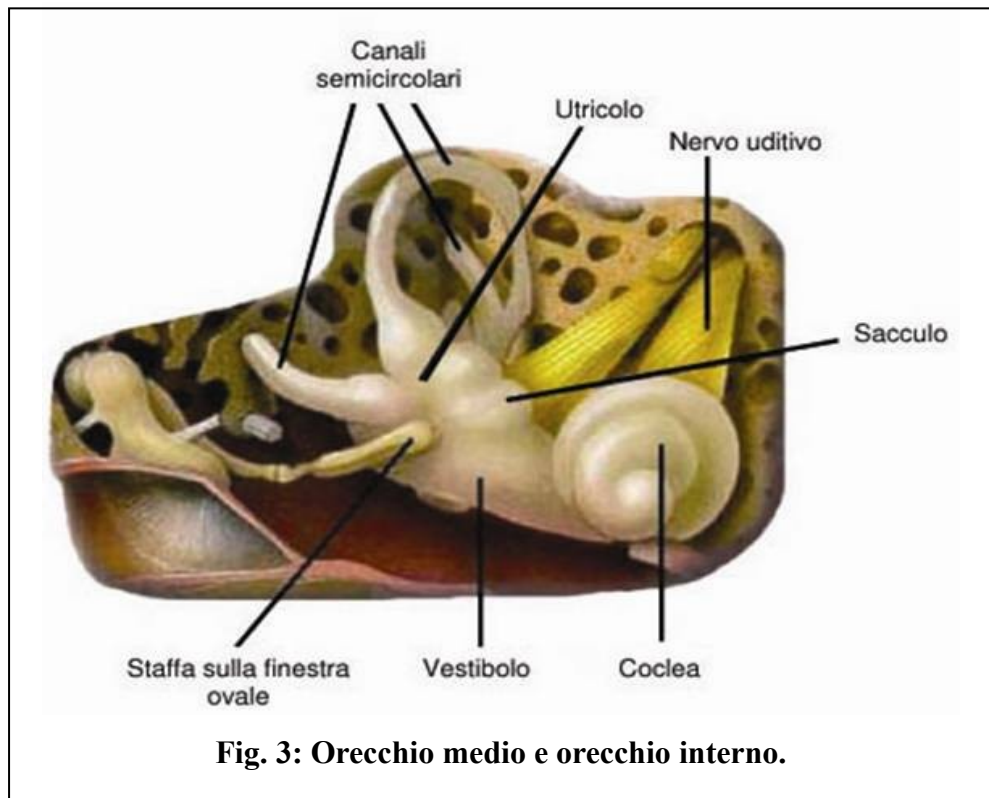
Anteriormente la cavità dell'orecchio medio è collegata con il rino-faringe mediante un lungo condotto, in parte osseo e in parte fibro-cartilagineo, chiamato *tuba uditiva o tromba di Eustachio*. Questo condotto consente il passaggio dell'aria nella cavità del timpano allo scopo di rendere uguale la pressione su entrambe le facce della membrana del timpano. Quando si deglutisce o si sbadiglia, l'aria passa rapidamente attraverso l'apertura della tuba permettendo di sopperire alla diminuzione della pressione intratimpanica dovuta al continuo assorbimento di aria legato ai fisiologici processi di scambio di gas con i liquidi extracellulari. Tale meccanismo è di fondamentale importanza perché la membrana del timpano può vibrare in maniera ottimale solo quando le pressioni sui suoi lati sono uguali.

### ***L'orecchio interno.***

L'orecchio interno è sia un *organo acustico* cioè recettore delle vibrazioni sonore che giungono dall'orecchio medio, sia un *organo statico* in quanto regola il senso dell'equilibrio. È formato da una serie di cavità scavate all'interno della zona petrosa dell'osso temporale, denominate *labirinto osseo*, contenenti delle strutture membranose, che prendono il nome di *labirinto membranoso*. Tra la parete del labirinto osseo e la superficie esterna del labirinto membranoso si trova una serie di fessure, che costituiscono la *spazio perilinfatico*, riempito da un liquido detto *perilinf*a (liquido di origine linfatica, chiaro, che defluisce attraverso il canale cocleare). Le cavità intercomunicanti del labirinto membranoso formano un secondo spazio, detto *endolinfatico*, dove è contenuta l'*endolinf*a (liquido incolore, trasparente, fluido). Questi due spazi sono indipendenti tra di loro. Le cavità che compongono il labirinto osseo sono: il vestibolo, la chiocciola e i tre canali semicircolari. Il labirinto membranoso è invece formato dall'utricolo e dal sacco (contenuti all'interno del vestibolo), dal condotto cocleare all'interno della coclea e dai canali semicircolari membranosi all'interno di quelli ossei. (Fig. 3)

*Il vestibolo* è situato tra la coclea ed i canali semicircolari e comunica con l'orecchio medio grazie alla finestra ovale. L'utricolo ed il sacco contengono sulle loro pareti cellule provviste di ciglia sulle quali è posta una membrana contenente piccoli cristalli di carbonato di calcio, detti otoliti. Quest'ultimi, fluttuando, inducono un movimento delle ciglia e

rendono così la membrana stessa sensibile alla forza di gravità, modificandola in base ai movimenti posturali.

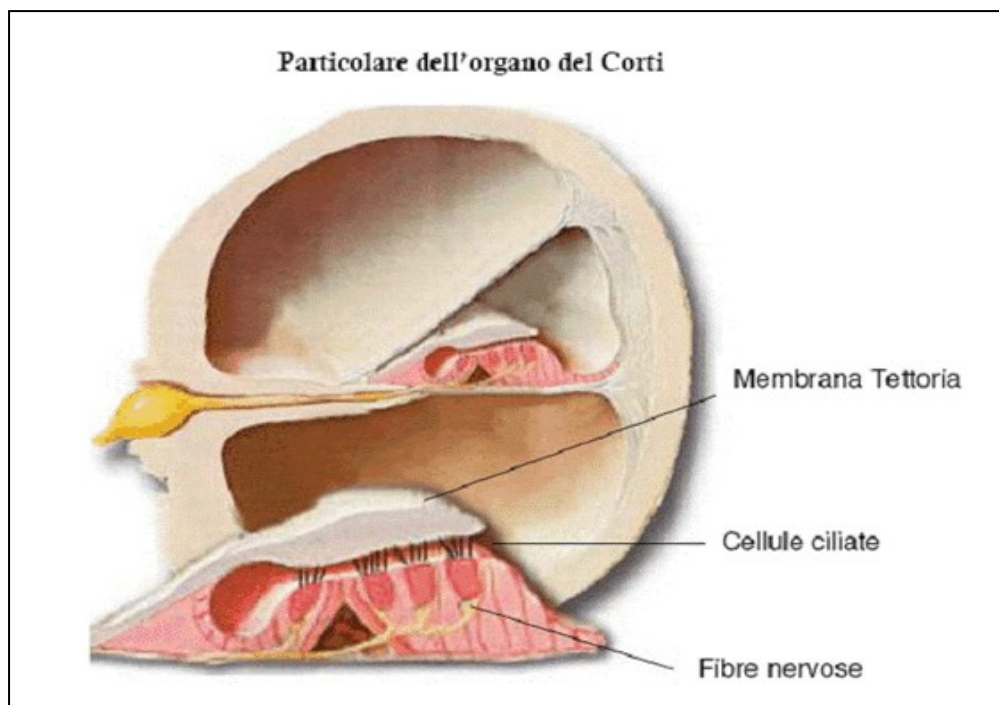


**Fig. 3: Orecchio medio e orecchio interno.**

La *coclea* esternamente è costituita da un canale avvolto su se stesso ad elica conica che assomiglia al guscio di una lumaca (*chiocciola ossea*). Il suo interno si presenta come una *lamina spirale*, sottile ed ossea, che attraversa nel senso della lunghezza il *dotto cocleare*, un tubo lungo e stretto avvolto su se stesso ad elica e chiuso ad entrambe le estremità. Dal lato esterno della lamina originano due membrane: *la vestibolare o del Reissner e la basilare*, che raggiungono la parete laterale del dotto cocleare. All'interno della coclea, quindi, si distingue uno spazio al di sopra della lamina di Reissner, che prende il nome di *rampa vestibolare*, uno al di sotto

della membrana basale definito *rampa timpanica* ed uno situato in mezzo, detto *rampa media*. Sulla membrana basilare, rivestita da epitelio, si differenzia l'organo spirale o del Corti, che rappresenta l'organo acustico vero e proprio (Fig. 4)

*L'Organo del Corti è costituito da cellule di sostegno e da cellule sensitive acustiche che rappresentano i recettori uditivi.* Queste sono dotate di ciglia immerse nel liquido del condotto cocleare (endolinfa) e ricoperte dalla membrana tectoria. Quando la base del condotto cocleare vibra (membrana basilare), determina un avvicinamento delle ciglia alla membrana tectoria con conseguente attivazione delle cellule acustiche. Lo stato di eccitazione viene trasmesso ai centri acustici del cervello tramite le fibre nervose del nervo acustico cocleare.



**Figura 4: Organo del Corti.**

I canali semicircolari ossei sono tre, all'interno dei quali sono contenuti i canali semicircolari membranosi. Ognuno di essi contiene endolinfa ed è connesso all'utricolo che si trova all'interno del vestibolo osseo. L'estremità di ciascun canale presenta un'ampolla, all'interno della quale sono contenute delle cellule ciliate sovrastate da una sostanza gelatinosa. Nei rapidi movimenti di rotazione della testa e del corpo si creano dei flussi di endolinfa che vanno a flettere le ciglia determinando l'eccitazione delle cellule nervose (ciliate) e l'attivazione dei riflessi che tendono a mantenere il corpo in equilibrio e la visione stabile.

### ***Meccanica cocleare e discriminazione della frequenza e dell'intensità del suono***

La trasmissione del suono all'organo di Corti oltre che per via aerea attraverso la catena ossiculare, può avvenire per mezzo delle strutture ossee dell'orecchio interno mediante la trasmissione di vibrazioni sonore ai liquidi del canale cocleare, i quali generano un'onda migrante in grado di stimolare le cellule acustiche. La capacità di distinguere l'intensità di un suono dipende secondo la «volley theory» (teoria della scarica) dal numero di impulsi nervosi che arrivano alla corteccia uditiva dalle cellule acustiche situate nell'area dove la deformazione della membrana basilare raggiunge la massima ampiezza. Più alta è, infatti, l'intensità dello stimolo sonoro, maggiore è il numero di cellule acustiche che trasmettono impulsi nervosi e più elevato è il numero dei potenziali d'azione nelle fibre del nervo cocleare per unità di tempo.

## **IL DEFICIT Uditivo**

Per perdita dell'udito o ipoacusia si intende la diminuzione della sensibilità al suono in un individuo.

In base alla sede anatomica coinvolta si distinguono tre tipi di deficit uditivo:

### *Deficit trasmissivo*

Si tratta di un'alterazione molto diffusa che si verifica nell'orecchio esterno o medio quando il suono proveniente dall'ambiente esterno non riesce a essere trasmesso in modo naturale attraverso il condotto uditivo e/o dall'orecchio medio all'orecchio interno.

### *Deficit percettivo*

In questo caso l'alterazione consiste in una lesione cocleare che determina una diminuzione della responsività delle cellule ciliate le quali, non reagendo correttamente all'impulso acustico, limitano o rendono impossibile il processo di trasformazione delle vibrazioni sonore in segnali elettrici che, attraverso il nervo acustico, dovrebbero essere trasmessi al cervello.

### *Deficit misto*

Si realizza quando le due componenti, trasmissiva e percettiva, si sovrappongono e prevede quindi un coinvolgimento di entrambe le strutture.

La perdita dell'udito può verificarsi in entrambe le orecchie (sordità bilaterale) o in un solo orecchio (sordità unilaterale).

In base all'epoca di insorgenza si distinguono due tipi di *ipoacusie* *acquisite o congenite (ereditarie)*:

*Preverbale:*

quando il danno acustico si verifica prima che il bambino abbia sviluppato il linguaggio, tipicamente intorno ai 2 anni e mezzo.

*Postverbale:*

si verifica dopo la completa acquisizione della parola, quindi generalmente dopo i due anni e mezzo di età.

### **Eziologia delle ipoacusie**

***Ipoacusie trasmissive:***

determinano tale tipo di ipoacusia le flogosi stenosanti dell'orecchio esterno (foruncolosi, otite esterna, micosi), le formazioni massive di cerume nel condotto uditivo, le iperostosi, le aplasie e i tumori del condotto, le flogosi acute e croniche dell'orecchio medio (otite media acuta catarrale e purulenta, otite media cronica catarrale semplice e adesiva, otite media purulenta cronica), l'otosclerosi o otospongiosi, i traumi dell'osso temporale .

