

Dettaglio di materiali e metodi

1.1 Comitato etico

Il protocollo dello studio è stato definito nel periodo “settembre – novembre 2011” e sottoposto al Comitato Etico Provinciale di Modena che ha espresso parere favorevole in data 13/12/2011.

1.2 Area di studio

L'area di indagine è stata definita come un'area circolare di 4 Km di raggio centrata sull'inceneritore, in base a considerazioni di letteratura ^(1,2) e alla numerosità della popolazione residente.

Fig. 1 Area di studio di 4Km di raggio centrato sull'inceneritore.



1.3 Periodo di studio

La fase operativa dello studio è stata condotta durante l'inverno 2012/2013 per minimizzare i problemi relativi alla stagionalità. Ha avuto inizio il 15 novembre 2012 ed ha visto la fine il 9 aprile 2013. Il prolungamento oltre la stagione invernale, è stato giustificato dalla necessità di ottenere una numerosità adeguata a fronte di una stagione invernale che, dal punto di vista climatico, si stava prolungando fino ad aprile. Per impattare il meno possibile sulla variabile “tempo di raccolta del campione” si è cercato di distribuire gli appuntamenti in base ai livelli espositivi di campionamento compatibilmente con la disponibilità dei soggetti, in modo da non creare cluster temporali importanti riferibili a soggetti con la medesima esposizione. La tabella successiva mostra come questo andamento pre-ordinato sia stato nel tempo abbastanza rispettato.

Tab.1 Distribuzione degli appuntamenti per livello espositivo di campionamento

mese intervista	Livelli espositivi				Statistica		
	1	2	3	4	Totale	Chi_2	P_Value
Nov - Dic	50 (37,59%)	35 (29,91%)	39 (35,14%)	34 (26,56%)	158	4,8069	0,5688
Gen - Feb	48 (36,09%)	47 (40,17%)	42 (37,84%)	58 (45,31%)	195		
Mar - Apr	35 (26,32%)	35 (29,91%)	30 (27,03%)	36 (28,12%)	136		
Totale	133	117	111	128	489		

1.4 Contesto geografico di studio

Per la peculiarità delle caratteristiche della zona di studio, contraddistinta da numerose fonti di inquinamento oltre all'impianto di incenerimento, si ritiene doveroso descriverne il contesto geografico. Come è possibile notare dalla mappa che evidenzia l'uso del suolo nelle immediate vicinanze dell'impianto (fig.2), il territorio che circonda l'inceneritore è caratterizzato dalla presenza di ulteriori possibili fonti emissive di natura industriale. In particolare, tutta l'area di studio (fig.1) è caratterizzata dalla presenza di diverse fonti inquinanti, non solo dovute al traffico e alle abitazioni (riscaldamento civile), ma anche dovute alla presenza di industrie.

Per studiare gli effetti delle aree industriali sul campione in studio, è fondamentale innanzitutto considerare i soggetti in base al contesto abitativo in cui risiedono; in quanto coloro i quali vivono in zone industriali o miste industriali subiscono diversamente, e per lo più direttamente, gli effetti delle emissioni dovute alla attività presenti intorno alla propria residenza.

La maggior parte delle persone analizzate nello studio, come si evince dalla tabella 2, non risiede in zona industriale, infatti solo il 3,5% di essi abita in prossimità di industrie; ma a questi si deve aggiungere anche una parte dei soggetti abitanti in zona mista (rurale/industriale e urbana/industriale).

Tab.2 Distribuzione dei soggetti campionati per tipo di zona abitativa. (Uso prevalente del suolo da cartografia AGEA 2008)

Zona abitativa	N soggetti	%
Rurale	30	6,1
Industriale/estrattiva	17	3,5
Urbana	341	69,6
Mista	102	20,8
Totale	490	100

Le aree in studio che presentano zone industriali frammiste a zone abitative sono rappresentate principalmente dal quartiere modenese "Sacca" e dalla zona "Torrazzi"; rispettivamente a ovest e ad est della concentrazione maggiore di punti campionati in figura 6. La zona che in figura 2 si presenta colorata di beige al di sotto dell'inceneritore, invece, è caratterizzata dalla presenza di attività industriali con scarsa o nulla presenza di abitazioni; per questo da quell'area non sono stati

estratti soggetti a scopo di studio. La mappa in figura 3, mostra un dettaglio del sito in questione in cui è possibile individuare alcuni insediamenti produttivi di maggiore importanza. Tali insediamenti sono tutti collocati nella zona industriale posta ad ovest della zona HERA, che occupa approssimativamente il 35-40% dell'area compresa nel raggio di 1km dall'impianto di incenerimento. Nell'area si evidenzia principalmente la presenza delle seguenti tipologie di attività:

- industrie metalmeccaniche di primaria importanza;
- industrie di lavorazione metalli;
- imprese di servizi logistici e di trasporti;

Le emissioni provenienti da questo sito è possibile che ricadano sull'ambiente residenziale confinante, anche se, per le differenti caratteristiche dei camini utilizzati in queste attività, sicuramente con traiettorie e forme differenti rispetto a quelle riferibili all'inceneritore.

L'effetto causato in atmosfera da questo e da altri insediamenti industriali importanti, deve essere indubbiamente considerato nelle analisi; sia per la presenza di una discreta percentuale di attività che emettono sostanze come quelle ricercate nel progetto (IPA e Metalli Pesanti), sia per la vicinanza di tali siti all'inceneritore, con cui condividano gli effetti delle forze degli agenti atmosferici.

