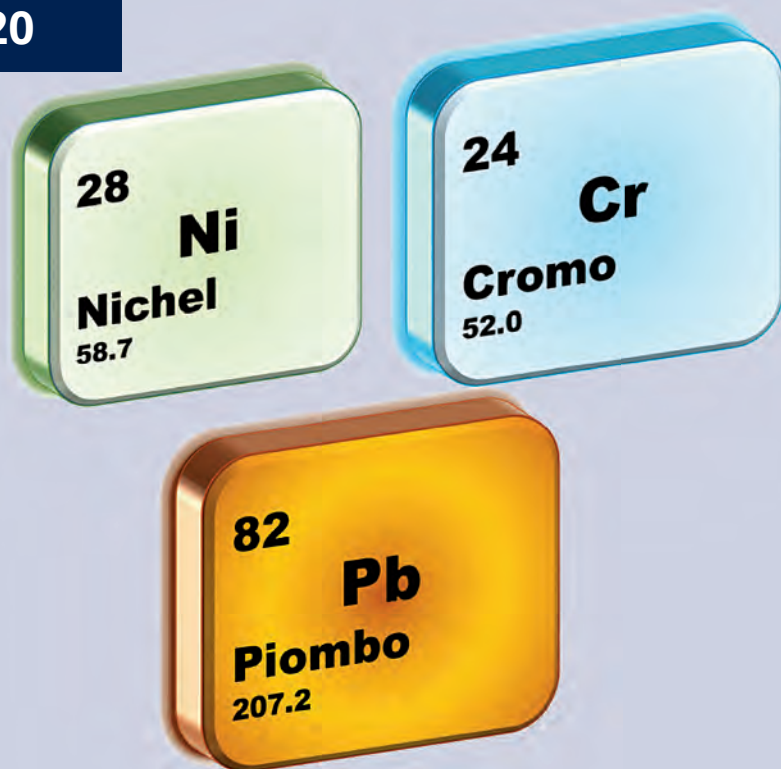


ESPOSIZIONE A METALLI

INAIL

Definizione dei valori di riferimento di cromo e nichel urinari e piombo ematico nella popolazione campana

2020



COLLANA **SALUTE E SICUREZZA**

ESPOSIZIONE A METALLI

INAIL

Definizione dei valori di riferimento di
cromo e nichel urinari e piombo ematico
nella popolazione campana

2020

Pubblicazione realizzata da

Inail

Direzione regionale Campania

Autori

Raffaele d'Angelo¹, Giuliana Genovese², Rossella Guadagni², Carlo Novi¹, Nicola Sannolo², Nadia Miraglia²

¹ Contarp - Inail, Direzione regionale Campania

² Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli, Dipartimento di medicina sperimentale, sezione di igiene, medicina del lavoro e medicina legale

per informazioni

Inail - Direzione regionale Campania
via Nuova Poggioreale Ang. San Lazzaro - 80143 Napoli
campania-contarp@inail.it
www.inail.it

© 2020 Inail
isbn 978-88-7484-177-6

Gli autori hanno la piena responsabilità delle opinioni espresse nelle pubblicazioni, che non vanno intese come posizioni ufficiali dell'Inail.
Distribuita gratuitamente. Vietata la vendita e la riproduzione con qualsiasi mezzo. È consentita solo la citazione con l'indicazione della fonte.

Indice

Presentazione	7
1. Premessa	9
2. Obiettivi	10
3. Diffusione dei metalli negli ambienti di vita e di lavoro	11
4. Monitoraggio Biologico e Valori di Riferimento	13
5. Fasi operative	16
6. Fase 1. Definizione del campione di popolazione da sottoporre ad indagine	17
6.1. Criteri di inclusione ed esclusione	17
6.2. Numerosità del campione	19
6.3. Questionario di indagine	19
7. Fase 2. Sviluppo dei metodi di campionamento e di analisi	21
7.1. Metodi di campionamento	21
7.2. Trattamento dei campioni	21
7.3. Metodi di analisi	21
7.4. Parametri strumentali	23
7.5. Analisi quantitativa	25
8. Fase 3. Validazione dei metodi di analisi	26
8.1. Linearità, accuratezza e precisione	26
8.2. Limiti di sensibilità e di quantificazione	28
8.3. Recupero	29
8.4. Stabilità	30
9. Fase 4. Arruolamento del campione di popolazione da sottoporre ad indagine	33

10. Fase 5. Monitoraggio biologico - Raccolta e analisi dei campioni biologici	34
11. Fasi 6. Creazione del database	35
11.1. Variabili raccolte mediante questionario	35
11.2. Analisi delle variabili raccolte mediante questionario	35
<i>Cromo e nichel urinari</i>	35
<i>Piombo ematico</i>	38
12. Fase 7. Elaborazione statistica dei dati del monitoraggio biologico	42
12.1. Metodi di analisi statistica	42
12.2. Elaborazione statistica dei dati di concentrazione di cromo urinario	43
<i>Campione della popolazione campana</i>	43
<i>Campione della popolazione campana stratificato per sesso</i>	44
<i>Campione della popolazione campana stratificato per classi di età</i>	46
<i>Campione della popolazione campana stratificato per abitudine al fumo</i>	49
<i>Campione della popolazione campana stratificato per provincia di residenza</i>	51
<i>Campione della popolazione campana stratificato per zona di residenza</i>	54
<i>Campione della popolazione campana stratificato per intensità di traffico</i>	57
<i>Campione della popolazione campana stratificato per consumo di molluschi e crostacei</i>	60
<i>Campione della popolazione campana stratificato per consumo di alcol</i>	62
12.3. Elaborazione statistica dei dati di concentrazione di nichel urinario	65
<i>Campione della popolazione campana</i>	65
<i>Campione della popolazione campana stratificato per sesso</i>	66
<i>Campione della popolazione campana stratificato per classi di età</i>	68
<i>Campione della popolazione campana stratificato per abitudine al fumo</i>	71
<i>Campione della popolazione campana stratificato per provincia di residenza</i>	73
<i>Campione della popolazione campana stratificato per zona di residenza</i>	76
<i>Campione della popolazione campana stratificato per intensità di traffico</i>	78

<i>Campione della popolazione campana stratificato per consumo di molluschi e crostacei</i>	81
<i>Campione della popolazione campana stratificato per consumo di alcol</i>	83
12.4. Elaborazione statistica dei dati di concentrazione di piombo ematico	86
<i>Campione della popolazione campana</i>	86
<i>Campione della popolazione campana stratificato per sesso</i>	87
<i>Campione della popolazione campana stratificato per classi di età</i>	89
<i>Campione della popolazione campana stratificato per abitudine al fumo</i>	92
<i>Campione della popolazione campana stratificato per provincia di residenza</i>	95
<i>Campione della popolazione campana stratificato per zona di residenza</i>	98
<i>Campione della popolazione campana stratificato per intensità di traffico</i>	101
<i>Campione della popolazione campana stratificato per consumo di molluschi e crostacei</i>	104
<i>Campione della popolazione campana stratificato per consumo di alcol</i>	107
13. Fase 8. Definizione dei valori di riferimento	111
Bibliografia	117

Presentazione

Negli ultimi anni, sebbene sia progressivamente diminuita la concentrazione di tossici industriali negli ambienti di lavoro, la popolazione è sempre più esposta a xenobiotici attraverso l'ambiente, beni di consumo di vario genere, alimenti e adozione di abitudini di vita - quali consumo di tabacco o specifiche diete alimentari. Questo non solo rappresenta una delle maggiori preoccupazioni della sanità pubblica, ma, determinando un incremento dei livelli di background dei biomarcatori comunemente adoperati per valutare l'esposizione professionale, rende complicato il riconoscimento del nesso di causalità tra lo sviluppo di specifiche patologie e l'esposizione professionale.

