

377L0312

Nº L 105/10

Diario Oficial de las Comunidades Europeas

28. 4. 77

DIRECTIVA DEL CONSEJO
de 29 de marzo de 1977
sobre la vigilancia biológica de la población contra el peligro del saturnismo

(77/312/CEE)

EL CONSEJO DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea y, en particular, su artículo 235,

vista la propuesta de la Comisión,

visto el dictamen del Parlamento Europeo ⁽¹⁾,

visto el dictamen del Comité Económico y Social ⁽²⁾,

considerando que una de las tareas esenciales de la Comunidad Económica Europea consiste en promover un desarrollo armónico de las actividades económicas en el conjunto de la Comunidad y una expansión continua y equilibrada, objetivos que no pueden concebirse con independencia de la lucha contra la contaminación y los agentes nocivos, ni sin la mejora de la calidad de la vida y la protección del entorno;

considerando que las diversas utilizaciones del plomo originan actualmente la contaminación saturnina de numerosas áreas del entorno;

considerando que las múltiples fuentes difusoras de plomo presentes en el entorno hacen difícil la determinación de la exposición global de un individuo a este contaminante y, en consecuencia, que la protección de la salud del hombre requiere un control tan estricto como sea posible de la impregnación saturnina global del individuo;

considerando que es preciso poner en obra una vigilancia biológica de la población contra el riesgo del saturnismo, y evaluar los resultados de esta vigilancia con el fin de elaborar, llegado el caso, nuevas propuestas;

considerando que hace falta definir las normas técnicas y los niveles de referencia biológica para realizar esta vigilancia;

considerando que la determinación de la plombemia constituye actualmente el mejor medio de evaluar la dosis de plomo absorbida recientemente por un individuo como consecuencia de su exposición al plomo presente en el entorno, y que la actividad enzimática de la dehidratasa del ácido deltaaminolevuléhico (ALAD) puede servir de análisis indicativo o complementario para la determinación de la exposición al plomo;

considerando que el programa de acción de las Comunidades europeas en materia de medio ambiente ⁽³⁾ prevé la coordinación de los programas nacionales encaminados a mejorar la calidad de vida, así como una acción prioritaria en cuanto al plomo,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

Los Estados miembros tomarán las medidas necesarias para aplicar un procedimiento común de vigilancia biológica con el objeto de evaluar la exposición de la población al peligro del saturnismo fuera de los lugares de trabajo.

Artículo 2

Este procedimiento común, cuya aplicación se limitará a cuatro años, se basa en la medición de la plombemia.

A modo de análisis indicativo o complementario, podrá utilizarse también la medición del ALAD con arreglo a las normas especificadas en los Anexos II y III.

⁽¹⁾ DO nº C 28 de 9. 2. 1976, p. 31.

⁽²⁾ DO nº C 50 de 4. 3. 1976, p. 9.

⁽³⁾ DO nº C 112 de 20. 12. 1973, p. 3.

Artículo 3

1. Las condiciones en que se efectuará esta vigilancia biológica estarán determinadas por:

- las modalidades de muestreo y de análisis,
- la frecuencia del muestreo.

2. Las extracciones de sangre destinadas al muestreo se practicarán en voluntarios.

Artículo 4

El muestreo se realizará sobre:

- grupos de 100 personas, por lo menos, en las regiones urbanas de más de 0,5 millones de habitantes,
- grupos de 100 personas, por lo menos, en la medida en que esta cifra pueda alcanzarse, elegidas entre las poblaciones expuestas a fuentes significativas de contaminación por plomo,
- grupos críticos determinados por las autoridades competentes de los Estados miembros.

En cada Estado miembro y a lo largo de cada campaña, se efectuarán al menos 50 análisis por cada millón de habitantes.

Artículo 5

El muestreo de los grupos mencionados en el artículo 4 se efectuará a lo largo de dos campañas, por lo menos, en cada zona estudiada, durante la aplicación del programa, separadas por un intervalo de veinticuatro meses como mínimo. En la segunda campaña no se examinará necesariamente a los mismos individuos que en la primera campaña.