***Ipoacusie neuro-sensoriali cocleari:***

causano tale tipo di ipoacusia le cocleopatie o labirintopatie tossiche (in genere iatrogene), le labirintiti batteriche e virali, le labirintopatie vascolari improvvise e croniche, la malattia di Meniere, il trauma acustico cronico, i traumi della rocca petrosa (in genere fratture a decorso trasversale), le sordità genetiche.

***Ipoacusie di tipo misto:***

determinano tale tipo di ipoacusia l'otite media catarrale e purulenta cronica con interessamento labirintico secondario, le labirintopatie non gravi insorte su un orecchio precedentemente ma indipendentemente affetto da patologia dell'orecchio medio, l'otosclerosi o otospongiosi in fase avanzata, alcune forme ereditarie associate, i traumi della rocca petrosa.

***Ipoacusie di tipo neuro-sensoriale retro-cocleare:***

sono causa di tale tipo di ipoacusia le nevriti batteriche o virali e le neuropatie tossiche dell'VIII nervo acustico, il neurinoma dell'acustico, i tumori dell'angolo pontocerebellare.

***Ipoacusie di tipo centrale:***

sono quelle determinate da lesioni vascolari, neoplastiche, degenerative, traumatiche e infettive, delle strutture uditive del tronco encefalico e delle aree uditive corticali.

***Ipoacuasiae acquisite o congenite (ereditarie):***

Negli ultimi anni, grazie al contributo delle ricerche di genetica molecolare, sono stati effettuati notevoli progressi circa la conoscenza dell'etiopatogenesi delle sordità ereditarie. Tali studi, infatti, hanno portato all'individuazione di loci cromosomici connessi con la funzione uditiva, delle loro alterazioni e delle ripercussioni sulla fisiologia dell'orecchio.

Il genoma umano consta di circa 25.000-30.000 geni <sup>4</sup>, ed è stimato che il



numero di quelli coinvolti nello sviluppo e nel funzionamento dell'orecchio interno sia superiore a 1000.

Le sordità ereditarie vengono distinte in:

a) Forme sindromiche, in cui l'ipoacusia si accompagna a manifestazioni cliniche dovute a compromissione di altri organi o apparati (es. renale, oculare, endocrino); esse rappresentano circa il 30% delle forme ereditarie.

b) Forme non sindromiche (70% delle ipoacusie ereditarie) in cui l'ipoacusia è dovuta ad esclusiva compromissione dell'apparato uditivo; la diagnosi di questo tipo di deficit può risultare più complessa in virtù dell'assenza del corredo di segni e sintomi clinici che accompagnano le forme sindromiche.

La modalità di trasmissione di queste ipoacusie può essere:

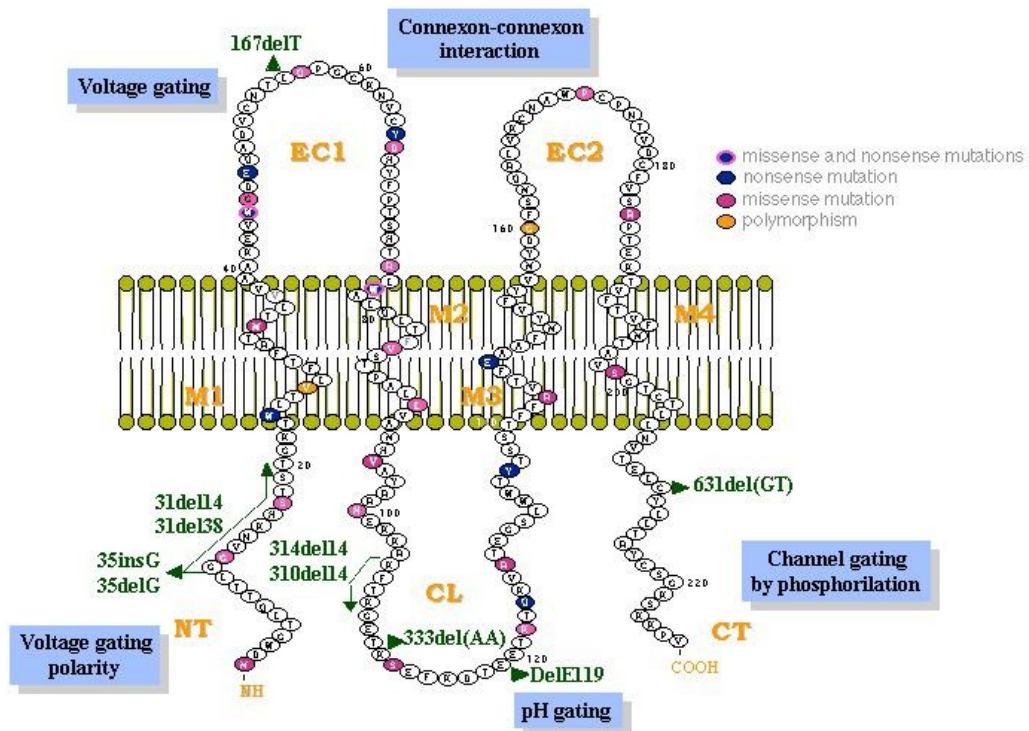
- Autosomica recessiva: circa il 70-80% delle ipoacusie non sindromiche;
- Autosomica dominante (15-25%);
- X linked (2-3%);
- Mitocondriali (2-3%)

La genetica molecolare ha identificato almeno 70 loci per sordità non sindromiche (51 loci dominanti, 39 recessivi e 7 loci X linked); ancora pochi sono tuttavia i geni determinanti la malattia identificati in questi loci.

I geni o le regioni cromosomiche (loci) associate alle varie forme di sordità genetica non sindromica sono indicati con la sigla DFN, dall'inglese **DeaFNness** (sordità):

- DFNA per le forme ad eredità autosomica dominante
- DFNB per le forme ad eredità autosomica recessiva
- DFN per le forme ad eredità recessiva legata al cromosoma X.

Il 50% delle forme di sordità isolata ereditaria è associata ad una mutazione particolare di un gene, identificato con la sigla GJB2, localizzato sul cromosoma 13, in grado di produrre una proteina, la *connessina 26*. Quest'ultima ha un ruolo essenziale nel funzionamento della coclea, in quanto è coinvolta nel *trasporto di piccole molecole e ioni attraverso la membrana cellulare*.



I principali costituenti della regione di collegamento fra le cellule sono le “gap junction”; queste sono zone di contatto specializzato tra le cellule che

permettono la comunicazione e il passaggio intercellulare di secondi messaggeri, metaboliti ed elettroliti . Le porzioni intermembrana delle “gap junction” sono costituite da sei subunità disposte ad esagono a formare una struttura chiamata connessione. Ciascuna subunità è formata da una singola proteina, la connessina. E' attraverso i connessioni che avviene lo scambio intercellulare.

Le “gap junction” svolgono un ruolo importante nella funzione cocleare, permettono gli scambi di ioni e liquidi tra le cellule e tra le cellule e l'ambiente circostante, consentendo il riciclaggio del potassio quindi il mantenimento di un equilibrio ionico, la generazione di un potenziale endococleare e la trasmissione dell'impulso come risposta cellulare agli stimoli ambientali.

L'alterazione dell'omeostasi cocleare a causa di mutazioni dei geni che codificano per le connessine presenti nell'orecchio interno, è causa di molte forme di sordità. Finora sono stati identificate più di 20 tipi di connessine.

Studi effettuati nell'epitelio sensoriale dell'orecchio interno di rettili, volatili e mammiferi, hanno permesso di individuare i diversi tipi di connessina che costituiscono le “gap junction” delle cellule sensoriali dell'orecchio interno dei mammiferi. Da questi studi è emerso che nella coclea dei mammiferi sono presenti quattro isotipi (cx26, cx30, cx31, cx43) mentre nell'organo vestibolare sono presenti tre isotipi (cx26, cx30, cx43). La cx26 e la cx30 sono state trovate nella regione basale della stria vascolare, nelle cellule del lembo spirale e nelle cellule di sostegno dell'Organo del Corti.

La maggior parte delle sordità ereditarie non sindromiche si trasmettono con una modalità autosomica recessiva e sono dovute soprattutto a mutazioni dei geni che codificano per le connessine. Le connessine principalmente coinvolte in queste mutazioni sono la cx26 e la cx30 codificate rispettivamente dai geni GJB2 e GJB6 che provocano ipoacusie neurosensoriali. Quali effetti possono provocare queste connessine mutate non sono ancora chiari, anche se connessioni difettosi ostacolano la trasmissione dell'impulso elettrico, non permettono il riciclaggio del potassio e creano un ambiente poco favorevole alla sopravvivenza delle cellule ciliate. Il danno della normale funzione ionica e l'alterazione dell'equilibrio ionico comporta la morte cellulare e la sordità.

Sono stati identificati circa trenta loci come possibili cause di sordità non sindromiche autosomiche recessive (DFNB) ma solo uno, DFNB1, viene considerato il responsabile della maggior parte dei casi di sordità ereditaria non sindromica con trasmissione autosomica recessiva. Il gene coinvolto in questo tipo di sordità è GJB2 che codifica per la proteina connessina 26 ed è localizzato sul cromosoma 13. Il locus contenente il gene GJB2 mutato fu individuato per la prima volta in famiglie consanguinee della Tunisia. Le mutazioni nella cx26 sono le più frequenti nel bacino del Mediterraneo, essendo responsabili di circa il 50% dei casi di ipoacusia neurosensoriale non sindromica. La mutazione più frequente nella connessina 26 è la delezione di una singola guanina da una sequenza di sei guanine ed è la 35 del G che provoca la formazione di un prematuro codone di stop nella

sintesi della proteina. In letteratura sono descritte altre mutazioni meno comuni, per esempio:167delT, 235delC. L'ipoacusia associata alla mutazione 35delG è ad insorgenza preverbale, è neurosensoriale e non è progressiva. Mutazioni nella cx26 possono anche essere, in rari casi, cause di sordità autosomiche dominanti (DFNB3). Sono state individuate nove mutazioni responsabili di sordità dominanti tra cui: M34T, W44C, W44S, R75W e D66H. I risultati ottenuti confermano l'importanza del gene GJB2 nelle sordità neurosensoriali.

Il peso clinico e sociale che i vari tipi di ipoacusia vengono ad avere è ben differenziato.

*Le ipoacusie di conduzione o trasmissive*, infatti, per la sede anatomica delle alterazioni che ne sono all'origine danno luogo, come si è visto, ad un *deficit uditivo in genere non grave*; non sono presenti distorsioni del segnale sonoro e in buona parte sono reversibili.

*Nelle ipoacusie di tipo misto*, la gravità del deficit può essere senz'altro superiore in relazione alla minore o maggiore compromissione dell'apparato neuro-sensoriale; possono essere presenti variamente alterazioni anche qualitative della percezione sonora e una maggiore tendenza alla stabilità o alla progressione clinica.

Sono comunque *le ipoacusie percettive* quelle che determinano la maggiore compromissione della sensibilità uditiva intesa sia dal punto di vista quantitativo che dal punto di vista della qualità dell'ascolto.

Infatti i deficit percettivi possono essere di entità varia ma raggiungere

anche livelli estremi di sordità; le forme neurosensoriali d'altronde possono dar luogo a distorsioni di frequenza e di intensità; infine le ipoacusie centrali possono determinare gravi difficoltà nella comprensione e nella elaborazione concettuale-simbolica dei messaggi acustici significativi.

### **Curve audiometriche**

Le ipoacusie di trasmissione o conduttive sono caratterizzate da una curva aerea con un deficit pantonale, equilibrato su tutte le frequenze, oppure da una curva in salita verso i toni acuti o curva di rigidità. Raramente però, è possibile riscontrare una curva in discesa o curva di massa con diminuzione della sensibilità uditiva maggiore sulle frequenze elevate. In tutti e tre i casi, e questo è il dato audiometrico più saliente, la curva per via aerea e per via ossea decorrono separate; la curva per via ossea corre in modo normale, ravvicinata allo 0, la curva per via aerea, invece, decorre variamente distanziata.

Nei deficit percettivi la soglia uditiva può configurarsi in vario modo; in genere prevale la compromissione per le alte frequenze. Il dato audiometrico di rilievo è il difetto della percezione ossea, pressoché identico al difetto della via aerea; le due soglie decorrono perciò sovrapposte o più o meno distanziate entrambe dalla linea della normalità.