È questo il caso di lavoratori esposti a piombo, nichel e cromo, oggetto dello studio descritto nel presente opuscolo; tali metalli, infatti, sono ormai inquinanti ubiquitari, pertanto si è assistito negli ultimi anni ad un decremento delle concentrazioni dei biomarcatori misurati nei fluidi biologici dei lavoratori esposti e un aumento di quelle misurate nella popolazione generale.

La discriminazione tra esposizione professionale e non professionale diventa, quindi, compito arduo per i professionisti del settore, agevolato dal confronto tra i dati di monitoraggio biologico dei lavoratori a rischio e i valori di riferimento, intesi come le concentrazioni dei biomarcatori nei fluidi biologici della popolazione non esposta professionalmente ad uno xenobiotico.

In tale contesto non deve essere però trascurato un altro aspetto e cioè che i livelli di industrializzazione ed urbanizzazione e, quindi, l'inquinamento ambientale, così come le abitudini di vita variano in base all'area geografica; di conseguenza, varia anche la diffusione degli xenobiotici negli ambienti di vita e, quindi, il loro assorbimento da parte della popolazione e la concentrazione dei biomarcatori nei fluidi biologici, influenzata anche da età e sesso.

Poiché si è ravvisata nel corso degli anni la necessità di disporre di valori di riferimento che tenessero in opportuna considerazione tali variabili, la Contarp dell'Inail - Direzione regionale per la Campania - avvalendosi della collaborazione del Dipartimento di Medicina sperimentale-Sezione di Igiene, Medicina del lavoro e Medicina Legale, Area di Medicina del lavoro, dell'Università degli studi della Campania "Luigi Vanvitelli" ha voluto realizzare questo opuscolo, per fornire una solida base scientifica per dirimere casi di denunce di malattie professionali posti all'attenzione dell'Inail a seguito di presunte esposizioni professionali ai metalli in

esame, sia per stabilire l'eventuale presenza di un rischio incrementale per la salute dovuto all'attività lavorativa.

L'attenzione del gruppo di studio è stata focalizzata sulla definizione di valori di riferimento di marcatori biologici dei metalli oggetto di studio (piombo ematico e cromo e nichel urinari) nella popolazione campana in età lavorativa, non professionalmente esposta a cromo, nichel e piombo.

I risultati ottenuti non solo hanno consentito di raggiungere gli obiettivi prefissi, ma suggeriscono anche potenziali filoni di studio per la delucidazione del rapporto tra fattori confondenti ed esposizione non professionale a cromo, nichel e piombo.

Raffaele d'Angelo
*Coordinatore Contarp
Inail, Direzione regionale Campania*

Nadia Miraglia
*Professore associato
Dipartimento di Medicina sperimentale
Università degli studi della Campania
"Luigi Vanvitelli"*

1. Premessa

L'introduzione nella legislazione italiana dei principi di tutela della salute dei lavoratori, così come previsto dal d.lgs. 81/08 e s.m.i., impone la valutazione dei rischi per la salute nei luoghi di lavoro, che può essere eseguita avvalendosi di indagini di monitoraggio biologico effettuate dosando opportuni indicatori.

Nel caso dei rischi per la salute a seguito di esposizione professionale a piombo, cromo e nichel, il monitoraggio biologico può essere condotto adoperando piombo ematico e cromo e nichel urinari quali biomarcatori in grado di riflettere i livelli espositivi dei lavoratori.

Negli ultimi anni, si è constatata una progressiva diminuzione della concentrazione di tossici industriali negli ambienti di lavoro, con conseguente decremento delle concentrazioni dei biomarcatori misurati nei fluidi biologici dei lavoratori esposti; per contro, i livelli di inquinamento ambientale e l'adozione di abitudini di vita - quali il consumo di tabacco o specifiche diete alimentari - comportano nella popolazione generale un rilevante assorbimento di agenti tossici, determinando significativi livelli di *background* dei biomarcatori comunemente adoperati per valutare l'esposizione professionale. Da qui scaturisce la difficoltà nel riconoscimento del nesso di causalità tra lo sviluppo di specifiche patologie e l'esposizione professionale.

Un valido supporto nel discriminare tra esposizione professionale e non professionale è fornito dal confronto tra i dati provenienti dal monitoraggio biologico dei lavoratori a rischio e i valori di riferimento, ovvero le concentrazioni dei biomarcatori nei fluidi biologici della popolazione non esposta professionalmente ad uno xenobiotico.

2. Obiettivi

Il presente progetto è volto alla definizione di valori di riferimento di marcatori biologici (piombo ematico e cromo e nichel urinari) nella popolazione campana, non professionalmente esposta a cromo, nichel e piombo, al fine di fornire una solida base scientifica in grado di contribuire da un lato a dirimere casi di denunce di malattie professionali posti all'attenzione dell'Inail a seguito di presunte esposizioni professionali ai metalli in esame e dall'altro a stabilire l'eventuale presenza di un rischio incrementale per la salute dovuto all'attività lavorativa.

Poiché inquinamento ambientale ed abitudini di vita cambiano secondo la collocazione geografica, così come la concentrazione dei biomarcatori può variare in relazione al sesso e all'età, la definizione di valori di riferimento che tengano in opportuna considerazione tali variabili comporta l'analisi di un elevato numero di campioni biologici.

Brevemente, il raggiungimento dell'obiettivo prefisso ha previsto:

- l'arruolamento nello studio di un numero significativo di soggetti, residenti nelle cinque province campane, non professionalmente esposti a cromo, nichel e piombo;
- la determinazione, mediante spettroscopia di assorbimento atomico, della concentrazione di cromo e nichel urinari e di piombo ematico nei fluidi biologici dei soggetti arruolati;
- la definizione dei valori di riferimento dei marcatori biologici esaminati.

3. Diffusione dei metalli negli ambienti di vita e di lavoro

L'esposizione della popolazione agli xenobiotici può avvenire attraverso l'ambiente, gli alimenti e i beni di consumo e può essere incrementata, anche in maniera rilevante, dall'attività lavorativa svolta.

Nel caso specifico dei metalli, numerose sono le fonti di inquinamento che si riscontrano nell'ambiente (aria, acqua, suolo, con conseguente contaminazione del cibo) e nei luoghi di lavoro.

Nel presente progetto, tra i metalli maggiormente diffusi e di nota pericolosità, sono stati scelti cromo, nichel e piombo (cromo VI e nichel sono agenti cancerogeni ed il piombo, tra l'altro, influenza il sistema nervoso centrale e la sintesi dell'eme), quali agenti di rischio per cui definire i valori di riferimento (VR) della popolazione, in termini, rispettivamente, di cromo e nichel urinari e piombo ematico.