Artículo 6

Para evaluar los resultados de la vigilancia biológica y adoptar, si hace falta, las medidas previstas en el artículo 8, las tasas de plombemia siguientes, fijadas teniendo en cuenta las relaciones dosis-efecto que figuran en el Anexo I, serán simultáneamente consideradas como niveles de referencia:

- 20 microgramos de plomo por 100 mililitros de sangre, como máximo, para el 50 % del grupo de población examinado,
- 30 microgramos de plomo por 100 mililitros de sangre, como máximo, para el 90 % del grupo de población examinado,
- 35 microgramos de plomo por 100 mililitros de sangre, como máximo, para el 98 % del grupo de población examinado.

Artículo 7

Para la determinación de la plombemia:

- los Estados miembros comunicarán a la Comisión los nombres de los laboratorios que participen en el programa de vigilancia biológica y los métodos de análisis utilizados;
- la Comisión, en colaboración con los Estados miembros, organizará programas de intercomparación, en los que participarán los laboratorios anteriormente mencionados;
- la Comisión, en colaboración con los Estados miembros, estudiará los resultados de estos programas con el fin de mejorar la comparabilidad de los métodos de análisis.

Artículo 8

Cuando el resultado de los análisis acuse uno o varios rebasamientos de los niveles de referencia indicados en el artículo 6, los Estados miembros:

- comprobarán la validez de los resultados,
- buscarán las fuentes de exposición que provocan esos rebasamientos; esta acción afectará igualmente a todos los individuos que tengan una plombemia superior a 35 microgramos por 100 mililitros,
- tomarán las medidas apropiadas, según el criterio de sus autoridades nacionales competentes.

Artículo 9

1. Los Estados miembros designarán, dentro de los seis meses siguientes a la notificación de la presente Directiva, la autoridad nacional competente, que comunicará a la Comisión:

- los datos relativos a la vigilancia biológica de los grupos de población mencionados en el artículo 4, incluyendo indicaciones sobre los métodos de análisis, los grupos de población examinados y las zonas en que las muestras se han tomado; estos datos deberán ofrecer toda garantía en lo que atañe al respeto del anonimato de las personas examinadas; las modalidades y la forma de transmisión de estos datos serán fijadas por común acuerdo entre la Comisión y los Estados miembros,
- las informaciones sobre las causas o los factores que presumiblemente ocasionan el rebasamiento de los niveles de referencia indicados en el artículo 6.

2. La autoridad nacional competente notificará, además, a la Comisión las medidas adoptadas en virtud del tercer guión del artículo 8.

Artículo 10

La Comisión reunirá por lo menos dos veces al año a los representantes de los gobiernos de los Estados miembros, con el objeto, principalmente de:

- garantizar la ejecución armonizada de la vigilancia biológica y en particular de las disposiciones contenidas en los artículos 4 y 5,
- velar por la comparabilidad de los análisis efectuados,
- examinar las informaciones y facilitar el intercambio de informaciones entre los Estados miembros sobre los resultados obtenidos por la vigilancia biológica, así como sobre las medidas adoptadas en virtud del artículo 8.

Artículo 11

Sobre la base de las informaciones recogidas en virtud del artículo 9, la Comisión elaborará, en colaboración con las autoridades nacionales competentes:

- una memoria anual de conjunto sobre la ejecución de este programa, que será remitida a los Estados miembros, así como al Consejo y al Parlamento Europeo,

- un informe general al término de este programa que sirva de fundamento para la eventual preparación de nuevas propuestas en las que también se tendrían en cuenta los progresos conseguidos en los conocimientos científicos y técnicos.

Artículo 12

Los Estados miembros adoptarán las medidas necesarias para ajustarse a la presente Directiva dentro de un plazo de doce meses, contado a partir de su notificación e informarán de ello inmediatamente a la Comisión.

Artículo 13

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 29 de marzo de 1977.