Nelle ipoacusie di tipo misto si verifica una caduta sia della via aerea che della via ossea; la curva relativa a questa ultima non decorre però accostata a quella della via aerea come nelle ipoacusie di percezione, ma distanziata verso l'alto da questa, tanto più quanto è minore la compromissione

dell'apparato di percezione.

Con il termine di riserva cocleare si intende esprimere il grado di funzionalità residua dell'orecchio interno nelle ipoacusie miste. Questo grado di funzionalità neurosensoriale residua viene bene espresso, come abbiamo detto, dalla distanza della via ossea con la linea della normalità da una parte e con la soglia per via aerea dall'altra (gap uditivo) ed ha spesso particolare valore clinico (per es. indicazione chirurgica nell'otosclerosi).

### **Correlazioni fra curve percettive ed eziologia**

Le ipoacusie di origine vascolare, improvvise o progressive, presentano una curva inclinata verso gli acuti, con pendenza più o meno accentuata a seconda dei casi; rare le forme orizzontali o addirittura in ascesa.

Nelle sordità da agenti tossici, soprattutto in quelle da farmaci, ad un primo interessamento quasi esclusivo delle frequenze più acute, si aggiunge ben presto un interessamento più o meno evidente dei toni bassi.

Una caduta a V, selettiva per alcune frequenze, in modo particolare 3.000 e 4.000 Hz, è caratteristica del trauma cronico da rumore; nei casi di esposizione protratta in ambiente rumoroso, l'apice e la base della caduta a V, chiamata scotoma uditivo o deep, si allargano con interessamento di una gamma sempre più estesa di frequenze.

Nella presbiacusia, cioè nella sordità di tipo involutivo, legata all'età, la curva uditiva è dolcemente degradante verso le tonalità più acute. Il quadro audiometrico della malattia di Menière non è uniforme, ma in genere il deficit uditivo è di tipo pantonale o a volte in lieve discesa verso gli acuti.

## **IL DEFICIT Uditivo DA RUMORE**

In funzione della sua intensità e delle caratteristiche proprie, il rumore può determinare un danno al sistema uditivo con ripercussioni anche gravi sullo stato di benessere dell'individuo e pertanto da diversi anni viene considerato tra i principali fattori di rischio per la salute e come tale è soggetto a specifiche procedure di valutazione e prevenzione. Rappresenta circa il 50% delle malattie professionali indennizzate dall'INAIL.

### **Normativa**

Il rumore è un rischio professionale tutelato da norme di legge sin dal 1956 anno in cui fu emanata la prima normativa a tutela della salute dei lavoratori esposti a rischi professionali (DPR 303, art. 33 e Allegato). Successivamente, nel 1991, in recepimento della normativa comunitaria, fu emanato il D. Lgs. 277, relativo alla tutela dei lavoratori esposti a piombo amianto e rumore.

Mentre nel DPR 303/56 la tutela dei lavoratori era affidata solo al controllo sanitario, con il D.Lgs. 277/91 vengono introdotte norme di prevenzione primaria quali la valutazione obbligatoria del livello di rumore, la diversificazione della periodicità delle visite mediche in base al livello di esposizione, l'esecuzione di esami strumentali (audiometrie) per la verifica dell'eventuale danno uditivo. L'esposizione dei lavoratori viene valutata in  $L_{ep,d}$  e  $L_{ep,w}$  (livello di esposizione personale giornaliero e settimanale) come media ponderata dell'esposizione effettiva in rapporto al tempo di



lavoro.

Tale normativa rimane in vigore fino al 2006 quando viene emanato il Decreto Legislativo 10 aprile 2006, n. 195: Attuazione della direttiva 2003/10/CE relativa all'esposizione dei lavoratori ai rischi derivanti dagli agenti fisici (rumore) che introduce diverse novità di rilievo di cui la più importante è la riduzione del limite di esposizione da 90 dBA a 87 dBA. Tra le novità introdotte troviamo anche una modifica della definizione di  $L_{ep,d}$  e  $L_{ep,w}$  che diventano rispettivamente  $LEX,8h$  e  $LEX,W$ . La normativa prevede anche la possibilità della valutazione preventiva e deduttiva del livello di rumorosità in rapporto alla strumentazione utilizzata, alla modalità di utilizzo ed al tempo effettivo di esposizione. L'uso dei dispositivi di protezione individuale diventa obbligatorio oltre 85 dBA, ben 5 dBA in meno rispetto al precedente limite di 90 dBA. Tra le norme di prevenzione viene introdotta l'analisi di eventuale esposizione ad agenti ototossici, agenti chimici presenti nell'ambiente di lavoro o farmaci dotati di tossicità cocleare. Il recente Decreto Legislativo del 09.04.2008 n. 81 riprende la suddetta normativa dedicando alla tutela dei lavoratori esposti a rumore gli articoli 187-198. L'esposizione personale dei lavoratori, inoltre, adesso è calcolata al netto dell'abbattimento del rumore provocato dall'uso costante dei dispositivi di protezione individuale. La periodicità del controllo sanitario, di solito annuale, può essere modificata dal medico competente in seguito alla valutazione dei rischi ed all'effettivo livello di esposizione.

Viene, infine, ribadita l'importanza della formazione e della informazione

nella prevenzione delle patologie professionali da rumore.

### **La valutazione del rischio rumore**

Scopo della valutazione del rischio è conoscere il livello di rumorosità esistente in tutti gli ambienti di lavoro e identificare e classificare i lavoratori in base alla rispettiva classe di esposizione.

Essa va effettuata su richiesta del datore di lavoro da personale specializzato di cui una possibile definizione è quella di Tecnico Competente indicata dall'art. 2 della Legge 447/95, Legge quadro sull'inquinamento acustico: tecnico competente = figura professionale idonea ad effettuare le misurazioni, verificare l'ottemperanza ai valori definiti dalle vigenti norme, redigere i piani di risanamento acustico, svolgere le relative attività di controllo.

I valori limite di esposizione e i valori di azione, in relazione al livello di esposizione giornaliera al rumore e alla pressione acustica di picco, sono fissati dal D.Lgs. 81/2008 a:

- a) valori limite di esposizione rispettivamente  $LEX = 87 \text{ dB(A)}$  e  $p_{peak} = 200 \text{ } \mu\text{Pa}$  ( $140 \text{ dB(C)}$  riferito a  $20 \text{ } \mu\text{Pa}$ );
- b) valori superiori di azione: rispettivamente  $LEX = 85 \text{ dB(A)}$  e  $p_{peak} = 140 \text{ Pa}$  ( $137 \text{ dB(C)}$  riferito a  $20 \text{ } \mu\text{Pa}$ );
- c) valori inferiori di azione: rispettivamente  $LEX = 80 \text{ dB(A)}$  e  $p_{peak} = 112 \text{ Pa}$  ( $135 \text{ dB(C)}$  riferito a  $20 \text{ } \mu\text{Pa}$ ).

Vengono, pertanto, distinti quattro possibili livelli di esposizione personale

al rumore giornaliero (LEX,8H) o settimanale (LEX,W):

1. < 80 dBA;
2. 80 – 85 dBA;
3. 85-87 dBA;
4. > 87 dBA.

L'unità di misura del suono è il decibel, ma poiché le misure di rumore lineari (che cioè rilevano allo stesso modo i rumori di diversa frequenza) non sono utilizzabili ai fini della tutela della salute in quanto l'orecchio umano non presenta la stessa sensibilità alle diverse frequenze, occorre pertanto correggere le misure mediante una curva di ponderazione che tenga conto della diversa (minore) risposta dell'orecchio umano ai segnali ad alta e a bassa frequenza (curva di ponderazione A). Pertanto si preferisce utilizzare il dBA, che rappresenta l'unità di misura della sensazione sonora per l'orecchio umano.

Un altro importante parametro da considerare è la frequenza del suono, ovvero il numero di oscillazioni in un secondo che, come tutte le frequenze, si misura in Hertz (Hz). Per l'uomo, la soglia dell'udibile è compresa fra i 16-18 Hz (limite degli infrasuoni) ed i 16-18 kHz (limite degli ultrasuoni).

### **Uso dei DPI**

Quando non è possibile procedere all'abbattimento del rumore con misure di prevenzione è previsto l'uso di dispositivi di protezione individuale (DPI) che possono sostituire le misure di riduzione del fattore di rischio alla fonte;

il loro uso è però lecito soltanto quando, a valle dell'adozione delle misure di prevenzione e protezione collettive, i rischi da esposizione permangono.

Il datore di lavoro ha l'obbligo di mettere a disposizione dei lavoratori idonei DPI (otoprotettori) quando il livello di esposizione al rumore superi il valore inferiore di azione (80 dBA). Il lavoratore ha l'obbligo di indossare i DPI, e il datore di lavoro deve "fare tutto il possibile per assicurare che detti DPI vengano indossati", qualora il livello di esposizione al rumore uguagli o superi il valore superiore di azione (85 dBA).

### **Informazione e Formazione**

L'attuale normativa prevede, per i lavoratori con esposizione superiore al valore inferiore di azione, un'informazione relativa a:

- natura dei rischi indotti dall'esposizione a rumore;
- valori di azione, valori limite di esposizione;
- misure tecniche e organizzative adottate dall'azienda per contenere l'esposizione;
- illustrazione della VdR e delle misurazioni conseguenti effettuate;
- uso corretto degli otoprotettori;
- come e perché individuare e segnalare tempestivamente sintomi di danni all'udito;
- sorveglianza sanitaria;
- procedure operative idonee per ridurre al minimo la produzione di

rumori inutili e per limitare comunque l'esposizione.

### **Sorveglianza sanitaria**

La sorveglianza sanitaria è obbligatoria per i lavoratori che, in mancanza di uso di DPI sarebbero esposti a rumori eccedenti il valore superiore di azione (85 dBA).

La periodicità, come detto in precedenza, è di solito annuale, ma può essere modificata dal medico competente in rapporto ai livelli ed alle procedure di esposizione.

Hanno diritto di fruire della stessa sorveglianza sanitaria anche i lavoratori esposti a livelli di rumore più elevati del valore inferiore di azione (80 dBA) su loro richiesta, o qualora il Medico Competente ne confermi l'opportunità, qualora esistano patologie precedenti con maggiore sensibilità dell'organo del Corti all'azione nociva del rumore.

### **EFFETTI UDITIVI DEL RUMORE**

Gli effetti che il rumore può provocare sull'apparato uditivo sono diversi a seconda dell'intensità e delle modalità dell'esposizione professionale.

L'esposizione prolungata a rumore continuo fino a 80 dBA per 8 ore al giorno e per gli anni della vita lavorativa non provoca nella gran parte degli esposti alcun danno a carico dell'organo dell'udito; esposizioni prolungate a livelli di rumore più elevati per lo stesso tempo possono determinare un'ipoacusia da trauma acustico cronico o ipoacusia da rumore. L'esposizione a rumori particolarmente intensi e di breve durata, quali uno

scoppio, può causare una ipoacusia per trauma acustico acuto.

### ***Effetti uditivi del rumore***

#### **Scivolamento temporaneo della soglia uditiva (STS)**

Un suono o un rumore particolarmente intenso sono in grado di provocare un innalzamento della soglia uditiva rispetto a quella di riposo, seguito da un recupero della percezione uditiva che inizia al cessare dell'esposizione e si completa in circa 16 ore.

Questo fenomeno osservato già nel 1600 da Bacone è stato definito scivolamento temporaneo di soglia (STS) o fatica uditiva. In passato si riteneva che esso fosse dovuto a un esaurimento in senso energetico-funzionale delle cellule acustiche in conseguenza dell'esposizione più o meno prolungata a rumore di una certa intensità. La scoperta dei filamenti di actina nelle ciglia e nella parte apicale delle cellule acustiche e la possibilità di queste cellule di poter modificare la rigidità e l'altezza, in conseguenza di uno stimolo sonoro intenso, porta a ritenere che le cellule acustiche svolgano un ruolo attivo nel meccanismo del danno da rumore e del recupero funzionale. L'STS pertanto potrebbe essere espressione di un meccanismo di difesa attuato dalle cellule acustiche in seguito a stimoli sonori intensi che, riducendo la rigidità delle ciglia, ne aumenterebbe l'inerzia, e quindi verrebbe modificata la soglia uditiva nel senso di un innalzamento. Con la cessazione dello stimolo sonoro la cellula acustica riacquisterebbe la sua capacità funzionale e il livello di soglia uditiva di partenza.