Il **piombo** si ritrova in natura sotto forma di solfuro nel minerale chiamato galena e come carbonato e solfato in minerali di secondaria importanza (cerussite e anglesite, rispettivamente). I suoi composti vengono estratti dai minerali che lo contengono e, poi, trattati per produrre piombo metallico.

L'assorbimento del piombo da parte della popolazione generale dipende essenzialmente da fattori antropici quali: la contaminazione dell'ambiente attraverso scarichi industriali e materiali di scarto (recuperati da vari processi industriali e poi fusi); l'utilizzo di benzine contenenti piombo, che ha largamente caratterizzato il secolo scorso; l'abitudine al fumo di sigaretta; l'uso di oggetti in cui il piombo è presente, anche se in piccole quantità, in quanto adoperato nelle leghe metalliche che costituiscono l'oggetto stesso oppure come rivestimento, pigmento o sostanza schermante (cavi elettrici, tubi, serbatoi, recipienti in ceramica, tappi metallici, apparecchi per i raggi X, vernici, ecc.).

Accanto alle fonti di esposizione extra-professionale, si ritrovano numerose attività lavorative che comportano esposizione professionale a piombo, tra cui: fabbricazione o uso di vernici e smalti; fabbricazione di materie plastiche, di accumulatori di automobili, batterie, proiettili e munizioni; industrie di fusione del metallo e di produzione di leghe contenenti piombo; operazioni di saldatura; lavorazioni del cristallo e del vetro; industria della ceramica (limitatamente alla vetrificazione delle terraglie e alla decolorazione con vernici al piombo); costruzione e riparazione di

automobili; zincatura delle lamiere o stagnatura; fabbricazione di lastre per la protezione ai raggi X; industria metallurgica dell'acciaio, ecc.

Il **cromo** in natura si ritrova prevalentemente negli stati di ossidazione II, III e VI e viene estratto sotto forma di cromite. Come per il piombo, l'attività antropica è la causa principale di inquinamento da cromo; esso viene adoperato: in metallurgia per fornire resistenza alla corrosione e lucidità al rivestimento; nell'industria chimica per la produzione di conservanti del legno, coloranti, smalti e vernici; nella concia delle pelli, come catalizzatore nelle tinture e nell'annerimento del cuoio; nelle operazioni di cromatura; in leghe quali l'acciaio inossidabile. Combustione ed emissioni in atmosfera dovute al traffico veicolare costituiscono importanti fonti di inquinamento sia dell'atmosfera sia delle acque superficiali. Attraverso la deposizione dei rifiuti, il cromo, inoltre, penetra il terreno, dove tende a legarsi fortemente alle particelle del suolo. Analogamente al piombo, infine, il cromo si ritrova nel fumo di sigaretta.

La maggior parte del **nichel** presente sulla terra è intrappolato nel nucleo fuso ferro-nichel del pianeta, formato dal 10% di nichel. Esso si trova unito allo zolfo nella millerite e unito all'arsenico nella niccolite. I minerali da cui il nichel viene estratto sono prevalentemente solfuri del ferro-nichel, come la pentlandite.

Il nichel e i suoi composti sono ampiamente utilizzati nell'industria metallurgica, metalmeccanica e galvanica, principalmente nella preparazione delle leghe metalliche, cui conferisce duttilità e resistenza alla corrosione e al calore; è adoperato anche per produrre acciaio inossidabile, acciai legati, batterie ricaricabili, catalizzatori, prodotti di fonderia e placcatura e nella coniazione.

Fonti espositive extraprofessionali possono essere la combustione di materiali organici che ne assorbono e trattengono considerevoli quantità, l'incenerimento di rifiuti solidi urbani, il consumo di acqua potabile e di alcuni alimenti (ad esempio fagioli e thè), il traffico autoveicolare, il fumo di sigaretta e la manipolazione di monete.

Vista la potenziale pericolosità e l'ampia diffusione di tali metalli, numerose campagne di biomonitoraggio sono state condotte in ambito sia nazionale che internazionale allo scopo di misurare la concentrazione di piombo ematico e di cromo e nichel urinari (quali biomarcatori di esposizione) nella popolazione non professionalmente esposta ai metalli in esame e poter fornire, in tal modo, valori di riferimento da adoperare quale supporto scientifico in studi volti alla tutela sia della salute pubblica sia del lavoratore.

4. Monitoraggio biologico e valori di riferimento

Acqua, dieta, aria e suolo rappresentano le vie attraverso cui l'individuo è esposto a sostanze inquinanti, con potenziali effetti sulla salute; pertanto, la valutazione della qualità degli ambienti di vita risulta di fondamentale importanza nel tutelare lo stato di salute dell'individuo.

A tale scopo, sempre più frequente è l'utilizzo di programmi di *screening*, tra cui particolare importanza rivestono le campagne di monitoraggio biologico (MB), basate sulla misura diretta dell'inquinante o dei suoi metaboliti nell'organismo, volte a raccogliere indicazioni sull'effettivo grado di esposizione a sostanze di interesse tossicologico di gruppi di popolazione opportunamente scelti.

Le indagini di monitoraggio biologico consentono il raggiungimento di numerosi obiettivi, tra cui - finalità del presente progetto - la definizione dei livelli basali di esposizione (valori di riferimento, VR) della popolazione generale a determinate sostanze.

I VR possono essere considerati un'evoluzione del vecchio concetto di "valore normale", inteso nelle sue tre principali accezioni: clinica ("valori non patologici"), epidemiologica ("valori abituali", solitamente riscontrati nella popolazione generale) e statistica ("valori distribuiti normalmente").

In generale, il VR di uno xenobiotico o di un suo metabolita può essere definito come il *valore ottenuto dalla descrizione statistica dei risultati del suo dosaggio in campioni biologici prelevati da una popolazione o da un soggetto di riferimento*. A tale VR ci si "riferisce" per interpretare i risultati delle determinazioni dello stesso xenobiotico in individui o gruppi di individui esposti o potenzialmente esposti a tale analita attraverso una qualsiasi via (ambientale, occupazionale, alimentare, ecc.). Alla base dei VR viene posto il principio della comparazione, per cui il valore biologico osservato in un MB, per essere interpretato dal punto di vista tossicologico, deve essere confrontato con un idoneo VR.

Nel caso dei metalli, l'interpretazione dei VR implica una necessaria premessa. I metalli possono essere suddivisi in due gruppi: metalli con caratteristiche, allo stesso tempo, di essenzialità e tossicità (arsenico, cromo, nichel, zinco, ecc.) e metalli di esclusiva natura e interesse tossicologico (piombo, cadmio, mercurio, ecc.). Nel primo caso, i VR sono intesi come la risultante della "concentrazione di fondo" determinata dai soli processi fisiologici oppure come somma della concentrazione di fondo e della quota ascrivibile ad un'esposizione di tipo ambien-

tale o professionale. Nel secondo caso, i metalli non essenziali dovrebbero essere del tutto assenti dalle matrici biologiche, per cui, in linea di principio, i VR dovrebbero essere pari a "zero" (controllo negativo). In realtà, il fenomeno dell'ecodispersione di un elevato numero di metalli (e di altri xenobiotici) ha portato, sia in ambito nazionale che internazionale, alla conduzione di intense campagne di monitoraggio basate anche su popolazioni di aree remote, dove erano presumibili VR pari a zero, riscontrando, invece, significativi livelli di alcuni xenobiotici (ad esempio piombo e mercurio) in abitanti di zone anche molto distanti dal punto di origine della contaminazione.