Fig. 2 Mappa dell'uso del suolo nella zona di studio (cartografia AGEA 2008)

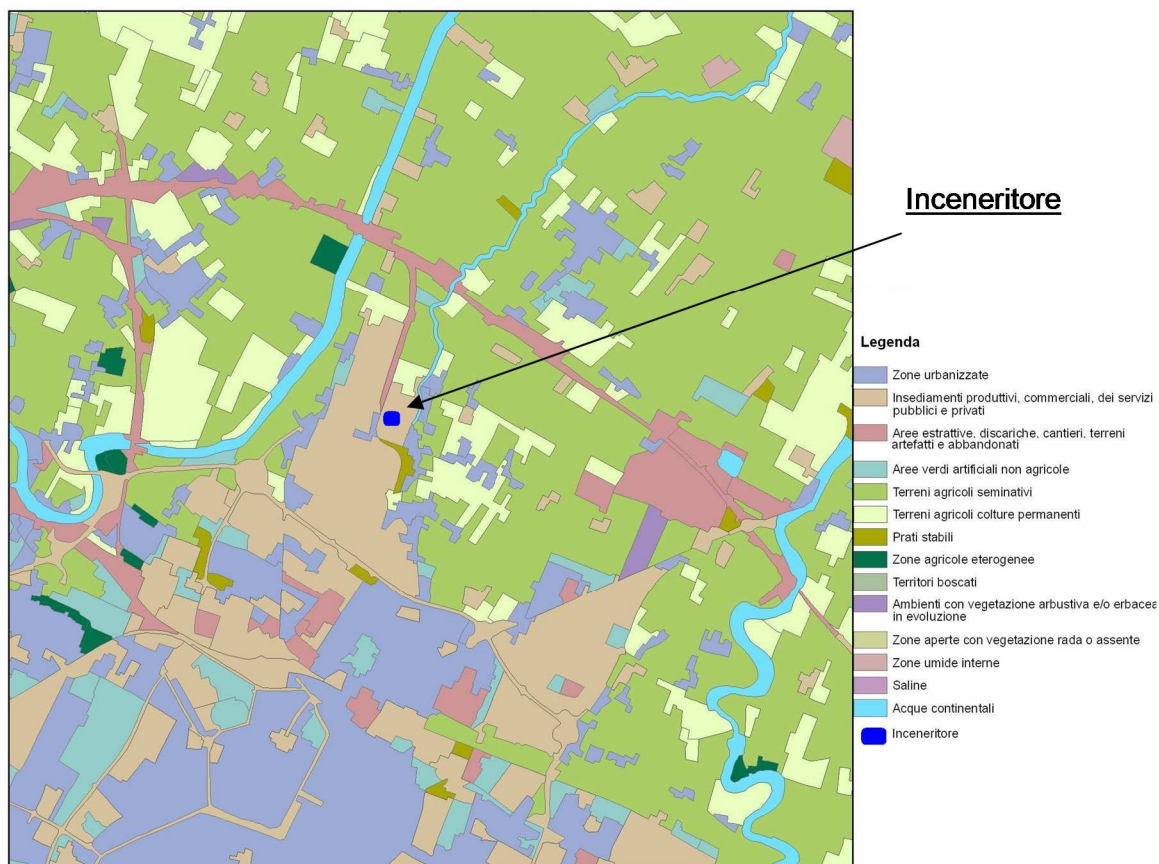
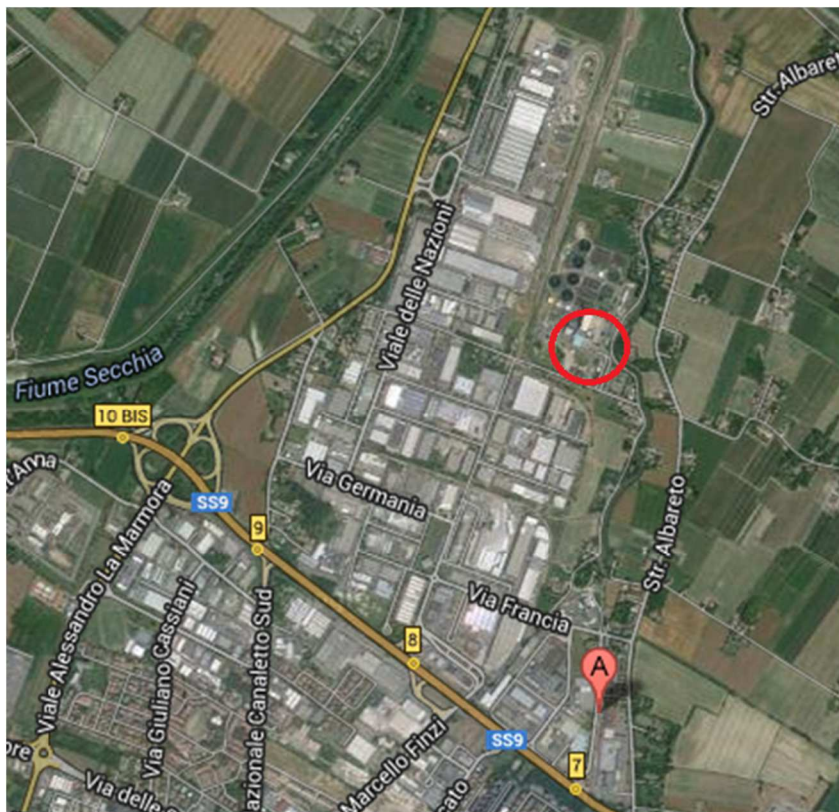
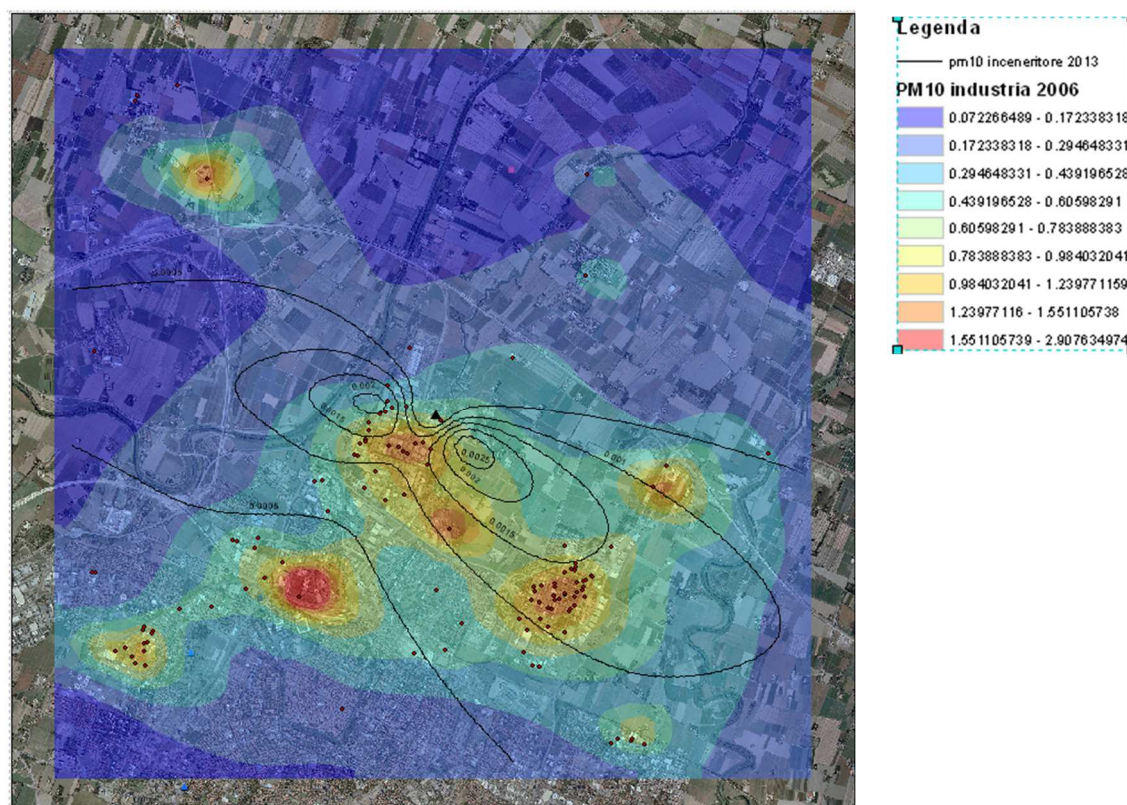