Por el Consejo

El Presidente

T. BENN

ANEXO I

RELACIÓN DOSIS-EFECTO

Las tasas de plombemia tomadas en consideración para estimar los resultados de la vigilancia biológica se desprenden del análisis de los datos científicos referentes a los diversos efectos tóxicos del plomo. Este análisis que toma en cuenta las variaciones normales de los valores biológicos de la población permite establecer relaciones quasi cuantitativas entre dosis y efecto. La relación dosis-efecto que sigue sirve de base de referencia para la puesta en marcha de la presente Directiva:

Un decrecimiento de la actividad ALAD en los glóbulos rojos, como consecuencia de la exposición al plomo, mientras no dé lugar a una alteración en la hematopoesis, puede ser aceptada para la población. En lo que se refiere a las plombemias inferiores a 15—20 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, se considera en la actualidad que el decrecimiento de la actividad ALAD no provoca alteraciones en la hematopoesis.

El aumento de las protoporfirinas eritrocitarias (PPE) en la sangre es señal de una interferencia con la utilización del hierro, que inhibe de este modo la síntesis del hema. El aumento de los PPE interviene para tasas de plombemia superiores a 20—30 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$. Un aumento de los PPE puede ser debido sin embargo a otras causas.

La interferencia con la síntesis del glutatión sólo puede ser tolerada para una pequeña fracción de la población y solamente si es débil y no produce otras manifestaciones subclínicas. Esta interferencia inaceptable con la síntesis del glutatión no tiene lugar siempre que la tasa de plombemia sea inferior a 30 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$.

El aumento significativo de la excreción urinaria del ácido delta-aminolevulínico (ALAU) es síntoma de alteraciones importantes del metabolismo de las porfirinas y, por tanto, de salud débil. El aumento estadísticamente significativo del ALAU se manifiesta sólo para tasas de plombemia superiores a 35 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$.

ANEXO II

CORRESPONDENCIA ENTRE TASAS DE PLOMBEMIA
Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Con arreglo al artículo 2 de la presente Directiva, la correspondencia entre la tasa de plombemia y la actividad enzimática del ALAD, medida según el método europeo estandarizado (Anexo 3), es la siguiente:

| <i>Plombemia</i> ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$ sangre) | <i>ALAD</i> (unidades/litro) |
|---|---------------------------------|
| 35 | 20 |
| 30 | 25 |
| 20 | 35 |

Mientras los valores medidos del ALAD sean superiores de forma significativa a los límites indicados más arriba para las diferentes fracciones de población, no es necesario realizar nuevas mediciones de tasas de plombemia a modo de confirmación.

ANEXO III

PRESCRIPCIONES TÉCNICAS REFERENTES
A LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ALAD**Método europeo estandarizado para la determinación de la actividad de la dehidratasa del ácido delta-aminolevulínico**

El principio del método adoptado para determinar la actividad de la dehidratasa del ácido delta-aminolevulínico es bien conocido. Se basa en la incubación del enzima con un exceso de sustrato de ácido delta-aminolevulínico. El porfobilinógeno formado tras un tiempo determinado es mezclado con el reactivo de Ehrlich modificado y el color conseguido se mide mediante un fotómetro contra un blanco. La cantidad de porfobilinógeno producido es indicativa de la actividad del ALAD.

MÉTODO

Efecto de la luz

Recientes experimentos han demostrado que el porfobilinógeno es sobre todo muy sensible a la luz. Cualquier análisis debería realizarse en ausencia total de luz solar directa en el laboratorio (y no sólo en el lugar donde se efectúa el análisis).

Primera fase. — Muestras de la sangre y conservación antes del análisis

- Realizar una toma de sangre de 2 ml de sangre venosa mediante una jeringa de plástico (no estabilizada al plomo) en presencia de heparina seca (< 5 mg).
- Preparar inmediatamente cuatro extracciones de 0,2 ml distribuidas en tubos de plástico (no estabilizados al plomo) y enfriarlas a 4° C. El pipetaje se debe efectuar con pipetas graduadas de tipo Marbourg.
- Si el análisis se realiza en un plazo de 3 horas, el enfriamiento de las extracciones no es necesario.
- La duración máxima de conservación de las muestras a 4° C es de 24 horas.
- Inmediatamente antes del análisis, hay que colocar todas las muestras en un baño de agua helada durante 10 minutos.