I dati inerenti la situazione italiana possono essere ricavati dagli studi condotti dalla Società Italiana Valori di Riferimento (SIVR) e dall'analisi dei Rapporti ISTISAN 10/22¹. Da questi ultimi, che raccolgono gli studi pubblicati dal 1990 al 2009 sull'argomento, si evince che è disponibile solo un numero esiguo di lavori (il totale degli studi prodotti in Italia è risultato essere pari a 36) e dalla valutazione dei dati esistenti emergono numerose criticità concernenti la produzione dei VR e innumerevoli fattori di variabilità legati ai singoli metalli, in quanto *"la produzione di VR per i metalli è risultata subordinata alla mancanza di standardizzazione e armonizzazione delle procedure, di campagne periodiche di MB sulla popolazione e di coordinazione a livello internazionale delle singole esperienze nazionali"*.

Ai differenti livelli di industrializzazione ed urbanizzazione e ai differenti stili di vita della popolazione, inoltre, sono ascrivibili gli ampi intervalli di concentrazione dei VR forniti dalle agenzie nazionali ed internazionali coinvolte nel settore, come la SIVR, che ricavano tali VR mediante indagini di monitoraggio non in singole aree geografiche ma in intere nazioni.

Nella tabella sottostante (*tabella 1*) sono riportati schematicamente, quale esempio, i VR dei biomarcatori comunemente adoperati per la valutazione dell'esposizione a piombo, cromo e nichel, ottenuti attraverso specifiche indagini, esperienze dei laboratori del circuito SIVR o attraverso valutazioni dei dati di letteratura (Quarta lista SIVR, 2017²). Tali VR sono riportati come intervallo di concentrazione espresso come 5°-95° percentile e come indici di tendenza centrale (media geometrica, MG).

Tabella 1 - Valori di riferimento rispettivamente di piombo ematico, cromo e nichel urinari estrapolati dalla Quarta lista SIVR.

METALLO	Unità di Misura	5°-95° percentile	MG	Matrice biologica	Fattori di variabilità
Piombo	µg/L	7,38 – 51,7	19,9	Sangue	R, A, E, S, Far
Cromo	µg/L	0,05 – 0,6	0,22	Urina	E, R, F, ANT
Nichel	µg/L	0,372 – 4,44	1,47	Urina	F, S, E

*I valori possono essere condizionati da variabili quali:
Sesso (S), Età (E), Residenza (R), Fumo di tabacco (F), Consumo di alcol (A), Farmaci o medicinali, inclusi preparati ayurvedici o di medicina alternativa, integratori dietetici (Far), attività antropiche (ANT)*

In questo ambito, si colloca il presente progetto di studio, volto a condurre una campagna di monitoraggio biologico allo scopo di valutare l'esposizione non professionale a cromo, nichel e piombo della popolazione generale campana. Nello specifico, la popolazione di riferimento è costituita dalla popolazione reclutata in differenti province campane, non esposta professionalmente ai suddetti metalli.

5. Fasi operative

Il programma di lavoro del progetto biennale è stato diviso in diverse fasi operative che rispecchiano lo schema procedurale specificato nel Rapporto ISTISAN 10/22¹ sulla definizione dei Valori di Riferimento, al fine di produrre dati di MB basati su metodologie standardizzate, accreditate a livello nazionale ed internazionale.

Le fasi operative attuate sono le seguenti:

Fase 1: Definizione del campione di popolazione da sottoporre ad indagine

- criteri di inclusione ed esclusione
- questionario di indagine

Fase 2: Sviluppo dei metodi di campionamento e di analisi

Fase 3: Validazione dei metodi di analisi

Fase 4: Arruolamento del campione di popolazione da sottoporre ad indagine

Fase 5: Monitoraggio biologico - Raccolta e analisi dei campioni biologici

Fase 6: Creazione del database

Fase 7: Elaborazione statistica dei dati del monitoraggio biologico

Fase 8: Definizione dei valori di riferimento.

6. Fase 1: Definizione del campione di popolazione da sottoporre ad indagine

6.1. Criteri di inclusione ed esclusione

Nella fase di selezione del campione di popolazione da sottoporre a indagine sono state considerate tutte le variabili che possono comportare un'alterazione dei livelli nei fluidi biologici degli indicatori presi in esame. Ad esempio, è noto che i livelli di piombo nel sangue variano con età, sesso, etnia, dieta, abitudine al fumo e all'alcool, zona di residenza, ecc.¹; analogamente, l'esposizione interna da protesi dentali e amalgami in metallo può influenzare i livelli di cromo urinario¹.

L'adozione di rigorosi criteri di inclusione ed esclusione, diversi da metallo a metallo, è, dunque, necessaria per stabilire la presenza/assenza di eventuali fattori confondenti in grado di inficiare l'analisi o l'interpretazione dei dati. Nella scelta di tali criteri è opportuno, tuttavia, considerare solo quei fattori effettivamente rilevanti per ciascun analita in esame, al fine di evitare una iperselezione e, di conseguenza, una scarsa rappresentatività del gruppo considerato per produrre i VR.

In base all'obiettivo del progetto, quindi, sono stati definiti i criteri di inclusione/esclusione dei soggetti da arruolare, al fine di avere un campione rappresentativo della popolazione campana non esposta professionalmente ai metalli in esame.

In particolare, i **criteri basilari di inclusione** individuati per il presente studio sono:

- età: individui in età lavorativa, compresi tra 18 e 65 anni;
- luogo di residenza: individui residenti nelle cinque province della Regione Campania; a tal proposito va specificato che si è tenuto in debito conto che il luogo di residenza ingloba diverse variabili connesse con una maggiore o minore esposizione a metalli, quali densità abitativa, urbanizzazione, livello di inquinamento e di traffico veicolare, abitudini alimentari locali, ecc.

Quali **criteri di esclusione**, invece, sono stati considerati:

- quale criterio basilare, l'accertata esposizione professionale a Cr, Ni o Pb;
- fattori in grado di influire significativamente sui livelli di concentrazione di piombo ematico e di cromo e nichel urinari, interferendo con la tossicocinetica del metallo in esame, ovvero:
 - stati fisiologici modificati (gravidanza, esercizio fisico intenso, consumo recente di un pasto, stress, disordini psicologici)^{1,3};

- assunzione di agenti voluttuari, ad esempio il consumo eccessivo di alcol in particolare per la determinazione dei VR del piombo ematico^{1,3-6};
- protesi dentarie o amalgami metallici, in particolare per la determinazione dei VR del Cr urinario^{1,3};
- patologie interferenti con il metabolismo dei metalli oggetto di studio, quali osteoporosi, patologie metaboliche (ad esempio diabete), ematiche, epatiche e renali⁷⁻⁹;
- assunzione di farmaci o integratori alimentari che possano contenere i metalli in esame o interferire con la tossicocinetica⁹⁻¹⁶.