Fig. 3 Dettaglio cartografico della zona circostante 1km dall'inceneritore



La successiva mappa, mostra le ricadute provenienti dai siti industriali presenti nell'area di studio. Tale mappa descrive, in colore, i diversi gradienti delle ricadute medie annuali dell'anno 2006 provenienti dalle industrie presenti nell'area e, con una linea, le ricadute medie annuali dell'inceneritore. Da essa si evidenzia che le ricadute maggiori di tali insediamenti agiscono soprattutto nelle immediate vicinanze delle attività.

Fig. 4 Emissioni industriali nell'area di studio (PM10 emissioni medie anno 2006) e area di ricaduta delle emissioni dell'inceneritore



1.5 Disegno dello studio e campionamento

Lo studio è di tipo osservazionale cross-sectional (trasversale) ed è stato compiuto su un campione di 500 soggetti residenti entro i 4 km da inceneritore. Per la validazione della dimensione del campione, ci si è avvalsi dei risultati ottenuti dallo studio pilota ⁽¹⁾, determinando la variabilità dei marcatori scelti. I conteggi sono stati effettuati utilizzando i dati relativi solo ai marcatori con risultati significativi (IPA). La numerosità dello studio permette di evidenziare come significativo un incremento nei soggetti più esposti almeno del 40% del valore del marcatore rispetto ai soggetti meno esposti. La procedura di campionamento ha previsto: stratificazione per livello espositivo, età e sesso.

Per la creazione degli strati espositivi utili al campionamento, è stato utilizzato un approccio di tipo geografico basato su dati provenienti da modelli di dispersione degli inquinanti (simulazioni di ricaduta delle polveri dovute all'impianto di incenerimento PM10), che ha fornito da proxy per le ricadute di tutte le sostanze emesse. Le mappe di ricaduta dell'inquinamento da inceneritore sono state fornite dalla Sezione Provinciale di Modena dell'ARPA Emilia Romagna.

Per ottenere gli strati di campionamento, si è utilizzato la mappa di ricaduta media annuale del 2010 suddivisa in quartili al fine di ottenere 4 livelli e in modo da garantire il più possibile una adeguata distribuzione dei soggetti in base alle ricadute che, annualmente, non presentano importanti variazioni nella forma. Per la creazione dei livelli espositivi, invece, sono state usate le simulazioni mensili da novembre 2012 a Maggio 2013, in modo che ogni soggetto fosse associato all'esposizione del periodo di raccolta del campione. Il software utilizzato per le simulazioni è stato il modello di dispersione "quasi-gaussiano" ADMS-Urban (Cambridge Environmental Research Consultants, Cambridge, UK).

Tramite le mappe di dispersione mensili sono stati calcolati i livelli stimati di esposizione dei soggetti campionati e, per valutare l'effetto della esposizione all'impianto, la distribuzione della esposizione stimata è stata suddivisa a sua volta in quartili. Utilizzando le mappe mensili che possono presentare forme differenti tra loro, sia in base alle emissioni di inceneritore sia in base alla differente meteorologia mensile, è possibile che soggetti che abitano in zone vicine presentino livelli espositivi differenti. Questo dettaglio è evidenziato dalla mappa delle residenze campionate presentata a pagina 11, dove è presente anche la mappa utilizzata per il campionamento; invece il dettaglio relativo alle mappe mensili esposizione è consultabile in appendice 8.

Per la creazione degli strati, oltre ai 4 livelli espositivi, sono state scelte le seguenti classi di età: 18-34 aa, 35-49 aa, 50-69aa; e considerando anche il "sesso" in totale sono stati creati 24 strati all'interno dei quali sono stati campionati casualmente 21 soggetti definiti "titolari". Per garantire una celere risposta all'arruolamento e l'esecuzione dell'attività di biomonitoraggio in tempi brevi, al fine

di rendere minimi i problemi legati alla stagionalità, sono stati campionati con il medesimo procedimento 42 sostituti per ogni strato. Nessun soggetto campionato è stato escluso a priori. Solo la non disponibilità alla partecipazione e l'impossibilità a rispondere alle domande del questionario è risultata infine essere un termine di esclusione. I soggetti con problemi linguistici sono stati invitati a presentarsi con un accompagnatore in grado di "tradurre", fedelmente e in modo guidato dagli intervistatori, le domande formulate.

Per l'arruolamento del campione e l'individuazione dello strato di esposizione si è proceduto a georeferenziare le residenze. Per la georeferenziazione è stato utilizzato il software e-GeCo che fa riferimento allo stradario del database topografico regionale dell'Emilia Romagna. Le coordinate sono state espresse nel sistema "WGS84_UTM32N".