Nota: Entre las materias plásticas a considerar, podemos citar el polietileno, el polistireno y el polipropileno. La duración de conservación de 24 horas a 4° C resulta de una estimación prudente. Este período de tiempo basta para permitir el transporte de la muestra desde el lugar de la toma de sangre hasta un laboratorio central para su análisis. De las cuatro extracciones de sangre, tres deben ser utilizadas para la determinación del ALAD y una para el test testigo.

Segunda fase. — Determinación de la hematócrito

Esta determinación se debe efectuar:

- al mismo tiempo que la toma de sangre,
- por un método capilar que utilice dos muestras.

Centrifugación después del cierre de un extremo a una velocidad de 30 000 revoluciones por minuto como mínimo (no menos de 5 minutos).

Nota: Esta determinación se debe realizar preferentemente en el mismo lugar, pero no más de 24 horas después de la toma de sangre. Utilizar si es posible una centrifugadora microhematócrita.

Tercera fase. — Hemólisis

- Hemolizar tres muestras de sangre que habrán sido previamente descongeladas con 1,3 ml de agua destilada (previamente llevada a 37° C) durante 10 minutos a 37° C \pm 0,2° C.
- Añadir el agua preferentemente con la ayuda de una pipeta graduada de 2 ml, luego mezclar muy bien.
- Llegado a este estado, no hay que agitar las muestras.

Nota: Se ha decidido utilizar agua en vez de Tritón X 100 para la hemólisis. Los experimentos de hemólisis con el Tritón X 100 llevan a un frenaje considerable de la actividad del ALAD, que todavía no ha sido explicado y que podría corresponder a un artefacto.

Cuarta fase. — Adición de la solución de ALA a la hemólisis

- Preparar la solución de ALA.
- No debe ser preparada desde más de 5 horas antes.
- Llevar esta solución a los 37° C durante al menos 10 minutos antes de la adición.
- Añadir 1 ml de dicha solución en el hemolisato, preferentemente con una pipeta de bola de 1 ml, y mezclar.

Nota: Un pH de 6,4 se ha tomado en consideración, ya que los experimentos han demostrado que a este valor de pH le corresponde la mejor correlación entre las actividades del ALAD y las tasas de plumbemia para poblaciones normales. No se trata de obtener el máximo de actividad (que se puede lograr por elevación del pH) ya que las actividades que se deben determinar son lo bastante importantes.

Quinta fase. — Preparación del testigo

- 0,2 ml de sangre tratada como para la determinación del ALAD hasta el momento de la adición de la solución ALA; en vez de ésta añadir 1 ml de solución de HgCl₂-TCA, y luego 1 ml de solución ALA, y proceder a continuación como para la determinación del ALAD (ver más abajo).
- Para la adición mencionada anteriormente, se utilizarán pipetas de soplado.

Nota: Un testigo sólo se compara con una serie de tres pruebas para cada muestra de sangre. Si la densidad óptica para el testigo es muy alta, se repetirá la operación como control.

Sexta fase. — Incubación

- 60 minutos a 37° C \pm al baño maría.
- El tiempo de incubación a partir de la adición de la solución de ALA.

Nota: El tiempo de incubación de 60 minutos se ha elegido porque aumenta de forma natural la actividad del ALAD, puesto que ninguna de las otras fases ha tenido como efecto el aumentar la actividad de forma artificial. Algunos experimentos han demostrado que la relación tiempo de incubación-actividad es lineal para periodos de tiempo que excedan de dos horas.

La temperatura de incubación se ha mantenido a 37° C por razones prácticas.