Per quanto riguarda i **criteri di partizione o stratificazione**, il tipo e il numero delle partizioni realizzabili sono condizionati dalla numerosità del campione; è infatti indispensabile garantire un numero sufficiente di casi (e se possibile un numero simile di casi) nei vari strati per eseguire corrette elaborazioni statistiche. È raccomandato che *“se la popolazione è notevolmente diversa da quella normale, allora una numerosità che vada da 10 a 20, può essere abbastanza grande. Per stare tranquilli tuttavia di solito si dice che una numerosità sopra 30 va bene nella maggior parte delle circostanze”*¹⁷. In questo studio, laddove il numero di soggetti arruolati lo ha consentito, i casi sono stati ripartiti considerando i fattori schematizzati di seguito (tabella 2).

Tabella 2 - Criteri di ripartizione dei soggetti arruolati nello studio.

Sesso	Uomo	Provincia di residenza	Napoli	
	Donna		Salerno	
Età	≤ 35 anni	Zona di residenza	Caserta	
	36 – 46 anni		Avellino	
	47 – 54 anni		Benevento	
	≥ 55 anni			
Abitudine al fumo	Fumatore	Intensità traffico veicolare nell'ambiente di vita	Urbana	
	Ex fumatore (da almeno 6 mesi)		Semiurbana	
	Non fumatore		Periferica	
Consumo di molluschi e crostacei	Mai	Rurale	Collinare	
	Da raramente a 2 volte al mese	Montana	Lacustre	
	Più di 1 volta a settimana	Marina		
Consumo di alcool (come vino)	Si	Quantità di vino consumato	Astemio	
	No		500 mL/die	
Quantità di vino consumato	500-1000 mL/die		500-1000 mL/die	> 1 L/die
	> 1 L/die			

6.2. Numerosità del campione

Il numero dei partecipanti necessari in uno studio di MB deve essere sufficientemente ampio da permettere un adeguato trattamento statistico, poiché se il gruppo dei soggetti inclusi nello studio fosse ristretto, si otterrebbe un'ampia variabilità del dato dovuta a differenze inter-individuali e metodologiche.

Per verificare di disporre di un adeguato numero di individui selezionati in modo da essere rappresentativo della popolazione di riferimento, è stato tenuto in considerazione che:

- secondo dati ISTAT¹⁸, la popolazione totale campana (di età compresa tra 18 e 65 anni) negli anni in cui il progetto è stato svolto è costituita da:
 - nel 2012: 3'742'795 persone
 - nel 2013: 3'735'469 persone
 - nel 2014: 3'801'486 persone
 - nel 2015: 3'788'319 persone;
- la numerosità necessaria per rappresentare una popolazione compresa tra 1 e 5 milioni di abitanti, corrispondente ad un Intervallo di Confidenza (IC) del 90%, con un margine di errore del 10% è di 68 casi, secondo la "Tabella per la definizione del campione" fornita dal Dipartimento della Funzione Pubblica¹⁹.

In base a quanto premesso, il database operativo di cui si dispone grazie al progetto condotto nel periodo 2012-2014 contiene un sufficiente numero di casi per poter definire valori di riferimento di piombo ematico (128 soggetti), cromo e nichel urinari (185 soggetti) relativi alla popolazione campana, con un IC del 90-95% e un margine di errore del 7-10%.

6.3. Questionario di indagine

È stato stilato un questionario da somministrare a ciascun soggetto reclutato. Tale questionario è costituito da domande a risposta multipla e a risposta libera, sviluppate al fine di raccogliere tutte le informazioni necessarie a soddisfare i criteri di selezione precedentemente definiti e, allo stesso tempo, indispensabili alla stratificazione dei dati, finalizzata al riscontro di eventuali differenze nei valori di concentrazione dei biomarcatori in esame in sottogruppi della popolazione.

Il questionario contiene, infatti, domande su dati personali (età, peso, altezza, residenza, ecc.), caratteristiche dell'ambiente di vita (zona di residenza, intensità di traffico, presenza di industrie ecc.), storia lavorativa (con particolare attenzione all'eventuale esposizione professionale a Cr, Ni e Pb), abitudini di vita (fumo^{3,6,20-22}, alcol^{1,3-6}) e alimentari (tipo di alimentazione, consumo di molluschi e crostacei^{23,24}), anamnesi patologica (con particolare attenzione alle patologie interferenti con il metabolismo dei metalli oggetto di studio⁷⁻⁹) ed eventuale esposizione extraprofessionale a cromo, nichel e piombo (ad esempio secondo lavoro svolto sporadicamente e/o attività del

tempo libero). Poiché le domande inserite nel questionario sono relative ad abitudini ed ambienti di vita, nel caso in cui il domicilio fosse stato diverso dalla residenza, i soggetti arruolati sono stati invitati a segnalarlo e a rispondere alle domande considerando il luogo di domicilio.

Va precisato, inoltre, che alcune informazioni sono state raccolte preliminarmente anche mediante valutazioni soggettive dei volontari arruolati, ma fornendo loro un criterio che potesse renderle omogenee. Ad esempio, durante la somministrazione del questionario è stato verbalmente spiegato ai soggetti reclutati che potevano valutare l'intensità del traffico considerando, nel caso di uno spostamento in auto di circa 2 km nella zona di residenza anagrafica:

- a) il verificarsi o meno di soste per traffico
- b) il numero di soste
- c) la durata complessiva delle soste.

Quindi, l'intensità di traffico è stata valutata:

- Scarsa per assenza di soste (0 minuti)
- Bassa, per soste di durata complessiva di circa 1 minuto
- Moderata, per soste di durata complessiva pari a 1-3 minuti
- Elevata, per soste di durata complessiva pari a 3-10 minuti
- Molto elevata, per soste di durata complessiva superiore a 10 minuti.

Ciascuna domanda del questionario è stata, poi, trasformata in variabile "continua" o "categoriale", allo scopo di costruire ed aggiornare in continuo un database riassuntivo dei dati raccolti e consentire la fase di elaborazione e valutazione su base statistica dei risultati.

7. Fase 2: Sviluppo dei metodi di campionamento e di analisi

7.1. Metodi di campionamento

Campioni di urina estemporanea sono stati raccolti e conservati refrigerati (4°C, in frigo o borsa termica dotata di refrigerante) e trasportati in laboratorio entro 24 ore dalla raccolta, in borsa termica, evitando il congelamento degli stessi. I campioni ematici, prelevati in provette con EDTA quale anticoagulante, sono stati conservati refrigerati e trasportati in laboratorio con le stesse modalità dei campioni urinari.

7.2. Trattamento dei campioni

Campioni urinari

Al fine di valutare l'idoneità dei campioni urinari per il monitoraggio, è stato determinato il peso specifico di ciascuna urina, secondo quanto raccomandato dall'OMS (range di accettabilità: 1,010-1,030), mediante strips Combur10 Test fornite dalla Roche Diagnostics. Tutti i campioni sono risultati idonei.

Le urine sono state, poi, acidificate con HNO₃ al 68%, in modo da ottenere una concentrazione di HNO₃ in urina pari allo 0,2% e conservati a -20°C fino all'analisi.

Campioni ematici

I campioni ematici sono stati diluiti 1:20 con Triton X₁₀₀ allo 0,1% e conservati a 4°C fino all'analisi.