Fig. 5 Mappa di ricaduta delle emissioni di polveri dall'inceneritore: media 2010 in $\mu\text{g}/\text{m}^3$

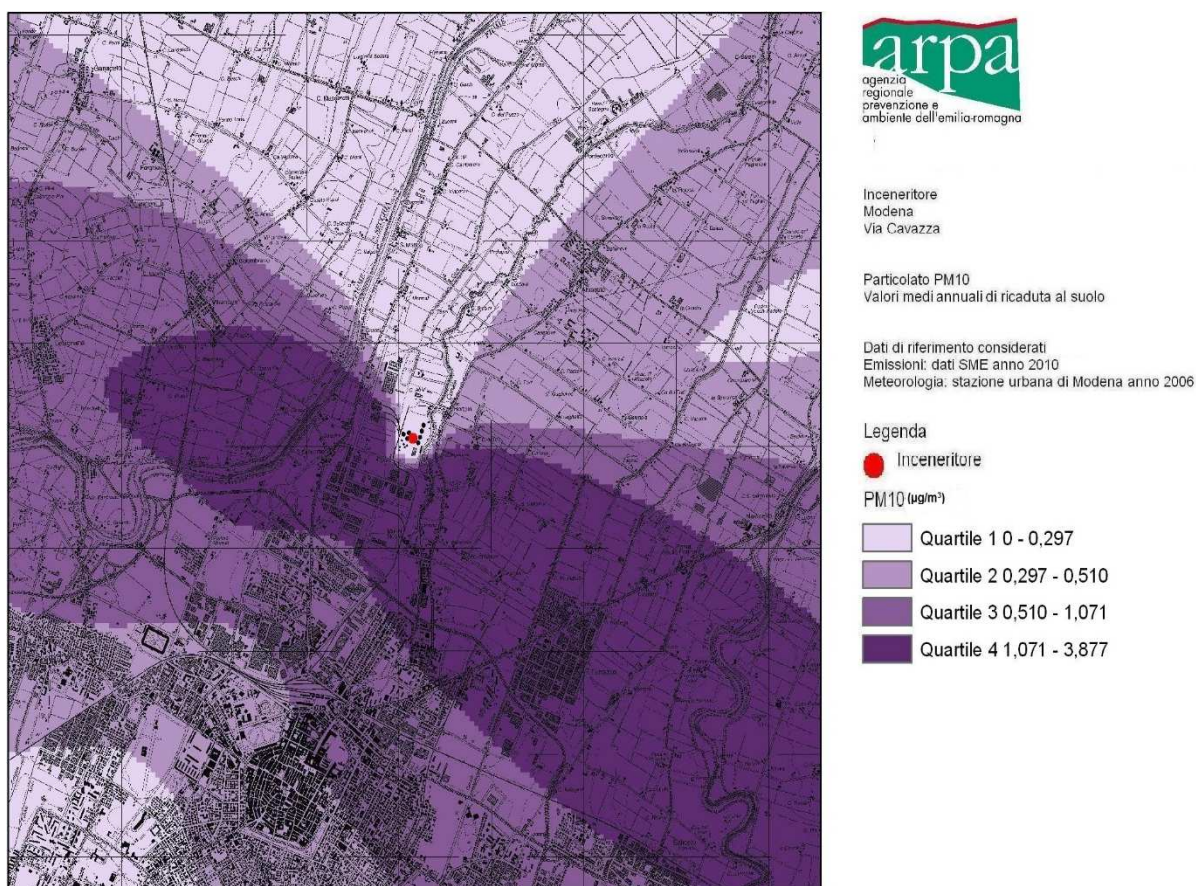
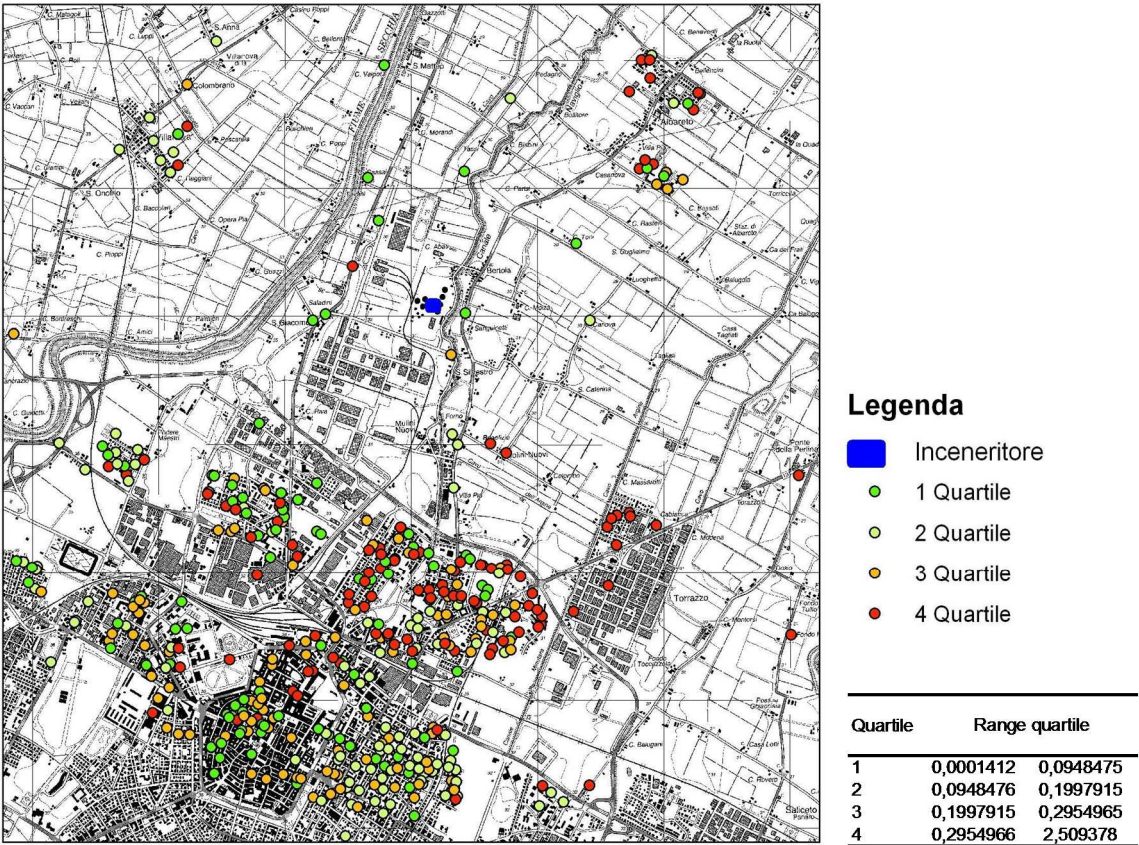


Fig. 6 Mappa di distribuzione delle residenze dei partecipanti, differenziate per colore in base ai livelli di esposizione mensile



1.6 Arruolamento del campione

A tutti i soggetti campionati è stata inviata una lettera contenente l'invito a partecipare, l'informativa sullo studio, un questionario per la rilevazioni delle esposizioni di interesse occorse la settimana precedente la raccolta delle urine, un campione per la raccolta delle urine e le istruzioni per la raccolta del campione. Prima dell'invio della lettera tutti i Medici di Medicina Generale (MMG) sono stati informati dell'avvio e della tipologia dello studio. I soggetti sono stati contattati telefonicamente per richiedere la disponibilità alla partecipazione. A chi acconsentiva veniva fissato un appuntamento per la consegna del campione e la somministrazione dei questionari. I rifiuti e i non rispondenti sono stati sostituiti in modo da ottenere omogeneità per strato. In totale hanno aderito 497 soggetti. Il tasso di risposta generale è stato del 53,5%, il tasso di non reperibilità del 19,2% e di rifiuto del 27,3%. Di seguito sono presentati in dettaglio i partecipanti per sesso, età, strato espositivo di campionamento e cittadinanza.