**STS2 o fatica uditiva fisiologica.** È lo spostamento temporaneo della soglia uditiva che si misura 2 minuti dopo la fine dell'esposizione. È definito fatica uditiva e si esaurisce completamente in 16 ore. Esso, a parità di stimolazione acustica, varia da un soggetto all'altro per via della diversa suscettibilità individuale al rumore. All'aumentare dell'intensità dello stimolo è in grado di interessare anche frequenze diverse da quelle del tono stimolante. L'entità dell'STS2 aumenta in modo lineare con il livello di pressione sonora per stimoli superiori agli 80 dB. Il recupero è proporzionale al logaritmo del tempo. In passato è stato proposto l'uso dell'STS2 per individuare i soggetti con ipersuscettibilità al danno uditivo cronico da rumore professionale. Presentano una maggiore otosensibilità al danno da rumore, infatti, una percentuale di soggetti compresa tra il 2 e il 15%, a seconda dei diversi autori che hanno indagato su questo fenomeno. In seguito l'uso dell'STS2 per questo fine è stato abbandonato in quanto gli studi epidemiologici non hanno evidenziato una relazione valida tra ipersuscettibilità al danno uditivo da rumore e valori alterati di STS2.

### **Ipoacusia da trauma acustico cronico o ipoacusia da rumore**

L'ipoacusia da trauma acustico cronico o ipoacusia da rumore è generalmente provocata dall'esposizione professionale prolungata a livelli sonori superiori agli 80 dBA per 8 ore al giorno e per 5 giorni la settimana. L'ipoacusia da rumore di natura professionale è da diversi anni la malattia più frequentemente segnalata all'INAIL e dall'istituto assicuratore

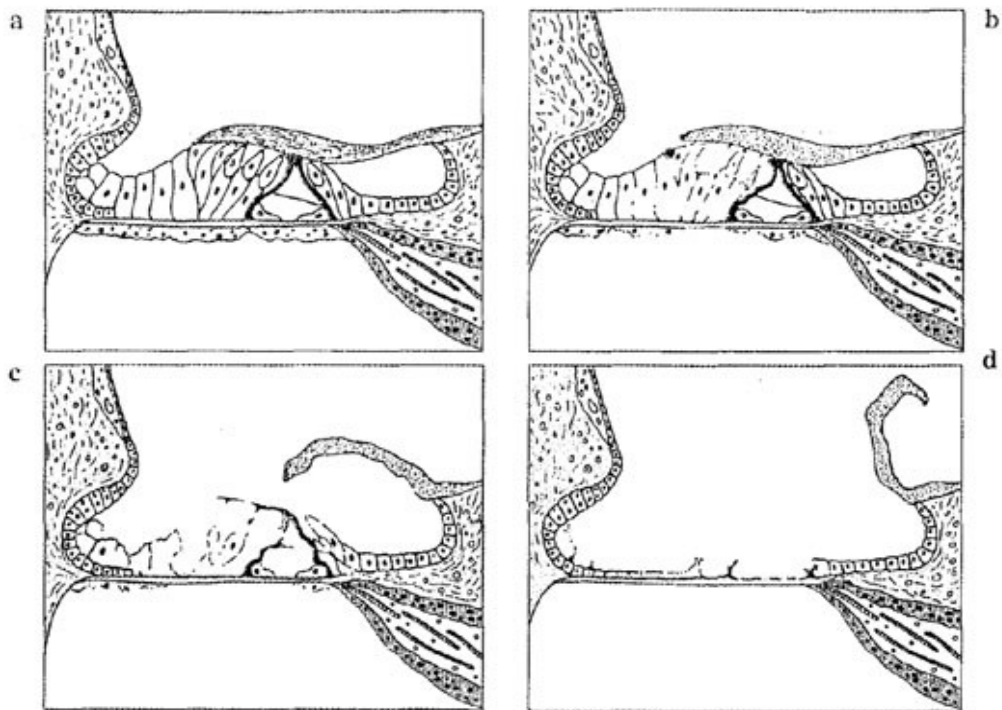
indennizzata. Dagli inizi degli anni '80, infatti, essa rappresenta oltre il 50% di tutte le malattie di natura professionale cui sono state riconosciute lesioni organiche permanenti indennizzabili. La possibilità di contrarre l'ipoacusia da rumore di natura professionale e la gravità della stessa sono in funzione delle caratteristiche fisiche del rumore presente nell'ambiente di lavoro, soprattutto del livello sonoro, del tipo di rumore (continuo o impulsivo), della durata dell'esposizione e dell'ipersuscettibilità individuale. Questi diversi fattori possono determinare singolarmente un danno uditivo negli esposti a rumore, ma generalmente agiscono contemporaneamente. A parità di durata di esposizione e di tipo di rumore il rischio di danno uditivo è direttamente proporzionale all'energia assorbita dall'orecchio (teoria dell'uguale energia). Il rumore impulsivo, inoltre, sembra essere più lesivo di quello continuo a causa della mancata protezione svolta dal riflesso stapediale. Il riflesso stapediale è dovuto alla contrazione riflessa del muscolo stapedio. Questo muscolo, riducendo il grado di affondamento della platina della staffa nella finestra ovale, protegge le strutture dell'orecchio interno da stimolazioni acustiche troppo intense. Per potersi attivare, il riflesso stapediale necessita di un tempo di latenza di circa 15 msec., che è più lungo del tempo di salita del livello di picco del rumore impulsivo, per cui in presenza di rumori impulsivi non può svolgere la sua funzione protettiva. Per quanto riguarda l'ipersuscettibilità, in corso di esposizione a rumore si è osservato che, tra i lavoratori esposti alle stesse intensità sonore per uno stesso lungo periodo di tempo, solo alcuni vanno



incontro a un'ipoacusia da rumore. Quali siano i fattori che rendono più sensibile al rumore l'apparato cocleare di alcuni soggetti non è noto. Fattori legati alla vascolarizzazione e al metabolismo delle strutture cocleari e fattori congeniti sono stati chiamati in causa di volta in volta per spiegare il fenomeno, ma senza mai poter attribuire con sicurezza ad alcuno di essi la causa del fenomeno stesso.

### **Anatomia patologica e patogenesi**

L'entità, la sede e l'estensione delle lesioni anatomopatologiche provocate negli animali (conigli, cavie, cincillà, scimmie) da uno stimolo sonoro intenso sull'organo di Corti variano in funzione della frequenza dello stimolo. Suoni a basse frequenze determinano lesioni a carico delle cellule acustiche del giro apicale; suoni ad alte frequenze le provocano a carico del giro basale, in accordo con la disposizione tonotopica delle frequenze sulla membrana basilare. Il danno interessa dapprima le cellule ciliate esterne e solo in un secondo momento quelle interne, che sono più resistenti al trauma sonoro (Fig. 5)



**Figura 5: degenerazione progressiva dell'Organo di Corti**

Le cellule acustiche appaiono inizialmente rigonfie con i nuclei picnotici; in seguito in esse compaiono vescicole e le ciglia tendono alla fusione. Con il passare del tempo le cellule ciliate vanno incontro a progressiva degenerazione e sono sostituite da un epitelio cubico monostratificato che riveste la membrana basilare. L'entità delle lesioni anatomiche risulta essere molto più elevata di quanto non sia il danno funzionale. In seguito anche le cellule nervose del ganglio di Corti che innervano le cellule acustiche danneggiate e le relative fibre nervose vanno incontro a degenerazione. E' verosimile che nell'uomo le lesioni dell'organo di Corti da stimoli sonori intensi avvengano nella stessa sede del giro basale della coclea e abbiano lo stesso decorso di quelle osservate negli animali. E' ipotizzabile inoltre che

anche nell'uomo al deficit funzionale circoscritto che si osserva inizialmente solo sulle alte frequenze corrisponda un danno cellulare che vede coinvolte non solo le alte frequenze, ma anche quelle medie e basse. E viceversa che la distruzione di cellule ciliate in una zona ristretta di coclea provochi un'alterazione funzionale anche nelle zone circostanti.

Il danno uditivo da prolungata esposizione a rumore industriale indipendentemente dalla sua composizione spettrale, in cui possono prevalere frequenze alte, medio o basse, o una loro combinazione, interessa all'inizio sempre le cellule acustiche che ricevono le frequenze 4-6 KHz, cioè quelle situate a circa 8-9 mm dalla finestra ovale. Il motivo dell'azione lesiva preferenziale del rumore su tali frequenze rimane ancora sconosciuto. Diverse ipotesi sono state formulate per interpretare il meccanismo patogenetico del danno cocleare da rumore, ma nessuna è stata confermata sperimentalmente. Secondo la teoria dell'irrigazione la lesione sui 4 KHz sarebbe da imputare a una ridotta irrorazione ematica di questa zona da parte dell'arteria cocleare, il che verrebbe a creare una zona di particolare sensibilità allo stimolo sonoro. La teoria dei vortici fa riferimento a un'iperstimolazione meccanica sulla zona dei 4 KHz a causa dei vortici che si produrrebbero al passaggio dell'onda migrante e che per rumori superiori agli 80 dB invertirebbero la loro direzione, provocando un'ipereccitazione di tale zona, cui seguirebbe la sofferenza delle cellule ciliate. Infine la lesione sui 4 KHz è stata attribuita alla notevole componente impulsiva presente nel rumore industriale. In questo caso il danno si produrrebbe in

maniera elettiva sulle cellule acustiche sensibili alle frequenze prevalenti negli stimoli impulsivi, comprese tra 4 e 8 KHz.

L'ipoacusia da rumore di natura professionale si manifesta attraverso una sintomatologia soggettiva e una tipica alterazione del tracciato audiometrico, in cui è possibile distinguere 4 stadi di progressione del danno.

— Nel primo stadio, che colpisce alcuni soggetti al momento della prima esposizione a rumore, il lavoratore riferisce la presenza di acufeni a tonalità acuta alla fine del turno di lavoro, con sensazione di orecchio pieno, cefalea e senso di intontimento. Questi sintomi permangono per 2-3 settimane. L'esame audiometrico eseguito in questa fase non mostra modificazioni della soglia uditiva rispetto a quella del tracciato eseguito prima dell'inizio dell'esposizione a rumore o può presentare un lieve innalzamento di soglia sui 4 KHz reversibile con l'allontanamento dalla lavorazione a rischio da rumore.

— Il secondo stadio è caratterizzato dalla completa assenza di sintomi soggettivi ad eccezione di qualche acufene. Questo stadio ha durata variabile di mesi o anni in funzione dell'energia sonora assorbita dall'orecchio e della sensibilità individuale al rumore. L'esame audiometrico invece, mostra un innalzamento di soglia zonale di circa 30-40 dB sulla frequenza 4KHz; possono essere interessate anche le frequenze vicine 3 e 6 KHz. (Fig. 6).

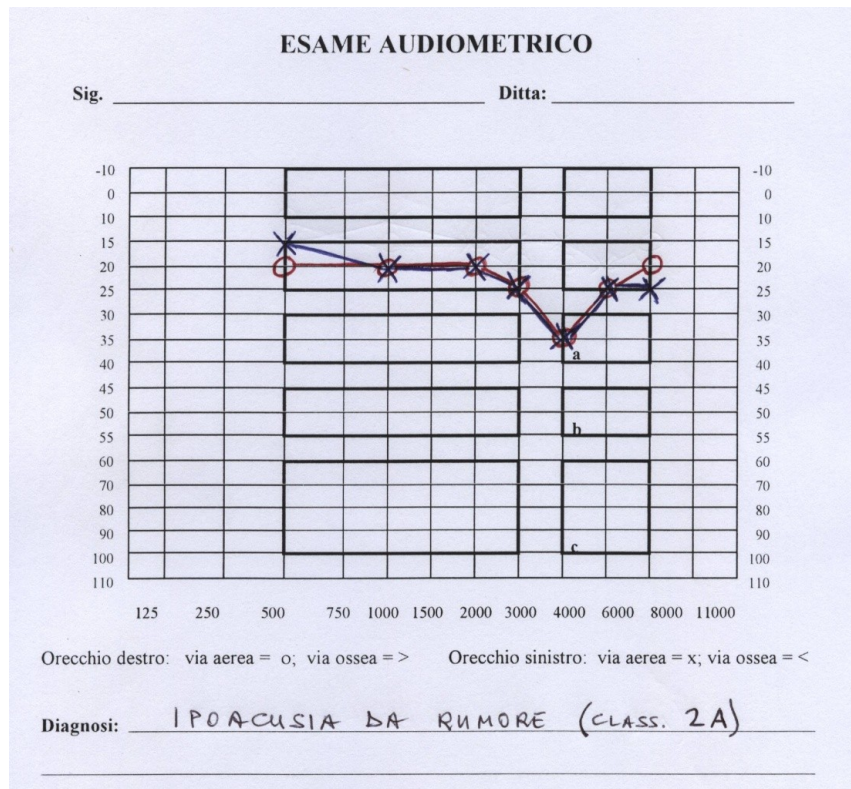


Figura 6: Iniziale ipoacusia da rumore.