Séptima fase. — Parada de la reacción PBG

- Añadir 1 ml de solución HgCl₂-TCA a la mezcla de incubación, preferentemente con una pipeta de soplado con bola de 1 ml.

Octava fase. — Centrifugación y filtración

- 30 000 revoluciones por minuto.
- Filtración a través de papel Whatman nº 54 o equivalente (resistente al ácido).

Nota: La centrifugación debe durar alrededor de 10 minutos.

La fase de filtración ha sido introducida con el fin de evitar el pipetaje de pequeñas partículas flotando en la superficie del líquido. Dichas partículas, según parece, producen una reacción coloreada con el reactivo de Ehrlich. Varias pruebas han mostrado que la introducción de la fase de filtración mejora la reproductibilidad. La fase de filtración puede, si fuera necesario, ser sustituida por una segunda centrifugación.

Novena fase. — Reacción con el reactivo de Ehrlich

- Mezclar 1 ml de líquido que sobrenada con 1 ml de reactivo de Ehrlich modificado mediante pipetas de bola.
- Mezclar mediante un mezclador de tipo Vortex para garantizar la homogeneidad.
- Esperar durante 5 minutos a que se haga la reacción antes de medir la extinción.

Nota: Es importante, para garantizar la homogeneidad, vigilar que este líquido que sobrenada filtrado se mezcle íntimamente con el reactivo de Ehrlich.

Décima fase. — Medición de la extinción

- Se contrastará el espectrofotómetro mediante una solución de fenoltaleína en un tampón básico.
- Medición de extinción de la muestra en relación con el testigo a 555 nm en una célula de 1 cm (o de 2 cm si la absorción es muy débil).

Undécima fase. — Cálculo de la actividad enzimática

- La ecuación que permite calcular la actividad es la siguiente:

$$\frac{\text{OD corr.} \times 35 \times 2 \times 100 \times K}{\text{Hect \%} \times 60 \times 62} = \mu\text{moles ALA/mn/ml RBC} = \text{U/ml}$$

OD = extinción medida

60 = tiempo de incubación

35 = factor de dilución

62 = coeficiente molar de extinción en $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$

K = coeficiente de corrección espectrofotométrica

Nota: Las unidades propuestas son conformes a las recomendaciones referentes a la nomenclatura de las enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica.

SOLUCIONES

1. Preparación de una solución ALA

Solución A:

1,78 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ disueltos en 100 ml de agua destilada (preferentemente por deionización).

Solución B:

1,38 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ disueltos en 100 ml de agua destilada.

29 ml de solución A + 71 ml de solución B dan un tampón de 0,1 M fosfato de Na de pH 6,4.

Esta fuerza iónica de tampón es necesaria para impedir cualquier variación del pH en la solución en reacción.

167,6 mg de ALA-HCl son disueltos en la solución B (ésta debe ser siempre ácida); el pH está ajustado a 6,4 mediante la solución A. El volumen es entonces llevado a 100 ml con la solución tampón 0,1 M fosfato de Na de pH 6,4. Dicha preparación da una solución de 0,01 M ALA.

2. Solución de HgCl₂-TCA

1,35 g de HgCl₂ son disueltos en 100 ml de ácido tricloracético de 10 %.

3. Solución de reactivo de Ehrlich

Reactivos:

2,5 g de dimetilaminobenzaldeido (pDMAB),
0,25 g de HgCl₂ disueltos en 10 ml de ácido acético glacial,
ácido perclórico masa específica 1,7,
ácido acético glacial.

Preparación:

— Disolver el pDMAB en 50 ml de ácido acético, añadir 24,5 ml de ácido perclórico y 4 ml de solución de HgCl₂. Mezclar, enfriar y llevar a 100 ml con el ácido acético glacial en un matraz graduado (*). Conservar en un frasco oscuro.

Calibración:

Una calibración anual a nivel comunitario deberá verificarse a través de un laboratorio designado de común acuerdo por los Estados miembros.

(* Si una coloración morena aparece en este estado, el reactivo debe ser rechazado.