7.3. Metodi di analisi

Spettrofotometria ad assorbimento atomico

La spettrofotometria di assorbimento atomico (AAS) è una tecnica adoperata per l'analisi quali/quantitativa dei metalli, data la loro capacità di assorbire, come atomi o ioni monoatomici, una radiazione elettromagnetica.

Gli elementi fondamentali di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico sono il sistema di atomizzazione, che trasforma il campione da analizzare in atomi,

la sorgente luminosa, che genera uno spettro a righe caratteristico dell'elemento in esame, il sistema ottico disperdente, che separa lo spettro generato dalla sorgente nelle sue diverse lunghezze d'onda, e il rivelatore, che misura l'intensità luminosa della radiazione di lunghezza d'onda caratteristica del metallo che si vuole rivelare.

Tra i diversi sistemi di atomizzazione, molto comune è l'atomizzazione in fornello di grafite, che consente di quantificare elementi in concentrazioni nell'ordine di parti per miliardo (ppb = microgrammi/litro), adatto, quindi, all'analisi di campioni in matrice biologica, quali sangue e urine. Tale tecnica consiste nel deporre una quantità discreta di campione, opportunamente trattato, in un tubicino di grafite, sistemato nel cammino ottico della sorgente luminosa e fissato tra due elettrodi di grafite, collegati a loro volta ad un generatore di corrente. Il passaggio della corrente nel tubo di grafite ne consente il riscaldamento, che può essere programmato in vari *steps*, diversi sia per la temperatura sia per il tempo di riscaldamento, ciascuno avente una specifica funzione, costituendo così un gradiente di temperatura.

Nel primo *step* - fase di evaporazione - avviene l'allontanamento del solvente riscaldando il campione a temperature variabili tra 100 e 150°C; il secondo *step* - fase di incenerimento - permette di "bruciare" la frazione organica della matrice riscaldandola a temperature intorno ai 1000°C; durante il terzo *step* - fase di atomizzazione - in cui si raggiungono temperature comprese tra i 2000 e i 2500°C, il metallo in esame passa dallo stato ionizzato (in cui si trova nella matrice biologica) ad uno stato atomico in fase gassosa.

Per quanto concerne le sorgenti luminose, le lampade a catodo cavo sono le più comunemente adoperate, sia per l'intensità di emissione elevata e stabile sia per i costi contenuti. Tali lampade sono composte da un anodo e da un catodo cilindrico cavo costituito o rivestito da un metallo specifico (lampade monoelementari) o da più metalli (lampade multielementari), racchiusi in un tubo di vetro sigillato, riempito con gas inerte. Quando si applica una differenza di potenziale tra gli elettrodi si verifica una scarica nel gas di riempimento, che causa la formazione di ioni del gas; questi bombardano la superficie del catodo, che emette atomi che per urti successivi si eccitano. Quando un atomo è colpito da una radiazione elettromagnetica d'intensità adeguata, infatti, uno o più elettroni possono abbandonare gli orbitali nei quali si trovano per venire promossi ad orbitali più ricchi di energia. Di conseguenza l'atomo passa dalla configurazione elettronica normale (stato energetico fondamentale) a una configurazione più ricca di energia e, quindi, meno stabile (stato eccitato), dalla quale ritorna rapidamente allo stato fondamentale, emettendo l'energia appena acquisita, sotto forma di spettro a righe caratteristico dell'elemento che costituisce il catodo.

Tale spettro a righe viene scomposto nelle sue diverse lunghezze d'onda nel sistema ottico (monocromatore); la luce monocromatica che ne risulta colpisce la nube atomica formatasi nel tubo di grafite e, poiché ogni atomo dispone di un proprio numero di elettroni situati su determinati orbitali, per ciascun elemento è possibile registrare uno spettro di assorbimento atomico caratteristico.

L'identificazione qualitativa di un metallo mediante AAS, quindi, è possibile poiché ogni metallo assorbe uno spettro caratteristico costituito da righe di lunghezze d'onda specifiche.

La determinazione quantitativa di un elemento, invece, si può eseguire misurando l'intensità della luce incidente (I_0) e quella della luce trasmessa (I_t), ottenendo così l'assorbanza ($A = \log_{10} I_0/I_t$), correlata alla concentrazione dell'elemento nella soluzione dalla Legge di Lambert e Beer:

$$A = k \cdot b \cdot c,$$

dove: k è il coefficiente spettrale di assorbimento atomico;

b è il cammino ottico attraversato dalla radiazione;

c è la concentrazione dell'elemento nella soluzione.

Strumentazione adoperata

I metodi di analisi per la rivelazione e quantificazione dei metalli in esame, ovvero cromo e nichel in matrice urinaria (CrU e NiU) e piombo in matrice ematica (PbS), sono stati sviluppati adoperando uno spettrofotometro ad assorbimento atomico con fornello di grafite. Il sistema adoperato è costituito da uno spettrofotometro a doppio raggio MQZ, dotato di fornello di grafite quale sistema di atomizzazione, correttore di fondo al deuterio e con effetto Zeeman (GF95Z) e campionatore automatico (FS95); il sistema è gestito dal software Solaar AA Sistem (Thermo Electron).

Reattivi

La soluzione standard contenente nichel, cromo e piombo in HNO_3 al 2% e i modificanti di matrice (MgNO_3 e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, adoperati per il dosaggio di CrU e PbS, rispettivamente) sono stati acquistati presso la Perkin Elmer; le lampade a catodo cavo specifiche per i metalli indagati sono state fornite dalla Thermo Electron.

L'acqua ultrapura (H_2Oup), il Triton X₁₀₀ e l'acido nitrico (HNO_3), adoperati nelle varie fasi analitiche, sono stati acquistati dalla Carlo Erba.

7.4. Parametri strumentali

Di seguito si riportano le condizioni strumentali sviluppate per la determinazione dei metalli in esame mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico:

Cr urinario

- Lampada a catodo cavo: lampada monoelemento, specifica per Cr
- Lunghezza d'onda: 357.9 nm
- Gas: Argon
- Banda passante: 0.5 nm
- Temperatura di iniezione: 70°C
- Volume di iniezione: 20 μL

- Acquisizione del segnale: correzione del fondo con D₂
- Modificante di matrice: 5 µL di nitrato di magnesio 1 µg/µL
- Gradiente di temperatura:

Descrizione Step	Temp. (°C)	Ramp time (sec.)	Hold time (sec.)	Internal flow (mL/min)
I evaporazione	160	2	20	200
II incenerimento	1500	150	20	200
III atomizzazione	2450	0	3	0
IV pulizia	2600	0	3	200

Ni urinario

- Lampada a catodo cavo: lampada monoelemento, specifica per Ni
- Lunghezza d'onda: 232 nm
- Gas: Argon
- Banda passante: 0.1 nm
- Temperatura di iniezione: 70°C
- Volume di iniezione: 20 µL
- Acquisizione del segnale: correzione del fondo con effetto Zeeman
- Gradiente di temperatura:

Descrizione Step	Temp. (°C)	Ramp time (sec.)	Hold time (sec.)	Internal flow (mL/min)
I evaporazione	100	10	30	200
II incenerimento	900	150	20	200
III atomizzazione	2500	0	3	0
IV pulizia	2600	0	3	200

Pb ematico

- Lampada a catodo cavo: lampada monoelemento, specifica per Pb
- Lunghezza d'onda: 283.3 nm
- Gas: Argon
- Banda passante: 0.5 nm
- Temperatura di iniezione: 75°C
- Volume di iniezione: 20 µL
- Acquisizione del segnale: correzione del fondo con D₂
- Modificante di matrice: 5 µL di diidrogenofosfato di ammonio 1 µg/µL
- Gradiente di temperatura:

Descrizione Step	Temp. (°C)	Ramp time (sec.)	Hold time (sec.)	Internal flow (mL/min)
I evaporazione	80	10	10	200
	130	20	20	200
	650	150	20	200
II incenerimento	1200	0	5	200
	2000	0	5	0
III atomizzazione	2000	0	5	0
IV pulizia	2100	0	3	200

7.5. Analisi quantitativa

L'analisi quantitativa, condotta allo scopo di effettuare un monitoraggio biologico, consiste nella determinazione della concentrazione di un agente chimico nel fluido biologico (μg di analita per L di sangue, siero o urina).