— Nel terzo stadio il lavoratore riferisce di non sentire più il ticchettio dell'orologio e di aver bisogno di alzare il volume della radio e della televisione per comprendere bene le parole. Il deficit audiometrico sui 4 KHz è più elevato e può raggiungere i 45-60 dB.

- Il quarto stadio coincide con la sordità da rumore. Esso, perdurando l'esposizione professionale, sopraggiunge a distanza di qualche anno o di molti anni dallo stadio precedente. Il deficit uditivo coinvolge le frequenze più basse, quelle relative alla vita di relazione, e il lavoratore in questa fase prova difficoltà a udire la voce dei familiari e dei colleghi di lavoro. Egli spesso avverte

acufeni e i suoni sono percepiti in maniera distorta a causa del recruitment, fenomeno per cui il lavoratore non sente distinti i suoni, ma questi gli giungono come se provenissero da una radio mal sintonizzata. Inoltre a causa di esso non vi è più corrispondenza tra incremento oggettivo dell'intensità dello stimolo e aumento soggettivo della sensazione uditiva, e quest'ultima aumenta all'improvviso per piccoli aumenti dell'intensità. Da un punto di vista anatomopatologico il recruitment è dovuto alla sofferenza delle cellule ciliate esterne.

Il deficit uditivo cronico da rumore, pertanto, presenta le seguenti caratteristiche: è di tipo percettivo, bilaterale, quasi sempre simmetrico, irreversibile, nella maggior parte dei casi non evolutivo una volta terminata l'esposizione, con recruitment quasi sempre presente. L'andamento della curva audiometrica del deficit percettivo è definito a «cucchiaio», a causa della deflessione sui 4 KHz e della risalita della curva sulle frequenze più alte.

### **Diagnosi**

Condizione fondamentale e indispensabile per la diagnosi è la verifica dell'esposizione prolungata a livelli di rumore ritenuti sicuramente lesivi, cioè a livelli di rumore superiori ad un Lex,8h di 85 dBA. Queste informazioni si ottengono dall'anamnesi lavorativa, attraverso la quale è possibile conoscere le modalità (durata e livelli sonori) dell'esposizione

attuale e pregressa a rumore. Attraverso l'anamnesi è altresì importante conoscere l'esistenza di esposizioni extralavorative a rumore (caccia, sport motoristici, discoteca ecc.).

L'anamnesi patologica consente di verificare la presenza di acufeni, di ipoacusia soggettiva e di affezioni attuali o pregresse a carico dell'orecchio, quali otite, labirintite ecc., quella di traumi cranici, l'uso di farmaci ad azione tossica sul nervo acustico (streptomina, chinino, aspirina, antibiotici aminoglicosidi, diuretici ecc.). Le situazioni patologiche descritte e l'uso di tali farmaci, infatti, possono determinare un innalzamento di soglia uditiva di tipo percettivo che in qualche caso può simulare la curva da rumore ponendo dei problemi di diagnosi differenziale con quest'ultima.

L'anamnesi familiare permette di escludere la presenza di patologie ereditarie a carico dell'orecchio, quali sordità.

Tra gli accertamenti sanitari da eseguire in caso di esposizione professionale a rumore l'esame di primo livello è l'audiometria che deve presentare un innalzamento di soglia uditiva con le caratteristiche descritte in precedenza.

Il controllo di secondo livello è rappresentato dalla visita otorinolaringoiatrica che ha lo scopo di escludere la presenza di tappi di cerume nel condotto uditivo esterno e di patologie misconosciute, pregresse o in atto, a carico dell'organo dell'udito.

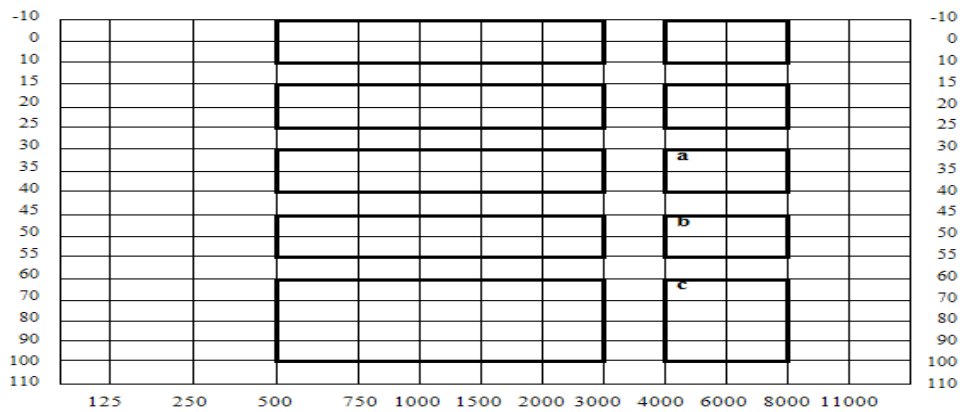
### **Classificazione delle ipoacusie da rumore.**

Le ipoacusie da rumore cronico vengono classificate in base alle

caratteristiche dell'esame audiometrico. La classificazione in atto più adoperata in Italia è la classificazione Merluzzi-Pira-Bosio (MPB), presentata a Torino nel 2002 (Fig. 7).

Il metodo MPB è così caratterizzato:

- il reticolo audiometrico è suddiviso in aree orizzontali definite da intervalli di 20,10,15,15,e 40 dB, al fine di poter meglio identificare i tracciati con alterazioni “borderline” o “lievi”.
- sono identificate due classi di normalità uditiva denominate **0 e 1a**.



<b>Classi di Ipoacusia M.P.B.</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>Dx</b>	<b>Sx</b>
Normoacusia (Classe 0)					
Normoacusia (Classe 1)					
Ipoacusia da rumore (classe 2)					
Ipoacusia da rumore (classe 3)					
Ipoacusia da rumore (classe 4)					
Ipoacusia da rumore (classe 5)					
Ipoacusia da rumore (classe 6)					
Ipoacusia non da rumore (classe 7)					
Presbiacusia (Classe 8)					
Ipoacusia mista (Classe 9)					

Figura 7: Classificazione Merluzzi-Pira-Bosio



La duplice normalità, da -10 a 10 e da 15 a 25 dB è stata dettata da due ordini di considerazioni; dalla necessità di facilitare ed invogliare maggiormente il personale esecutore a ricercare la vera soglia uditiva e non solo quella generica collocata intorno ai 25 dB, e dalla necessità di identificare preventivamente situazioni ancora comprese nella normalità ma suggestive di uno stato evolutivo o di meiopragia d'organo. Si ritiene che nei giovani al momento della assunzione sia importante ai fini preventivi, distinguere una soglia di 10dB da quella di 25dB.

- le classi della ipoacusia da rumore sono in totale 13. Esse sono indicate con numeri da **2** a **6** per indicare che progressivamente le soglie per 4, 3, 2, 1 e 0,5 kHz vengono a trovarsi oltre i 25 dB. Ogni classe, ad eccezione dalla 6 è suddivisa in tre sottoclassi indicate dalle lettere **a** **b** e **c** per indicare gradi successivi di gravità.

Ovviamente sia la progressione numerica che quella alfabetica ricalca il tipico andamento della ipoacusia da rumore e rispecchia la progressione del danno uditivo.

### **Ipoacusia da trauma acustico acuto**

È una lesione di solito monolaterale che si verifica in conseguenza di un rumore improvviso di elevata intensità. L'orecchio interessato è quello rivolto verso l'evento lesivo, mentre l'altro è protetto dalla testa che fa da schermo. A causa del trauma acustico acuto il soggetto avverte dolore violento all'orecchio, notevole ipoacusia con acufeni, vertigini per

interessamento del labirinto. In rapporto alla quantità di energia sonora liberata vi può essere anche la rottura della membrana del timpano con otorragia oltre alla lesione della struttura nervosa dell'organo di Corti; il limite oltre il quale è quasi certa la rottura del timpano è pari a 140 dBA. La membrana del timpano in seguito cicatrizza. L'ipoacusia da trauma acustico acuto per quanto riguarda l'esame audiometrico può essere definita come un deficit trasmissivo o misto, che interessa per lo più le alte frequenze, quasi sempre monolaterale, in parte reversibile, con recruitment sempre presente. La diagnosi non richiede particolari difficoltà e si basa sull'anamnesi personale, sull'esame dell'orecchio da parte dell'otorinolaringoiatra, sulla monolateralità della lesione, sulla brusca insorgenza dell'ipoacusia e sulla presenza di acufeni.

## **IL FUMO DI SIGARETTA**

La sigaretta è un oggetto di consumo tra i più diffusi nell'ambito della civiltà occidentale, ed il fumo di sigaretta è il metodo più comune di assunzione della nicotina.

Il fumo principale delle sigarette, cioè quello che viene assorbito dal fumatore, è la prima fonte di esposizione ad agenti chimici tossici e la prima causa delle malattie chimicamente mediate negli esseri umani.

### **Storia**

La nascita della sigaretta è controversa. Fu, forse, inventata dai soldati musulmani che, durante l'assedio di San Giovanni d'Acri (nell'odierno Israele) del 1831-2, pare sostituirono al narghilè i tubetti di carta svuotati della polvere da sparo. Altri ne attribuiscono l'invenzione ad alcuni soldati inglesi, sbarcati sempre a San Giovanni d'Acri nel 1840 in seguito all'azione militare contro l'Egitto. Costoro, privi di pipe e di tabacco, fabbricarono rudimentali sigarette ricorrendo a foglie di tè arrotolato.

### **Il consumo di sigarette in Italia.**

I fumatori nel mondo risultano essere circa 1,3 miliardi di persone e ogni giorno si stima che vengano fumate più di 15 miliardi di sigarette, di cui un terzo in Cina.

Da un'indagine della Doxa pubblicata nel 2007 risulta che in Italia il 23,5% della popolazione adulta (di 15 anni ed oltre) dichiara di essere fumatore (il

27,9% dei maschi e il 19,3% delle donne). In totale si parla di circa 11 milioni di persone, a cui però vanno aggiunti gli 8,8 milioni di ex fumatori (17,5%).

Il 23,3% fuma sigarette e lo 0,2% fuma esclusivamente pipa o sigari.

I fumatori si dividono in due gruppi di pari dimensione secondo il consumo medio quotidiano di sigarette: il 46% dichiara di fumare in media meno di 15 sigarette al giorno e il 46% di fumare 15 o più sigarette al giorno; il restante 8% è costituito dai cosiddetti forti fumatori, coloro i quali cioè assumano più di 25 sigarette giornaliere.

### **Composizione del fumo di sigaretta**

Il fumo di sigaretta (e generalmente di tabacco), è una miscela di gas (87%), vapori (5%) e particelle solide sospese (8%).

Il fumo derivante dalla combustione di una sigaretta contiene oltre 4.000 composti.

La maggior parte delle sostanze potenzialmente cancerogene è contenuta nel residuo del fumo ottenuto per allontanamento dell'acqua e della nicotina. Le sostanze nocive del fumo che possono danneggiare direttamente l'apparato respiratorio, ma anche indirettamente gli altri organi interni sono tra le altre: nicotina, monossido di carbonio, idrocarburi policiclici aromatici (IPA), sostanze irritanti (acroleina, acetaldeide), sostanze ossidanti, nitrosammine, cianuro e derivati, ammoniaca, aldeide formica, arsenico, nichel, cadmio, mercurio, piombo e addirittura composti radioattivi come il polonio 210.

Il fumo di sigaretta inoltre produce PM10, in modo analogo all'inquinamento da traffico.

### **Effetti sulla salute**

Nell'analisi del danno per la salute causato dall'abitudine al fumo, bisogna innanzitutto effettuare una prima distinzione tra l'effetto esercitato dal fumo attivo (quello cioè inalato dal fumatore che penetra direttamente l'organismo) e quello causato dal cosiddetto fumo passivo (quello invece costituito dalla componente volatile prodotta dalla combustione e che viene dispersa nell'ambiente, costituendo una fonte secondaria di rischio per la salute).

### ***Fumo attivo***

Il fumo attivo è certamente il più rischioso e si riferisce a chi volontariamente inala e aspira del fumo derivante da tabacco. Uno studio inglese a riguardo ha pubblicato che i non fumatori vivono in media 10 anni di più dei fumatori e che i forti fumatori hanno il 25% di possibilità in più di morire di tumore al polmone o di polmonite cronica ostruttiva. Il danno che provoca un fumatore ai propri polmoni può impiegare fino a 20 anni prima di diventare un cancro. Inoltre, più uomini che donne muoiono a causa del fumo.