Tab.3 Contattati per età, sesso, strato espositivo di campionamento e cittadinanza

Variabili	Partecipanti (N 497)	Non partecipanti (N 496)	Chi2, P-value
Sesso			
M	244 (49%)	258 (52%)	
F	253 (51%)	238 (48%)	
Classe di Età			Chi2 =0,8477 p= 0,357
18-34	160 (32%)	223 (44%)	
35-49	167 (34%)	139 (28%)	
50-69	170 (34%)	134 (27%)	Chi2 = 17,1872 p = 0,000
Exp4 (mappe 2010)*			
1	133 (27%)	134 (27%)	
2	117 (24%)	126 (25%)	
3	111 (23%)	122 (25%)	
4	128 (26%)	114 (23%)	Chi2 = 1,6166 p = 0,656
Cittadinanza			
Italiana	456 (92%)	418 (84%)	
Straniera	41 (8%)	78 (16%)	Chi2=16,7225 p = 0,000
Stato estero			
Europa	1	6	
Est Europa	12	28	
Nordafrica	13	11	
Africa-resto	7	20	
Altro	8	13	

*8 soggetti mancano per fuoriuscita dall'area di studio per cambio di residenza

1.7 Scelta della matrice e degli analiti

Come già accennato in introduzione, le scelte relative all'utilizzo della matrice e degli analiti si sono basate oltre che su informazioni di letteratura ⁽¹⁻⁷⁾, anche sulle indicazioni provenienti dallo studio pilota della presente ricerca, al quale si rimanda per approfondimenti ⁽¹⁾. La scelta della matrice è nata, in particolare, da considerazioni di efficienza emerse durante il "pilota" che hanno fatto prediligere le urine al sangue, pur sapendo che non per tutti gli analiti avrebbe rappresentato la scelta ottimale. L'analisi delle urine, d'altro canto, può presentare vantaggi operativi e, in particolare per gli IPA non metabolizzati (o non idrossilati), si è mostrata, durante il "pilota", una scelta corretta; tuttavia un importante svantaggio consiste nella variabilità della concentrazione delle urine stesse. A causa della difficoltà di raccolta delle "urine delle 24-ore", metodica che avrebbe ovviato alla problematica, si è deciso di raccogliere campioni estemporanei di urina. Poiché questi campioni

risentono della variabilità della diluizione delle sostanze escrete, si è utilizzato, nei modelli di regressione, il dato di concentrazione urinaria espresso dalla "creatininuria" ⁽⁷⁾ per correggere tale effetto. Considerando gli analiti, tra gli IPA sono stati selezionati principalmente i leggeri, sia perché segnalati come maggiormente emessi dagli inceneritori di nuova generazione ⁽⁸⁾ sia perché, più dei pesanti, vengono escreti tramite le urine. Sono stati, poi, scelti principalmente i "tal quali" e non i loro composti idrossilati, perché meno passibili di problemi relati al metabolismo e quindi ai confondenti metabolici difficili da controllare in fase di analisi. I metalli, invece, sono stati selezionati cercando di ampliare il più possibile la gamma delle analisi al fine di valutare non solo la presenza di quelli maggiormente emessi dall'impianto modenese (rame, piombo, manganese...) ⁽⁹⁾ ma anche di quelli emessi in quantità mediamente inferiore. Infine è da sottolineare, che la scelta degli analiti è stata compiuta considerando primariamente l'obiettivo dello studio, mirato ad individuare indicatori di esposizione, senza necessariamente ricercare gli analiti più dannosi per la salute o quelli che vengono per normativa maggiormente controllati.

1.8 Raccolta delle informazioni e dei campioni biologici

Raccolta delle informazioni su abitudini e caratteristiche individuali

A tutti i partecipanti allo studio sono stati somministrati 3 questionari per valutare i fattori in grado di influenzare l'esposizione ai contaminanti di interesse e quindi i risultati dello studio. Un primo questionario, le cui domande erano finalizzate alla comprensione dei dati espositivi relativi alla settimana precedente la raccolta delle urine, era inserito nella lettera di invito e veniva auto-compilato a casa dagli interessati. Un secondo questionario, utile invece alla raccolta di informazioni circa lo stile di vita, i dati anagrafici e i dati relativi alla residenza, alla attività lavorativa, allo stato di salute e al consumo di farmaci veniva sottoposto in ambulatorio da operatori formati. Un terzo questionario infine, finalizzato alla raccolta delle informazioni circa l'alimentazione dell'ultimo anno, veniva autocompilato in ambulatorio ed era costituito dal questionario EPIC¹.

Raccolta e analisi dei campioni biologici

La raccolta del campione ha seguito gli step successivi. I soggetti arruolati raccoglievano, nel giorno dell'appuntamento, le prime urine del mattino in un apposito contenitore. Per la raccolta delle urine è stato utilizzato un contenitore sterile da circa 50ml in polipropilene che, previo mantenimento della catena del freddo, veniva consegnato durante il colloquio. I contenitori venivano poi in ambulatorio opportunamente identificati col numero "id" del soggetto per tutelarne la privacy e refrigerati a 4° per un tempo massimo di una settimana prima di essere congelati a -20°. I campioni, dopo la raccolta e lo stoccaggio, sono stati poi inviati al termine della fase operativa presso la Clinica del Lavoro L. Devoto di Milano dove sono state effettuate le necessarie aliquote e le misurazioni. La validità del metodo analitico è stata assicurata da controlli di qualità interni ed esterni al laboratorio. L'accuratezza dei risultati è stata determinata con standard e materiali di riferimento. In tabella sono riportati gli analiti, il limite di quantificazione per ogni analita (LoQ), le tecniche analitiche e le caratteristiche dei metodi di prova utilizzati. Per approfondimenti circa gli analiti, relativamente alle motivazioni legate alla scelta di inserimento nelle analisi, alle tecniche utilizzate o circa gli argomenti appena trattati si veda l'Appendice 1 bis.