La determinazione quantitativa necessita di una retta di calibrazione, basata sull'analisi di campioni contenenti quantità note di analita. I campioni adoperati per la costruzione della retta di calibrazione vengono preparati simulando nei minimi dettagli le condizioni relative ad un prelievo reale.

Le rette di calibrazione vengono costruite riportando sull'asse delle ascisse la concentrazione dell'analita e sull'asse delle ordinate le assorbanze corrette, ovvero le assorbanze del segnale dell'analita sottratte del "rumore di fondo". Dall'equazione della retta di calibrazione e dai coefficienti di correlazione si verifica la linearità delle curve di calibrazione negli intervalli di concentrazione presi in esame. La concentrazione degli analiti nei campioni reali viene calcolata inserendo i valori misurati delle assorbanze dell'analita nell'equazione della curva di calibrazione: il valore di concentrazione dell'analita nel campione incognito è dato dal valore della x nell'equazione.

Per la costruzione delle rette di calibrazione per la quantificazione di ciascun metallo, sono state preparate soluzioni a concentrazione nota e decrescente del metallo in esame, mediante diluizioni successive della soluzione standard con Triton X₁₀₀ allo 0,1% per la retta di calibrazione del Pb e con HNO₃ allo 0,2% per quelle di Cr e Ni.

I range di concentrazione adoperati per le rette di calibrazione sono: Cr: 5-0,30 $\mu\text{g}/\text{L}$, Ni: 10-0,62 $\mu\text{g}/\text{L}$ e Pb: 10-0,625 $\mu\text{g}/\text{L}$. Tutte le rette costruite sono passanti per l'origine.

8. Fase 3: Validazione dei metodi di analisi

Una volta ottimizzate le procedure analitiche per l'analisi quali/quantitativa di una sostanza di interesse, è necessario validare le metodiche, applicando protocolli sperimentali specificati da organismi accreditati a livello internazionale, quali la Food and Drug Administration (FDA) al fine di garantirne la validità a livello internazionale in termini di qualità analitica e riproducibilità interlaboratoriale del dato. Viene, quindi, richiesto ad ogni nuova metodica analitica il rispetto di specifici parametri di sensibilità, accuratezza, precisione, recupero dalla matrice complessa, assieme a studi di stabilità degli analiti nelle condizioni di conservazione indicate dalla metodica stessa. Nel corso della III fase si è proceduto, pertanto, all'esecuzione degli esperimenti di validazione delle metodiche analitiche precedentemente sviluppate per il dosaggio dei metalli in esame.

8.1. Linearità, accuratezza e precisione

La verifica della *linearità* di risposta nel range di concentrazione in esame è indispensabile al fine di accertarsi che la risposta fornita dall'analisi di un campione incognito sia correlabile alla concentrazione dell'analita calcolata adoperando una funzione di regressione lineare.

La *linearità* della risposta analitica è stata valutata calcolando le equazioni delle curve di calibrazione ed i relativi coefficienti di correlazione R^2 ; le curve di calibrazione sono state costruite in matrice urinaria ed in HNO_3 allo 0,2% per CrU e NiU e in matrice ematica ed in Triton X_{100} allo 0,1% per PbS (adoperando i range di concentrazione riportati al paragrafo 7.5).

Le equazioni ottenute hanno presentato valori di R^2 prossimi all'unità (come riportato nella *tabella 3*, consentendo di verificare la linearità della risposta strumentale al variare della quantità di analita nell'intervallo di concentrazione preso in esame.

Tabella 3 - Equazioni e coefficienti di correlazioni delle rette di calibrazione.

<i>Analita</i>	<i>curva di calibrazione in matrice</i>	<i>curva di calibrazione standard</i>
Ni	$y = 0,0035x + 0,0002; R^2 = 0,9975$	$y = 0,0034x + 0,0013; R^2 = 0,9997$
Cr	$y = 0,0154x + 0,0239; R^2 = 0,9999$	$y = 0,0154x + 0,0247; R^2 = 0,9997$
Pb	$y = 0,0034x + 0,0044; R^2 = 0,9993$	$y = 0,0036x + 0,0023; R^2 = 0,9999$

L'*accuratezza* di un metodo (Acc%) indica quanto la media dei risultati ottenuti sia prossima al valore vero (nominale). Essa si determina analizzando campioni addizionati di quantità note di analita: il valore di concentrazione ottenuto dall'analisi quantitativa si confronta, poi, con quello nominale, valutando percentualmente di quanto da esso si discosta, secondo la seguente formula:

$$\text{Acc\%} = (\text{C}_{\text{MIS}} - \text{C}_{\text{NOM}}) / \text{C}_{\text{NOM}} * 100$$

con C_{NOM} = Concentrazione nominale, C_{MIS} = Concentrazione Misurata

Il parametro "*precisione*" è connesso al concetto di riproducibilità analitica e si valuta attraverso la determinazione della deviazione standard (SD) e del coefficiente di variazione (CV%), il quale è un indice percentuale che correla l'errore della misura al valore medio di concentrazione ottenuto durante le analisi, in accordo con le seguenti formule:

$$\text{SD} = [\sum(x_i - X_m)^2 / (N-1)]^{1/2}$$
$$\text{CV\%} = \text{SD} / X_m \times 100$$

L'accuratezza deve rientrare nel 15% del valore vero per tutte le concentrazioni ad eccezione del Limite Inferiore di Quantificazione (LLOQ, Lower Limit Of Quantification) in corrispondenza del quale è ammessa una Acc% fino al 20%; analogamente la precisione, espressa come CV%, non deve deviare dal valore nominale più del 15% per ogni livello di concentrazione, e non più del 20% in corrispondenza dell'LLOQ.

Entrambi i parametri Acc% e CV% sono stati misurati analizzando campioni di controllo qualità (QC, Quality Control), preparati a tre diverse concentrazioni (comprese nel range delle curve di calibrazione degli analiti). I QC sono stati preparati adoperando soluzioni indipendenti da quelle utilizzate per costruire le curve di calibrazione e sono state condotte cinque determinazioni per ogni livello di concentrazione, per un totale di 15 analisi per ogni metallo.

Dai valori ottenuti, mostrati nella *tabella 4*, è possibile affermare che i risultati sono rispondenti a quanto richiesto dalle linee guida della FDA, in quanto sia l'Acc% sia il CV% sono inferiori al 15% per ogni concentrazione considerata.