Lo United States Centers for Disease Control and Prevention dichiara che il fumo è la prima causa di rischio per la salute tra i paesi sviluppati e che il

tabagismo è una delle più importanti cause di morte prematura nel mondo. Fumare può anche creare problemi se si è incinte, il feto infatti può nascere prematuro. Ma i rischi maggiore sono legati alla aterogenecità del fumo di sigaretta, che può determinare patologie a carico dell'apparato cardiovascolare, e alla sua cancerogenecità, che è ritenuta causa principale per varie neoplasie, principalmente il polmone, la laringe o la lingua.

La cancerogenecità del tabacco - più che dai componenti del tabacco stesso - deriva da processo di combustione: ogni materiale bruciato contiene infatti idrocarburi policiclici aromatici, nello specifico benzopirene. La reazione che li rende cancerogeni deriva dall'ossidazione che produce un epossido che lega col DNA covalentemente e lo distorce permanentemente. La distorsione, quindi il danneggiamento, del DNA è la causa del cancro.

Essendo la nicotina un potente stimolante, che anche se presente in piccole dosi, è sufficiente per creare una dipendenza.

Secondo la Canadian Lung Association, il fumo uccide circa 40.000 canadesi ogni anno. Il fumo è altresì importante fattore causale dell'enfisema polmonare, della bronchite cronica, dell'ipertensione, dell'infarto cardiaco e di altri danni più o meno rilevanti ad una grandissima parte degli organi del corpo umano.

### ***Fumo passivo***

Si tratta del cosiddetto fumo ambientale, quello che cioè viene disperso nell'aria dalla combustione della sigaretta.

Esso si differenzia dal fumo da flusso principale per la composizione chimica differente; questo perché il fumo attivo si forma a temperature più alte (l'aria è aspirata e attizza la fiamma) e può essere filtrato mentre passa attraverso la sigaretta.

Entrambi i flussi, sia quello prodotto dalla espirazione del fumo di sigaretta che quello prodotto dalla sua combustione, però finiscono nell'aria personale del fumatore, che subisce quindi una doppia azione tossica in parte con ricircolo, e possono coinvolgere anche soggetti non fumatori in quanto contaminanti ambientali.

Gli effetti finali saranno comunque quelli noti, ma si tratta di un ipotesi, in quanto allo stato attuale non esiste una documentazione scientifica in grado di dimostrare significativamente i singoli effetti del fumo passivo.

### **Effetti del fumo sull'apparato uditivo**

Sebbene sia nota da decenni, infatti, una maggiore incidenza di alterazioni uditive nella popolazione fumatrice, raramente viene ricordato il fumo di sigaretta tra i fattori di rischio di tali patologie.

I soggetti fumatori presentano un' incidenza quasi doppia di deficit uditivo rispetto ai non fumatori, questa percentuale sale ancora se è presente anche una esposizione a rumore occupazionale. Esiste anche una correlazione statistica con il numero di sigarette fumate.

In particolare il danno sembra agire principalmente a livello delle strutture cocleari, che sono quelle deputate all'interpretazione delle alte frequenze e

che sono maggiormente coinvolte nei processi di invecchiamento e nel danno da fonti acustiche in ambito lavorativo. Un calo uditivo a 4000 Hz è comunque presente con maggiore frequenza nei fumatori anche non esposti a rumore occupazionale.

I meccanismi responsabili del deficit uditivo sembrano essere molteplici.

Tra essi sono stati ipotizzati: un'azione vasocostrittrice sulle strutture vascolari uditive, un aumento della viscosità ematica, un'azione irritativa sulle Tube di Eustachio, un'azione degenerativa sulle cellule ciliate dell'Organo di Corti, una riduzione dell' apporto di ossigeno e persino un effetto diretto su specifici recettori cocleari.

Le alterazioni indotte dal fumo possono essere dovute anche alla formazione di radicali liberi.

Inoltre il fumo, oltre a ridurre l'apporto di ossigeno, ne aumenta il fabbisogno, perché il monossido di carbonio inalato si scambia con l'emoglobina, bloccandola.

La nicotina innanzitutto ha un'azione vasocostrittrice che sembra esercitare un effetto ischemico e atrofizzante sull'arteria labirintica, branca della cerebellare anteriore, localizzata a livello cocleare e nutritrice dell'orecchio interno e del nervo acustico. Questa degenerazione cocleare peggiora con l'età ed è resistente alla terapia. Studi recenti inoltre hanno dimostrato che la nicotina, aumentando la produzione di acetilcolina, determina un aumento della sostanza bianca a livello cerebrale, condizione associata a un deficit nella trasmissione e nella interpretazione dei suoni.



Il ruolo del monossido di carbonio nella genesi del danno acustico è legato alla capacità di tale sostanza di determinare vasocostrizione, riduzione del trasporto di ossigeno per l'aumentata affinità per l'emoglobina, aumento della viscosità ematica.

Studi recenti hanno rilevato una maggiore incidenza di disfunzioni uditive permanenti in giovani topi esposti a basse dosi di monossido di carbonio.

L'azione nociva sul sistema uditivo del fumo di sigaretta può essere potenziata dalla possibile azione sinergica delle diverse sostanze in esso contenute.

Molte delle sostanze tossiche presenti tra i componenti del fumo di sigaretta vengono utilizzate anche in alcuni cicli lavorativi industriali, comportando quindi per il lavoratore una ulteriore esposizione.

Evidenze scientifiche dimostrano che l'esposizione a solventi industriali come toluene, stirene, xylene ed etilbenzene (tutti presenti nel fumo di sigaretta) è in grado di determinare ipoacusie neurosensoriali i cui tracciati audiometrici sono del tutto sovrapponibili ai quadri classici di deficit uditivo da rumore.

## MATERIALI E METODI

L'analisi dei campioni è stata suddivisa in due fasi:

### *Fase clinica :*

L'intero campione è stato sottoposto a visita medica generale, esami ematochimici di routine, esame otoscopico, esame audiometrico tonale eseguito in cabina silente a riposo acustico da almeno 16 ore prendendo in considerazione le frequenze di 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 6000 e 8000 Hz, nonché ad ulteriori accertamenti relativi alla mansione e all'esposizione specifica, non essenziali per la nostra indagine. Per tutti i lavoratori è stata raccolta un'anamnesi particolarmente approfondita sia sull'eventuale abitudine al fumo che su problematiche pregresse riguardanti l'apparato uditivo che avrebbero potuto influenzare il campione.

Per la nostra ricerca è stato considerato come deficit uditivo la presenza di una caduta superiore ai 25 dBA in tale frequenza, escludendo quindi tutti i casi in cui vi fosse un deficit anche maggiore ma non interessante i 4 KHz.

Per i lavoratori esposti professionalmente a rischio è stata evidenziata dall'analisi del documento di valutazione dei rischi una esposizione a rumore pari a 89,1 dBA di Lex,8h come valore medio.

Il campione totale è indicato in tabella 1.

<b>Tabella 1: Analisi del campione</b>								
<b>Descrizione del campione</b>								
n. soggetti	Ipoacusia	%	Rumore	%	Fumo si	%	Fumo no	%
180	63	35	90	50	106	59	74	41

## **MATERIALI E METODI**

L'analisi dei campioni è stata suddivisa in due fasi:

### *Fase clinica :*

Tutti i dipendenti sono stati sottoposti a visita medica generale, esami ematochimici di routine, esame otoscopico, esame audiometrico tonale eseguito in cabina silente a riposo acustico da almeno 16 ore prendendo in considerazione le frequenze di 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 6000 e 8000 Hz, nonché ad ulteriori accertamenti relativi alla mansione e all'esposizione specifica, non essenziali per la nostra indagine. Per tutti i lavoratori è stata raccolta un'anamnesi particolarmente approfondita sia sull'eventuale abitudine al fumo che su problematiche pregresse riguardanti l'apparato uditivo che avrebbero potuto influenzare il campione.

Per la nostra ricerca è stato considerato come deficit uditivo la presenza di una caduta superiore ai 25 dBA in tale frequenza, escludendo quindi tutti i casi in cui vi fosse un deficit anche maggiore ma non interessante i 4 KHz.

Per i lavoratori esposti professionalmente a rischio è stata evidenziata dall'analisi del documento di valutazione dei rischi una esposizione a rumore pari a 89,1 dBA di Lex, 8h come valore medio.

Il campione totale è indicato in tabella 1.

<b>Tabella 1: Analisi del campione</b>								
<b>Descrizione del campione</b>								
n. soggetti	Ipoacusia	%	Rumore	%	Fumo si	%	Fumo no	%
180	63	35	60	50	106	59	73	41

*Fase genetica:*

### **ESTRAZIONE DI DNA**

I prelievi di sangue periferico dei pazienti esaminati, effettuati in presenza di K3EDTA come anticoagulante (1mg/ml), sono stati utilizzati per l'estrazione di DNA genomico. Gli eritrociti sono stati sottoposti a lisi osmotica per eliminare l'emoglobina e recuperare i nuclei dei leucociti, che sono stati successivamente lisati con l'1% di SDS per permettere il rilascio del DNA genomico. Il DNA è stato poi purificato tramite estrazione con fenolo-cloroformio, precipitato in etanolo e risospeso in acqua sterile. Il DNA genomico è stato successivamente quantizzato tramite lettura fluorometrica a 260 nm. Al fine di analizzare il gene per la connessina 26 è stata eseguita l'amplificazione attraverso reazione a catena della polimerasi (PCR), utilizzando primers specifici.

## **POLYMERASE CHAIN REACTION: PCR**

In ciascun campione è stata amplificata la regione in cui risiede la mutazione di nostro interesse.

La PCR è un metodo attraverso cui una sequenza di acido nucleico può essere amplificata in vitro in maniera esponenziale, ad opera di un enzima, detto Taq polimerasi, che sintetizza il DNA a partire da substrati deossinucleotidici su uno stampo a singola elica. Nel primo passaggio della PCR, il dsDNA stampo viene denaturato mediante riscaldamento ad alta temperatura. Per poter iniziare la sintesi del nuovo filamento, la Taq polimerasi necessita di un corto oligonucleotide di innesco (primer) che si appai allo stampo nelle immediate vicinanze del segmento di DNA che si vuole amplificare. È dunque necessario che le estremità della sequenza da amplificare siano conosciute con sufficiente precisione per poter sintetizzare gli oligonucleotidi che saranno ibridizzati ad esse e che fungeranno da primers. Durante la reazione di PCR, i primers assumono un doppio ruolo: nei primi cicli ciascuno di essi funziona da sonda, ovvero “cerca” lungo il genoma la sequenza specifica a cui legarsi; dopo che entrambi i primers si sono legati con il corretto orientamento e, quindi, hanno selezionato la regione da amplificare, agiscono da “vettori” dell’amplificazione. La reazione di PCR consiste, pertanto, di diversi cicli di denaturazione, annealing ed estensione, da parte della Taq polimerasi a partire dai primers, che determinano un aumento esponenziale pari a  $2^n$  molecole di DNA a doppia elica.

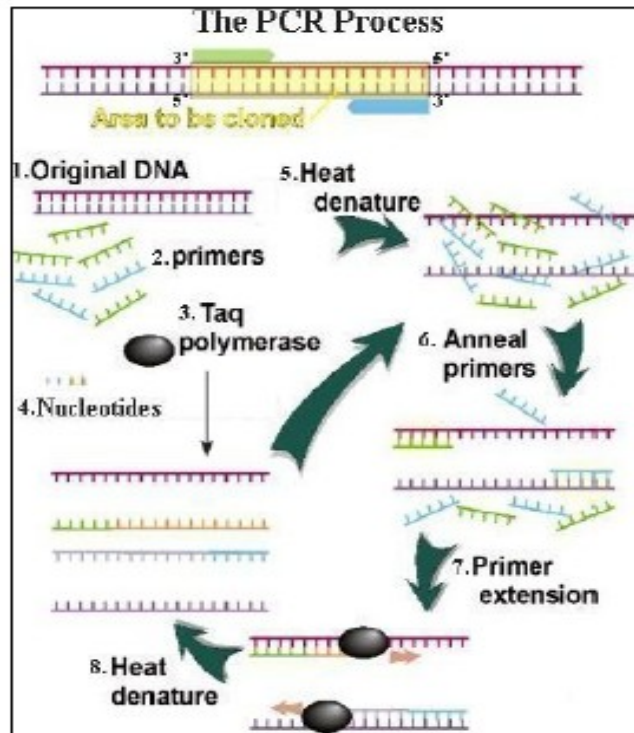


Figura : Rappresentazione schematica di una tipica reazione di PC

## SCELTA DEI PRIMERS

La scelta dei primers è sicuramente una fase cruciale per il successo e l'efficacia della reazione di amplificazione.