¹ Questionario alimentare EPIC creato nell'ambito dello studio EPIC promosso dalla Agenzia Internazionale di Ricerca sul Cancro (IARC) di Lione e condotto dall'Unità Operativa di Epidemiologia Molecolare Nutrizionale dell'Istituto per lo Studio e la Prevenzione Oncologica (ISPO)

Tab. 4 Analiti, UM, tecnica analitica utilizzata, Limite di Quantificazione (LoQ), percentuale di soggetti con valori al di sopra del LoQ, Precisione CV%, Valori di Riferimento

Analiti	UM	Tecnica analitica	LoQ	n°> LoQ (%)	Precisione CV%	Valori di Riferimento		
						tutti	Non fumatori	Fumatori
Creatinina	g/L	UV	0,1		<5%	0.3-3		
cotina	µg/L	LC/MS/MS	0,1		<10%		<=30 ^a	>30 ^a
Idrossipirene	µg/L	LC/MS/MS	0,05	52	<10%		<0.5	<1.0
Naftalene	ng/L	GC/MS/MS	5,4	100	<20%	Non definito		
Acenaftilene	ng/L	GC/MS/MS	0,3	94	<10%	Non definito		
Acenaftene	ng/L	GC/MS/MS	0,6	81	<15%	Non definito		
Fluorene	ng/L	GC/MS/MS	0,9	97	<15%	Non definito		
Fenantrene	ng/L	GC/MS/MS	0,5	100	<20%	Non definito		
Antracene	ng/L	GC/MS/MS	0,4	100	<20%	Non definito		
Fluorantene	ng/L	GC/MS/MS	0,6	76	<10%	Non definito		
Pirene	ng/L	GC/MS/MS	0,4	93	<10%	Non definito		
Benzo[a]antracene	ng/L	GC/MS/MS	0,3	20	<15%	Non definito		
Crisene	ng/L	GC/MS/MS	0,2	68	<15%	Non definito		
V-U	µg/L	ICP/MS	0,05	95	<15%	0.05-0.2 ^b		
Mn-U	µg/L	ICP/MS	0,1	93	<15%	0.2-4.0 ^b		
Cr-U	µg/L	ICP/MS	0,05	77	<15%	0.05-0.35 ^b		
Cu-U	µg/L	ICP/MS	1	99	<15%	4-15 ^b		
Ni-U	µg/L	ICP/MS	0,09	94	<15%	0.1-5.0 ^b		
Zn-U	µg/L	ICP/MS	6	100	<15%	250-650 ^b		
As-U (totale)	µg/L	ICP/MS	0,1	93	<15%	<100 ^c		
Cd-U	µg/L	ICP/MS	0,03	97	<15%		0.1-1.0	0.1-1.5
Hg-U	µg/L	ICP/MS	0,1	83	<15%	0.1-5.0 ^b		
Sn-U	µg/L	ICP/MS	0,03	100	<15%	0.40-6.43 ^c		
Tl-U	µg/L	ICP/MS	0,02	92	<15%	0.05-0.5 ^b		
Pb-U	µg/L	ICP/MS	0,07	87	<15%	0.01-2.0 ^b		

GC/MS = Gascromatografo multidimensionale. ICP/MS= Spettrometria di massa a plasma

a Fustinoni e coll. Curr Anal Chem 2013;9:447–56.

b Società Italiana Valori di Riferimento (SIVR), 2011

c valori in uso routinario presso il laboratorio di tossicologia della Clinica del Lavoro, Milano

1.9 Analisi statistica e descrizione delle variabili inserite nel “corpus” dei modelli

Nelle analisi successive sono mostrati i risultati dei soli analiti per i quali la percentuale delle rilevazioni al di sotto del Limite di Quantificazione (LoQ) è risultato ottimale. Per gli analiti con percentuale di dati non quantificati superiore al 48% viene mostrata la sola l'analisi descrittiva. I dati che sono risultati inferiori al limite di quantificazione (LoQ) sono stati comunque utilizzati come valori reali ottenuti dal metodo di analisi pur avendo un grado di incertezza più ampio rispetto ai valori quantificati al di sopra del LoQ. Tale atteggiamento di analisi si giustifica per la necessità di ottenere distribuzioni migliori dal punto di vista statistico degli analiti rispetto a quelle ottenibili con il tradizionale utilizzo del valore di “LoQ/2” in sostituzione dei valori inferiori al LoQ, e per la presenza di testimonianze bibliografiche che avvalorano l'uso di questo nuovo metodo ^(10 11). La distribuzione degli analiti nei quattro livelli espositivi è stata descritta dalla percentuale al di sotto dei livelli di LoQ, dalla media aritmetica, dalla mediana e dal 25th - 75th percentile. Nelle analisi sono stati eliminati i soggetti che presentavano una concentrazione dell'analita al di sopra del 99th percentile e di creatinina urinaria superiore a 3 g/L (nessun soggetto ha presentato invece valori inferiori a 0.3 g/L). Le analisi marginali della relazione tra le variabili di interesse e gli analiti sono state effettuate utilizzando il test della mediana; mentre le analisi distributive di variabili di interesse nei 4 livelli di

esposizione ad inceneritore sono stati effettuate attraverso il test del Chi². Per ogni analita è stato stimato un modello di regressione multivariato la cui variabile dipendente è rappresentata dalla distribuzione dell'analita trasformato con il metodo Box-Cox, mentre i regressori sono stati scelti, sia basandosi sui risultati ottenuti dalle analisi marginali, sia sulla base di conoscenze di letteratura. In particolare alcune variabili inserite nei modelli sono state inserite come regressori fissi, sia per i metalli sia per gli IPA, indipendentemente dalla significatività statistica della stima dell'effetto del regressore e indipendentemente dal cambiamento dell'R² del modello con l'inserimento della variabile. Tali variabili che rappresentano il "corpus" dei modelli sono descritte qui di seguito.