Il requisito fondamentale per considerare ottimale una coppia di primers, è la capacità di ibridare in modo efficiente e specifico la sequenza di interesse, con una ibridazione trascurabile nei confronti di altre sequenze presenti nel campione. I due primers hanno una distanza flessibile che può variare da 100 a 10000 paia di basi (10 Kbp), tuttavia al di sopra dei 3 Kbp si osserva una netta diminuzione dell'efficienza della reazione. La lunghezza dei

primers dovrebbe essere preferibilmente compresa tra le 20 e le 30 basi; per assicurare la specificità del processo è importante che la lunghezza non sia inferiore alle 16 basi. La sequenza nucleotidica dei primers viene stabilita in base alla sequenza di DNA di interesse, mediante l'utilizzo di specifici software. Nel nostro laboratorio si utilizza il software "Primer v. 1.1" che analizza i vari tratti del DNA da amplificare, elimina i tratti di DNA troppo ricchi in GC, quelli che hanno una temperatura di melting troppo bassa o troppo alta, quelli che presentano ripetizioni di basi o gruppi di basi. Il software permette inoltre di individuare e scartare gli oligonucleotidi che possono ripiegarsi a formare hairpin o quelli che tendono a formare dimeri o trimeri. In questo caso il programma primer ci ha permesso di verificare la qualità dei primers scelti ( Tab. 4 ) e di ottimizzare le condizioni di amplificazione.

*Primers utilizzati per l'amplificazione e il sequenziamento del gene Connessina 26*

Gene ID	bp	Primer sequence	length
NC_000013.10			
Connessina26	3338	Fw: 5'-GTGATTCCTGTGTTGTGTGC-3'	363bp
	3700	Rev: 5'-CTTCTCATGTCTCCGGTAGG-3'	

La reazione di PCR è stata da noi effettuata in un volume finale di 50 µl contenente :

- 1 µl di DNA 70 ng/µl;
- 4 µl di dNTPs 2.5 mM ciascuno;
- 1 µl di primer F (forward) 20 µM;

- 1 µl di primer R (reverse) 20 µM;
- 0.5 µl di Taq polymerase;
- 5 µl di buffer 10X;
- 1.5 µl di MgCl<sub>2</sub>;
- H<sub>2</sub>O per un volume finale di 50 µl.

Il protocollo di amplificazione, è stato eseguito in un C1000 Biorad Thermal Cycler.

Protocollo termico :

<b>Denaturazione</b>	94 °C	3 minuti	1 ciclo
<b>Denaturazione</b>	92 °C	1 minuto	35 cicli
<b>Annealing</b>	62 °C	1 minuto	
<b>Estensione</b>	72 °C	1 minuto	
<b>Estensione finale</b>	72 °C	10 minuti	1 ciclo

Gli amplificati sono stati verificati tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio all' 1% e visualizzati ai raggi UV.



## SEQUENZIAMENTO

Gli amplificati ottenuti mediante PCR a partire dal DNA genomico dei pazienti sono stati sequenziati utilizzando il *metodo di Sanger* applicato al sequenziatore automatico a capillare ABI 310 (Applied-Biosystems) ( Fig. ).



Figura : Sequenziatore automatico a capillare ABI 310 (Applied-Biosystems)

Il sequenziamento permette di ottenere la sequenza di DNA, cioè l'ordine esatto dei nucleotidi che la compongono. Il metodo di Sanger consiste nell'impiego di nucleotidi che, modificati nella loro struttura chimica (ddNTP) e marcati con fluorocromo (BigDye Terminator) vengono incorporati nella sintesi del neo-filamento da una DNA polimerasi termoresistente, la quale utilizza come innesco uno dei due primers specifici per ogni esone amplificato. I dideossinucleotiditriofato sono dei

terminatori di catena, infatti, non presentano il 3'-OH sul C3' del ribosio, quindi una volta inseriti sul filamento nascente, bloccano la reazione della Taq polimerasi in quanto, la mancanza del gruppo ossidrilico, non permette la formazione del legame fosfodiesterico 3'-5'. In questo modo si ottengono filamenti complementari fluorescenti, ognuno di lunghezza diversa, che terminano con uno dei quattro ddNTP all' estremità 3'. Questi frammenti marcati vengono separati per elettroforesi su capillare, su un polimero di poliacrilammide ( Fig. 10 ). Durante l' elettroforesi, il campione viene colpito da una sorgente luminosa (laser) che eccita i fluorofori con emissione di diverse fluorescenze che vengono rilevate da un sensore. Infine, grazie ad uno specifico software il segnale viene elaborato sotto forma di elettroferogramma. Le sequenze ottenute sono state confrontate con quella depositata in Gene Bank (NC\_000013.10).

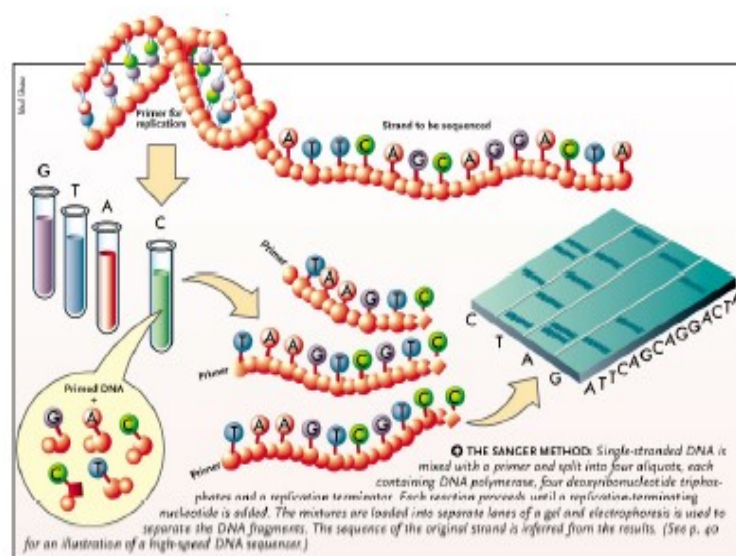


Figura : Schema della procedura di sequenziamento

## **RISULTATI.**

Del totale del campione, 180 individui di sesso maschile; 90 lavoratori (50% del totale) erano professionalmente esposti a rumore mentre i non esposti erano 90 (50%); 63 presentavano una ipoacusia rientrante nelle caratteristiche indicate in precedenza e 117 erano normoacusici; inoltre 106 soggetti (59%) presentavano attuale o pregressa abitudine al fumo e 74 (41%) erano quelli in cui tale abitudine era assente.

Il campione è stato quindi suddiviso in esposti e non esposti a rumore considerando per ciascuna classe la presenza di ipoacusie e l'abitudine al fumo.

I lavoratori sono stati quindi suddivisi in tre diverse classi d'età: fino ai 35 anni (58 soggetti: 32% del campione), dai 36 ai 50 anni (72: 40%), oltre i 50 anni (50: 28%) (Tab. 2).

<b>Tabella 1: Suddivisione per classi di età.</b>			
<b>Età</b>	<b>n. lavoratori</b>	<b>Fumatori</b>	<b>Non fumatori</b>
<b>≤ 35 anni</b>	<b>58 (32%)</b>	<b>29 (50 %)</b>	<b>29 (50 %)</b>
<b>36 – 50 anni</b>	<b>72 (40 %)</b>	<b>40 (56 %)</b>	<b>32 (44 %)</b>
<b>≥ 50 anni</b>	<b>50 (28 %)</b>	<b>38 (75 %)</b>	<b>12 (25 %)</b>

I lavoratori con abitudine al fumo, attuale o pregressa, sono stati 95, pari al 58,7 % del totale, e i non fumatori 75, 41,3 %. Esaminando l'incidenza dei fumatori tra gli ipoacusici si nota che questi rappresentano il 70,9 % tra i non esposti e ben l'81,1 % tra gli esposti. (Tab. 2).

<b>Tabella 2: Correlazione tra fumo e rumore</b>						
<b>n. soggetti</b>	<b>Ipoacusia</b>	<b>Rumore</b>	<b>Fumo si</b>	<b>%</b>	<b>Fumo no</b>	<b>%</b>
<b>90 (76 %)</b>	<b>No</b>	<b>No</b>	<b>45</b>	<b>49,3</b>	<b>56</b>	<b>50,7</b>
<b>23 (42 %)</b>	<b>Si</b>	<b>No</b>	<b>16</b>	<b>70,9</b>	<b>7</b>	<b>29,1</b>
<b>27 (24 %)</b>	<b>No</b>	<b>Si</b>	<b>14</b>	<b>48,4</b>	<b>14</b>	<b>52,6</b>
<b>40 (58 %)</b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>	<b>33</b>	<b>81,1</b>	<b>8</b>	<b>18,9</b>

Nella tabella conclusiva è possibile notare una differenza altamente significativa per la presenza di ipoacusia tra fumatori e non fumatori ed anche tra fumatori esposti e fumatori non esposti professionalmente al rumore. Dai dati esaminati ed illustrati nella tabella 4, il fumo sembra essere una causa patogenetica evidente per le ipoacusie neurosensoriali con caduta di oltre 25 dBA a 4000 hz di frequenza, indicatore valutato nella nostra indagine .

Infine, l'esame dei dati relativi alle tre ipotesi considerate, presi nel loro insieme, evidenziano un'incidenza di abitudine al fumo decisamente maggiore tra gli ipoacusici, questa, infatti, risulta essere pari rispettivamente del 49,3 % e del 48,4 % tra i normoacusici non esposti e i normoacusici esposti a rumore, mentre diventa rispettivamente del 70,9 % e dell'81,1 % tra gli ipoacusici esposti e i non esposti.

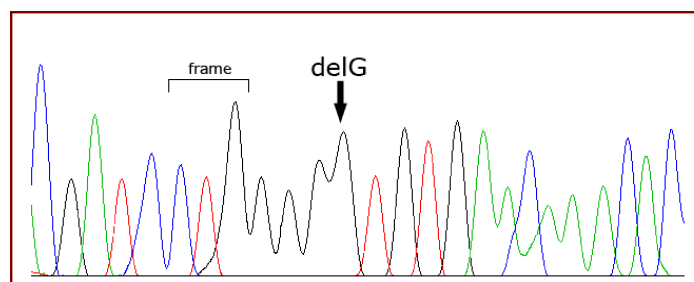
Dall'analisi dei dati riportati sono stati selezionati e reclutati due soggetti con sospetta ipoacusia genetica non lavoro correlata.

Soggetto	Ipoacusia	Età	Fumo	Rumore	Tempo di esposizione
Campione 1	Si	34	No	Si	6 anni
Campione 2	Si	30	Si	No	3 anni

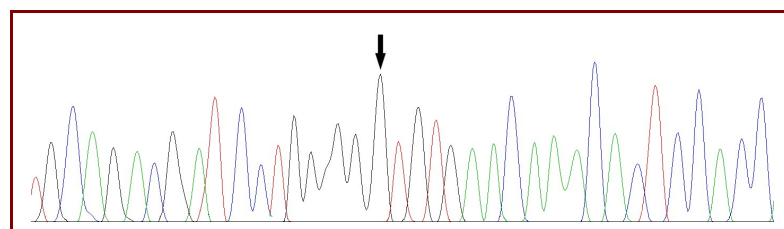
Le mutazioni individuate nei due soggetti esaminati per ipoacusia genetica sono riportate in tabella.

Campione1	Omozigosi: 35delG/35delG
Campione2	Omozigosi: 35delG/35delG

In entrambi i soggetti si è riscontrata la delezione 35delG come è possibile osservare negli elettroferogrammi sotto riportati.



Campione1



Campione2

## **CONCLUSIONI**

L'emissione del D.Lgs. 195 del 10 aprile 2006, "Attuazione della direttiva 2003/10/CE relativa all'esposizione dei lavoratori ai rischi derivanti dagli agenti fisici (rumore)", al Capo II - Obblighi del Datore di lavoro, all'art. 49-quinquies, comma 1, lett. e, ha introdotto la valutazione degli effetti sulla salute derivanti dall'interazione tra rumore e sostanze tossiche connesse con l'attività svolta. Tale decreto è stato inserito al Capo II del D.Lgs. 81 del 9 aprile 2008, Protezione dei lavoratori contro i rischi di esposizione al rumore durante il lavoro praticamente senza modificazioni. Il D.Lgs. ha introdotto, però, tra gli obblighi del Medico Competente, all'art. 25, comma 1, lett. a, quello di collaborare alla attuazione e valorizzazione di programmi volontari di "promozione della salute", e certamente, insieme all'obesità, l'abitudine al fumo è un fattore di rischio per la salute che presenta, tra l'altro, anche un affetto tossico a carico dell'Organo del Corti e delle cellule uditive determinando una ipoacusia percettiva con caratteristiche molto simili a quella da rumore professionale.