Esposizione ad inceneritore: inserita come variabile a 4 livelli basata sui quartili della distribuzione dell'esposizione costruita a partire dalle mappe di ricaduta considerando l'esposizione media del mese precedente la raccolta delle urine. Per i soggetti che hanno raccolto le urine nei primi 15 giorni del mese si è utilizzato l'esposizione media del mese precedente, per coloro che si sono presentati dal giorno 16 alla fine del mese si è utilizzato la media di esposizione del mese in corso (si veda la appendice 8 per osservare le mappe mensili). (Reference Category= Livello 1)

Giorno di raccolta delle urine: inserita come funzione del giorno di raccolta attraverso l'uso di un polinomio che rappresentasse al meglio la relazione tra i livelli di analita e l'epoca di raccolta delle urine. Il grado del polinomio è stato scelto in base ai criteri d'informazione "AIC" e "BIC".

Esposizione al fumo: espresso dai livelli della variabile continua "Cotina", metabolita urinario della nicotina.

Sesso: variabile dicotomica (Reference Category= Sesso maschile)

Età: variabile continua

Titolo di studio: variabile dicotomica che esprime in due livelli il titolo di studio (basso=da nessun titolo alla licenza media inferiore/alto=dal diploma di scuola media superiore alle specializzazioni post-laurea) (Reference Category= Livello basso)

Esposizione lavorativa a metalli ed IPA: espressa da 2 variabile dicotomiche (esposizione simile alla popolazione generale /esposizione probabilmente più alta della popolazione generale) una utilizzata per i gli IPA e una per i Metalli, costruite basandosi sulla raccolta delle informazioni ottenute dal questionario relative al lavoro attuale del soggetto. In particolare sono state inserite tra le attività con più alta esposizione agli IPA i lavoratori dell'asfalto, delle industrie metalmeccaniche, delle fonderie, dell'industria che produce elettrodi, i lavoratori esposti al traffico, ai motori accesi delle automobili, agli oli lubrificanti e refrigeranti, i cuochi e i pizzaioli. Mentre tra i lavoratori maggiormente esposti a metalli sono stati inseriti in particolare oltre ai soggetti che operano in situazioni industriali con probabile esposizione a metalli anche i soggetti esposti a vernici, tinte, tinteggiature. (Reference Category= esposizione paragonabile alla popolazione generale)

Tempo trascorso in casa: espresso da una variabile dicotomica (soggetto in casa per meno di 12 ore al giorno/ soggetto in casa per più di 12 ore al giorno) (Reference Category= in casa per meno di 12 ore)

Esposizione a traffico giornaliero (traffico die): è una variabile ottenuta da alcune risposte raccolte col questionario, che individua tra coloro che hanno dichiarato di trascorrere almeno un'ora al giorno all'aperto nel periodo autunno/inverno, 3 fasce di esposizione a seconda dei luoghi frequentati prevalentemente dai soggetti secondo la seguente distinzione: esposizione bassa (aree verdi extraurbane), esposizione media (aree verdi urbane o miste urbane), esposizione alta (aree ad altro traffico). (Reference Category= Esposizione bassa)

Concentrazione delle urine: espressa dai livelli della variabile continua "Creatinina"

Zona abitativa: variabile a 4 livelli (zona rurale/residenziale/industriale/mista) costruita sulla base dell'uso del suolo prevalente attorno all'abitazione (buffer di 800 m.), utilizzando la cartografia di uso del suolo prodotta dal Servizio Sistemi Informativi Geografici della Regione Emilia Romagna (ortofoto AGEA 2008), che utilizza il sistema di classificazione CLC (Corine land Cover). Reference Category (Zona rurale). Questa cartografia, ottenuta dall'analisi di foto aeree, suddivide il territorio regionale in poligoni ed assegna a ciascuno di essi una classificazione numerica a 4 livelli (che identifica la tipologia di utilizzo del territorio entro il poligono)

Cittadinanza: variabile dicotomica (cittadino italiano/straniero) (Reference Category= Cittadino Italiano)

Indice di massa corporea BMI: variabile continua calcolata in base a peso ed altezza entrambi rilevati con misurazione in ambulatorio

Esposizione a riscaldamento civile: variabile continua ottenuta a livello di civici residenziali e basata su mappe di ricaduta degli NOx da emissioni civili (Macrosettore 2 CorinAir).

Esposizione al traffico: variabile continua che esprime la distanza tra l'abitazione del soggetto e la più vicina strada ad alto traffico (strade percorse da più di 10000 veicoli al giorno).

Temperatura: valore medio giornaliero della temperatura dell'aria misurata nella stazione di Modena appartenente alla rete regionale meteorologica urbana gestita da Arpa Emilia-Romagna.

Il corpo del modello così creato è stato poi arricchito eventualmente dall'introduzione di altri regressori relati allo stile di vita scelti, sia per evidenza di associazione con i livelli di analita emersi dalla letteratura, sia per avere evidenziato associazioni durante la conduzione dell'analisi marginale. Infine, avendo ottenuto durante l'arruolamento del campione una tasso di risposta poco elevato (53,5%), il modello è stato "corretto" attraverso l'utilizzo dell'Inverse Probability Weighting (IPW) ⁽¹²⁾. L'IPW permette di correggere l'analisi per il "selection-bias", pesando le osservazioni attraverso la probabilità di adesione allo studio. Quest'ultime si sono ottenute stimando un modello di regressione logistica contenente come variabile dipendente l'accettazione o il rifiuto di adesione da parte del

soggetto e come variabili indipendenti i fattori che si presume influiscano sul processo di selezione: il sesso, l'età e la cittadinanza.

I modelli così stimati possono essere rappresentati dalla seguente equazione:

$$Y_{trasf} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + poly(t, df) + \varepsilon$$

dove Y_{trasf} :

$$y_i^{(\lambda)} = \begin{cases} \frac{y_i^\lambda - 1}{\lambda}, & se \lambda \neq 0 \\ \ln(y_i), & se \lambda = 0 \end{cases}$$

Il valore di λ della trasformazione Box-cox (Y_{tasf}) è stato scelto in base alla massimizzazione della funzione di log-verosimiglianza del modello di regressione multivariata stimato sulla variabile dipendente non trasformata. Per ogni modello finale è stata eseguita un'analisi dei residui e i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti da un modello di regressione quantile stimato sui seguenti percentili: 10th, 25th, 35th, 50th, 65th, 75th e 90th. Le analisi sono state condotte coi software R i386 3.1.1 e Stata 11.

1.10 Particolari motivazioni alla base della scelta di alcune variabili inserite nei modelli: esposizioni a traffico, a industrie e alimentari

Variabile di esposizione al traffico attorno alla zona di residenza

Le variabili a disposizione utilizzabili relative a tale esposizione erano più di una. Le possibilità di scelta ha compreso le seguenti variabili:

- variabile di esposizione ai livelli di NOX da traffico riferibili all'anno 2006
- variabili di esposizione al traffico sulla via di casa ottenute dalle risposte fornite al questionario (si veda il paragrafo 4.2)
- variabile distanza da strade maggiori

La prima variabile in particolare è stata scartata a causa della vetustà del dato, delle seconde è stata scelta la variabile di esposizione al traffico sulla via di casa (via trafficata: si/no) validata tramite un kernel spaziale che tenesse conto della densità del campionamento e tramite una successiva sovrapposizione con mappe di traffico. Tale variabile è stata utilizzata in un primo momento nei modelli. La terza, però, è stata preferita alla seconda poiché si è ritenuta maggiormente coerente nella valutazione della esposizione al traffico attorno alla residenza.

Variabile di esposizione alle ricadute industriali

Le variabili a disposizione utilizzabili relative a tale esposizione erano più di una. Le possibilità di scelta ha compreso le seguenti variabili:

- variabile descrittiva della "Zona abitativa" ottenuta dalle risposte al questionario

-variabile descrittiva della “Zona abitativa” ottenuta dal “Servizio Sistemi Informativi Geografici della Regione Emilia Romagna” (si veda sopra)

-variabile di esposizione ai livelli di NOX industriali riferibili all'anno 2006

-variabile di esposizione ai livelli di PM10 industriali riferibili all'anno 2006

Le prima variabile stata scartata perché meno oggettiva rispetto a quella ottenuta dal “Sistema Informativo Geografico dell'Emilia-Romagna”. Questa ultima è stata poi preferita alle successive due, perché più adatta a spiegare gli effetti delle industrie nei modelli. In particolare le ultime due variabili in fase di analisi univariata presentavano un effetto protettivo rispetto alle esposizioni industriali, mantenuto anche in multivariata. Tale andamento, difficilmente spiegabile, è stato attribuito alla vetustà dei dati ma è possibile anche che altri fattori difficilmente ponderabili abbiano agito su esso come la tipologia o la variabilità delle emissioni nell'anno.

Scelta dei confondenti alimentari

Il questionario EPIC non nasce con finalità di individuazione di alimenti o gruppi alimentari come fonti di esposizione a sostanze tossiche per l'organismo. Nonostante tutto per la rilevanza che i consumi alimentari annuali hanno come fonte di metalli pesanti, la scelta dei confondenti in questo ambito di analisi ha richiesto la stima di diversi modelli per gli alimenti considerati nel questionario EPIC. Inizialmente si è costruito un unico set di covariate: esposizione, sesso, età, bmi. In seguito si è stimato un modello multivariato per valutare ogni p-esimo alimento:

$$Y_{trasf} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_k X_k + poly(t, df) + \beta_p A_p + \varepsilon \quad \text{per ogni } p = 1, \dots, h$$

dove “Y trasf” rappresenta il livello del metallo nelle urine (trasformazione Box-Cox), mentre $X_1 \dots X_k$ identificano le diverse covariate che compongono il corpo del modello e i singoli alimenti valutati. Nel modello finale si sono considerati solo gli alimenti che presentavano un effetto significativamente diverso da zero ($P < 0,05$). Per approfondimenti circa le variabili inserite nei modelli relative al consumo annuale di alimenti (EPIC) si veda l'appendice 2. Per quanto riguarda, invece, l'esposizione ad IPA e la scelta di variabili alimentari come confondenti, ci si è avvalsi principalmente del questionario di raccolta dei consumi alimentari relativi alla settimana precedente alla raccolta del campione, poichè più orientato a valutare le esposizioni (es: consumo di pizza da forno a legna o di alimenti alla brace). Solo in alcuni casi ci si è avvalsi dell'inserimento di variabili alimentari ottenute dal questionario EPIC laddove erano presenti evidenze di letteratura in merito.

1. Ranzi A, Fustinoni S, , Erspamer L et al. "Biomonitoring of the general population living near a modern solid waste incinerator: A pilot study in Modena, Italy"; Environment International 61 (2013) 88–97
2. Biancolini V, Rossi M "Linee guida per la sorveglianza degli inceneritori" Quaderni Monitor Regione Emilia Romagna, Bologna Gennaio 2014
3. Campo L, Fustinoni S, Foà V "Nuovi indicatori per il biomonitoraggio biologico dell'esposizione a Idrocarburi Policiclici Aromatici" Dipartimento di medicina del Lavoro Università degli Studi di Milano
4. Ravindra K, Bencs L, Wauters E et al. "Seasonal and site-specific variation in vapour and aerosol phase PAHs over Flanders (Belgium) and their relation with anthropogenic activities" Atmospheric Environment 40 (2006) 771–785
5. Kulkarni P, Venkataraman C, "Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Mumbai, India" Atmospheric Environment 34 (2000) 2785-2790
6. Liu, Guoqing; Tong, Yongpeng; Luong, John; et al. "A source study of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Shenzhen", South China Environmental Monitoring and Assessment, 163, 1-4, 2010
7. Barr DB, Wilder LC, Caudill SP, Gonzalez AJ, Needham LL, Pirkle JL. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements. Environ Health Perspect. 2005, 113:192-200.
8. Regione Emilia Romagna- Autori vari " Le ricadute degli inceneritori sull'ambiente: il monitoraggio nei pressi dell'impianto del Frullo di Bologna" Vol.1 Quaderni Monitor Regione Emilia Romagna, Bologna Luglio 2012
9. ARPA Sezione Provinciale di Modena, "Rapporto valutativo sull'attività di monitoraggio effettuata nell'intorno dell'area dell'impianto" Anno 2013
10. Lu S, Sobus JR, Sallsten G et al. "Are urinary PAHs biomarkers of controlled exposure to diesel exhaust?"; Biomarkers, 2014; 19(4): 332-339
11. Whitehead T, Metayer C, Petreas M,2 "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Residential Dust: Sources of Variability Environmental Health Perspectives"; volume 121, number 5 , May 2013
12. Narduzzi S, Golini MN,1 Porta D et al., L'uso dell'Inverse probability weighting (IPW) nella valutazione e correzione del selection bias";e&p: anno 38 Strumenti e metodi (5) settembre-ottobre 2014