L'esistenza di un effetto sinergico tra il rumore professionale e l'abitudine al fumo nel determinismo dell'ipoacusia da rumore, è stata precedentemente dimostrata ricercando l'incidenza di ipoacusia neurosensoriale in un campione di lavoratori esposti a rumore, nei confronti di un gruppo di controllo non esposto, e i dati ottenuti sembrano dimostrare in modo incontrovertibile la correttezza della nostra ipotesi.

I risultati da noi ottenuti in questo studio evidenziano come sia stata

importante la figura del Medico Competente nell'individuare quei soggetti affetti da ipoacusia che, in seguito a visita di controllo, sono stati indirizzati ad eseguire indagini genetiche. La diagnosi di ipoacusie genetiche permetterà di attuare sistemi di prevenzione e monitoraggio mirati ai singoli lavoratori e finalizzati alla tutela e al miglioramento della qualità della vita.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Alberti PV. Noise-the most ubiquitous pollutant. *Noise Health*, 1988, 1:3-5
2. Barr GS, Coatesworth AP. Passive smoking and otitis media with effusion. *British Medical Journal*, 1991, 303:1033.
3. Bencko V, Symon K. Test on Environmental exposure to arsenic and hearing changes in exposed children. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 19, pp. 95-101, 1977.
4. Buffler PA, Crane M, Key MM. Possibility of Detecting Health Effects by studies of populations exposed to chemicals from waste disposal sites. *Environmental Health Perspectives*, 1985, 62:423-56.
5. Casula D, Merluzzi F, Spinazzola A (1982) Il rumore industriale e il danno uditivo: aspetti fisici, medici, preventivi. Atti XLV Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina del Lavoro ed Igiene Industriale. Sorrento, 21-23 ottobre. Edizioni Gutenberg, Sorrento, pp. 156-256.
6. Catalano GB (1993) Clinica otorinolaringoiatrica. Monduzzi Editore, Bologna.
7. Clarkson TW, Weiss B, Cox C. Public Health consequences of Heavy Metal in Dump Sites. *Environmental Health Perspectives*, 1983, 48:113-27.
8. Cruickshanks KJ, Klein R, Wiley TL, Nondahl DM, Tweed TS. Cigarette smoking and hearing loss. The Epidemiology of hearing loss study. *Journal of American Medical Association*, 1998, 279:1715-19.
9. Dancer AL, Henderson D, Salvi RJ, Hamernik RP (eds) (1992) Noise-induced hearing loss. Mosby Year Book Inc., St. Louis.
10. Engstrom B, Borg E (1983) Cochlear morphology in relation to loss of behavioural, electrophysiological and middle ear reflex thresholds after exposure to noise. *Acta Otolaryngol. Suppl.* 402: 1-23.



11. Eskenazi B, Castorina R. Association of prenatal maternal or postnatal child environmental tobacco smoke exposure and neurodevelopmental and behavioral problems in children. *Environmental Health Perspectives*, 1999, 107:991-1000.
12. Ferrite S, Santana V. Joint effects of smoking, noise exposure and age on hearing loss. *Occupational Medicine*, 2005, 55:48-53.
13. Giorgianni C, Tringali MA, Abbate S, D'Arrigo G, Tanzariello G, Minniti G, Abbate C. Effetti del fumo di sigaretta sull'evoluzione del danno acustico da rumore. *Giornale Italiano di Medicina del Lavoro e Ergonomia*, 2006, 28:3.
14. Godlee F. Noise: breaking the silence. *British Medical Journal*, 1992, 304:110-3.
15. Itoh A, Nakashima T, Arao H, Wakai K, Tamakoshi A, Kawamura T, Ohno Y. Smoking and drinking habits as risk factors for hearing loss in the elderly: epidemiological study of subject undergoing routine health checks in Aichi, Japan. *Public Health*, 2005, 115:192-6.
16. Key APF, Ferguson M, Molfese DL, Peach K, Lehman C, Molfese VJ. Smoking during pregnancy affects speech-processing ability in newborn infants. *Occupational and Environmental Health Perspectives*, 2007, 115:623-9.
17. Lataye R, Campo P. Cochlear pathology induced by styrene. *Neurotoxicol Teratol* 2001, 23 (1): 71-79.
18. Mac Adam DB, Siegerstetter J, Smith MCA. Deafness in adults – Screening in general practice. *Journal of the Royal College of General Practitioners*, 1981, 31, 161-164.
19. Maffei G, Miani P. Experimental tobacco poisoning: resultant structural modification of the cochlea and tuba acustica. *Irish Arch Otolaryngol*, 1962, 43:36-100.
20. Makitie AA, Pirvola U, Pyykko I, Sakakibara H, Riihimaki V, Ylikoski J. The ototoxic interaction of styrene and noise. *Hear Res*. 2003, 179(1-

2): 9-20.

21. Marchei E, Pellegrini M, Pacifici R, Zuccaro P, Pichini S - composizione chimica del fumo principale di sigaretta - Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento del Farmaco.
22. Merluzzi F, Apostoli P, Bartolucci GB, et al.: Linee guida per la sorveglianza dei danni uditivi da rumore in ambiente di lavoro. Draft. SIMLII, Torino, 27 maggio 2002.
23. Merluzzi F, Orsini S, Di Credito N, Marazzi P (1999) Rumore e udita in ambiente di lavoro, Franco Angeli, Milano.
24. Mizous T, Miyamoto T and Shimizu T. Combined effect of smoking and occupational exposure to noise on hearing loss in steel factory workers. *Occupational and Environmental*
25. Pacifici R, Rapporto Nazionale sul fumo 2006 – Osservatorio Fumo Alcol e Droga – OSSFAD – Istituto Superiore di Sanità
26. Polizzi S, Ferrara M, Pira E, Bugiani M. Exposure to low levels of solvents and noise, ear canal volume and audiometric pattern. *Giornale Italiano di Medicina del Lavoro e Ergonomia*, 2003, 3:67-8.
27. Pouryaghoub G, Mehrdad R, Mohammadi S. Interaction of smoking and occupational noise exposure on hearing loss: a cross-sectional study. *BMC Public Health*, 2007, 7:137.
28. Quaranta A, Arslan E, Ambrosi L, Henderson D (1995) Sordità da rumore. *Problematiche cliniche e medica-legali*. Ed. Ecumenica, Bari.
29. Siegelau AB, Friedman GD, Adour K, Seltzer CC. Hearing loss in adults: relation to age, sex, exposure to loud noise and cigarette smoking. *Arch Environ Health*, 1974, 29:107-9.
30. Stracan DP, Jarvis MJ, Feyerabend C. Passive smoking, salivary cotinine concentrations and middle ear effusion in 7 year old children. *Irish Medical Journal*, 1989, 85:111-2.
31. Volpin A, Saia B. Interazione tra solventi e rumore: stato dell'arte. *Giornale Italiano di Medicina del Lavoro e Ergonomia*, 2006, 28:1, 20-

- 4.
32. L. Zelante, P. Gasparini, X. Estivill, et al., Connexin 26 mutations associated with the most common form of nonsyndromic neurosensory autosomal deafness (DFNB1) in Mediterraneans, *Hum. Mol. Genet.* 6 (1997) 1605—1609.
  33. P. Gasparini, R. Rabionet, G. Barbujani, et al., High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic analysis consortium of GJB2 35delG, *Eur. J. Hum. Genet.* 8 (2000) 19—23.
  34. G. Lucotte, G. Mercier, Meta-analysis of GJB2 mutation 35delG frequencies in Europe, *Genet. Test.* 5 (2001) 149—152.
  35. G. Lucotte, F. Die'terlen, The 35delG mutation in the connexin 26 gene (GJB2) associated with congenital deafness: European carrier frequencies and evidence for its origin in Ancient Greece, *Genet. Test.* 9 (2005) 20—25.
  36. G. Mercier, C. Bathelier, G. Lucotte, Connexin 26 mutation 35delG: prevalence of carriers in various regions in France, *Int. J. Ped. Otorhinol.* 69 (2005) 1187—1190.
  37. R. Rabionet, L. Zelante, N. Lopez-Bigas, et al., Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene, *Hum. Genet.* 106 (2000) 40—44.
  38. G. Lucotte, A. Pinna, Elevated frequencies of the 35delG allele of the connexin 26 gene in Corsica, France, *Clin. Genet.* 64 (2003) 517—518.
  39. X. Estivill, P. Fortina, S. Surrey, et al., Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensineural deafness, *Lancet* 351 (1998) 394—398.
  40. ] I. Sansovic, J. Knezevic, T. Matjevic, et al., Prevalence of the 35delG mutation in the GJB2 gene of patients with non syndromic hearing loss from Croatia, *Genet. Test.* 4 (2005) 297—300.
  41. T. Antoniadis, R. Rabionet, C. Kroupis, et al., High prevalence in the

- Greek population of the 35delG mutation in the connexin 26 gene causing prelingual deafness, *Clin. Genet.* 55 (1999) 581—582.
42. O. Uyguner, M. Emiroglu, A. Uzumcu, et al., Spectrum of connexin 26 gene (GJB2) mutations in Turkish families with inherited non syndromic deafness and determination of the GJB2 35delG mutation carrier frequency in Turkish population, *Eur. J. Hum. Genet.* 9 (S1) (2001) 283.
  43. M. Tekin, N. Akar, S. Cin, et al., Connexin 26 GJB2 mutations in the Turkish population: implications for the origin and high frequency of the 35delG mutation in Caucasians, *Hum. Genet.* 108 (2001) 385—389.
  44. M. Mustapha, N. Salem, V. Delagne, et al., Autosomal recessive non-syndromic hearing loss in the Lebanese population: prevalence of the 30delG mutation and report on two novel mutations in the connexin 26 (GJB2) gene, *J. Med. Genet.* (2001), 38 e 36 electronic letter.
  45. S. Masmoudi, A. Elgaied-Boulila, I. Kassab, et al., Determination of the frequency of the connexin 26 mutations in inherited sensineuronal deafness and carrier rates in the Tunisian population using DGGE, *J. Med. Genet.* (2000) 37—m 39, electronic letter.
  46. F. Denoyelle, D. Weil, M.A. Maw, et al., Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene, *Hum. Mol. Genet.* 6 (1997) 2173—2177.
  47. R.I. Morell, H.J. Kim, L.L. Hood, et al., Mutations of the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness, *N. Engl. J. Med.* 339 (1998) 1500—1505.
  48. [17] L. van Laer, P. Coucke, R.F. Mueller, et al., A common founder for the 35delG GJB2 gene mutation in connexin 26 hearing impairment, *J. Med. Genet.* 38 (2001) 515—518.
  49. C.R. Rothrock, A. Murgia, E.L. Sartorato, et al., Connexin 26 35delG does not represent a mutational hotspot, *Hum. Genet.* 113 (2003) 18—23.

50. H. Belguith, S. Hajji, N. Salem, et al., Analysis of GJB2 mutation: evidence for a Mediterranean ancestor for the 35delG mutation, *Clin. Genet.* 68 (2005) 188—189.
51. M. Medlej-Hashim, M. Mustapha, M. Choverly, et al., Non syndromic recessive deafness in Jordan: mapping of a new locus to chromosome 9q34.3 and prevalence of DFNB1 mutations, *Eur. J. Hum. Genet.* 1 (2002) 391—394.
52. H. Shahim, T. Walsh, T. Sobe, et al., Genetics of congenital deafness in the Palestinian population: multiple connexin 26 alleles with shared origins in the Middle East, *Hum. Genet.* 110 (2002) 284—289.
53. G.A. Watterson, H.A. Guess, Is the most frequent allele the oldest? *Theor. Popul. Biol.* 11 (1977) 141—160. P.G. Cuzzo, Magna Grecia, Gallimard publisher, Paris, France, 1997 (in French)

## **INDICE**

Introduzione	pag. 3
Anatomia dell'orecchio	pag. 7
Il deficit uditivo	pag. 14
Il deficit uditivo da rumore	pag. 24
Effetti uditivi del rumore	pag. 30
Il fumo di sigaretta	pag. 43
Materiali e Metodi	pag. 50
Risultati	pag. 59
Conclusioni	pag. 62
Bibliografia	pag. 64