Tabella 4 - Accuratezza e precisione dei campioni QC.

<i>Analita</i>		<i>Concentrazione nominale (µg/L)</i>	<i>Acc.%</i>	<i>CV%</i>
Ni	QC1	7,50	4,3±3,4	3,6
	QC2	4,00	1,3±8,1	7,9
	QC3	1,50	-5,3±7,7	8,1
Cr	QC1	4,00	-7,9±1,3	4,7
	QC2	1,00	-1,5±7,9	8,0
	QC3	0,50	-6,3±3,6	3,8
Pb	QC1	8,00	-12,4±3,9	4,5
	QC2	4,00	-1,2±5,7	5,8
	QC3	1,00	-12,5±7,4	6,6

8.2. Limiti di sensibilità e di quantificazione

Il limite di rivelazione o di sensibilità (LOD, Limit Of Detection) di un metodo indica la quantità minima di analita che si riesce a rivelare con la metodica scelta. Il limite di quantificazione (LLOQ) è la minima concentrazione di analita quantificabile. LOD ed LLOQ sono caratteristici della metodica utilizzata e risultano influenzati da tutte le fasi analitiche, dal campionamento alla quantificazione. Nel riportare i risultati di un'analisi quantitativa è indispensabile specificare sia l'LOD sia l'LLOQ: l'esito negativo di un'analisi (ND = Not Detectable) non implica necessariamente la totale assenza dell'analita in esame nel campione indagato, dal momento che l'analita potrebbe essere presente in concentrazioni inferiori al limite di rivelabilità proprio della metodica analitica utilizzata.

Secondo le Linee Guida della FDA, LOD ed LLOQ devono essere calcolati attraverso l'analisi di campioni "bianchi", privi dell'analita da dosare. Si misura, pertanto, la risposta analitica e, mediante le curve di calibrazione precedentemente costruite, si calcolano le concentrazioni "virtuali" di ciascun analita nei bianchi. Il valore medio di tali concentrazioni, addizionato di tre e dieci volte la deviazione standard, corrisponde rispettivamente all'LOD ed all'LLOQ, secondo le seguenti formule:

$$\text{LOD} = X_m + 3SD$$

$$\text{LLOQ} = X_m + 10SD$$

con X_m valore medio delle concentrazioni "virtuali" di analita (Cr e Ni) nei bianchi di matrice urinaria e SD Deviazione Standard associata a X_m .

Al fine di determinare LOD ed LLOQ per i metalli in esame, pertanto, sono stati analizzati 6 bianchi di matrice urinaria (per Cr e Ni) ed ematica (per Pb) e la media delle concentrazioni “virtuali”, sommata per tre e per dieci volte la loro deviazione standard ha fornito, rispettivamente, i valori di LOD ed LLOQ riportati nella seguente *tabella 5*.

Tabella 5 - Limiti di rivelazione e di quantificazione in matrice biologica.

<i>Analita</i>	<i>Sensibilità</i>	
	LOD	LLOQ
Ni	0,17 µg/L	0,39 µg/L
Cr	0,11 µg/L	0,32 µg/L
Pb	0,68 µg/L	1,25 µg/L

Poiché le matrici biologiche adoperate come campioni bianchi non sono prive degli analiti in esame, è stata valutata anche la sensibilità strumentale per ciascun metallo, analizzando soluzioni standard degli analiti a concentrazioni decrescenti (in HNO₃ allo 0,2% per Cr e Ni e in Triton X₁₀₀ allo 0,1% per Pb). I limiti di rivelazione e i limiti di quantificazione sono schematizzati di seguito (*tabella 6*).

Tabella 6 - Limiti di rivelazione e di quantificazione in soluzioni standard.

<i>Analita</i>	<i>Sensibilità</i>	
	LOD	LLOQ
Ni	0,10 µg/l	0,21 µg/l
Cr	0,08 µg/l	0,20 µg/l
Pb	0,04 µg/l	0,20 µg/l

8.3. Recupero

Secondo i protocolli di validazione definiti in ambito internazionale, gli esperimenti per la valutazione del *recupero* devono essere condotti comparando la risposta analitica fornita da campioni in solvente (in questo caso, HNO₃ allo 0,2% per Cr e Ni e in Triton X₁₀₀ allo 0,1% per Pb) che rappresentano il 100% del recupero, con quella fornita da campioni in matrice, contenenti l'analita ad almeno tre diverse concentrazioni: bassa, media e alta.

Per tenere conto dell'intero range di concentrazioni adoperato per la costruzione delle curve di calibrazione, è possibile valutare il recupero come rapporto percentuale tra il coefficiente angolare della retta in matrice e quello della retta standard, secondo l'esempio di seguito riportato (figura 1).

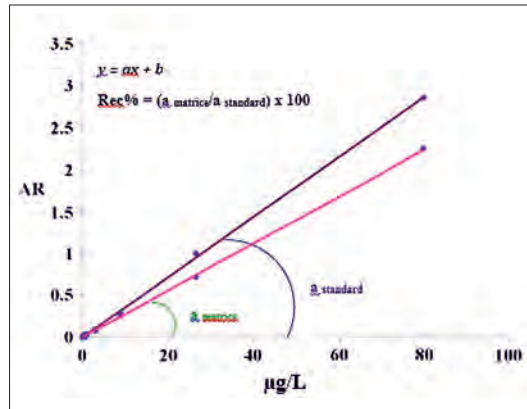


Figura 1 - Esempio di calcolo del Rec% attraverso il confronto tra retta in matrice e retta standard.

Nel protocollo di validazione applicato, pertanto, il recupero è stato calcolato confrontando i coefficienti angolari della curva di calibrazione in matrice urinaria e in HNO₃ allo 0,2% per Cr e Ni e in matrice ematica e in Triton X₁₀₀ allo 0,1% per il Pb. Gli esperimenti sono stati ripetuti in triplicato e i valori medi di recupero percentuale ottenuti e le relative deviazioni standard per ciascun metallo in esame sono riportati in *tabella 7*:

Tabella 7 - Rec_m% e SD degli analiti.

Analiti	Rec% ± SD
Ni	95,1±36,8
Cr	102,8±2,9
Pb	94,4±16,7

8.4. Stabilità

La valutazione delle *stabilità a lungo termine* (Long-Term Stability) è indispensabile allo scopo di verificare per quanto tempo gli analiti sono stabili nelle condizioni di conservazione dei campioni biologici (in termini di temperatura e tempo).

A tale scopo, sono stati scelti tre livelli di concentrazione (alta, media e bassa rispetto ai range delle curve di calibrazione) per ciascun metallo in esame, riportati nella tabella seguente.

Tabella 8 - Concentrazioni nominali (Stab LT 1, 2 e 3, concentrazione alta, media e bassa, rispettivamente) dei campioni di Cr, Ni e Pb in matrice, analizzati per la valutazione della Long-Term Stability.

Analita	Stab LT 1 ($\mu\text{g/L}$)	Stab LT 2 ($\mu\text{g/L}$)	Stab LT 3 ($\mu\text{g/L}$)
Ni	7,50	4,00	1,50
Cr	3,60	0,80	0,60
Pb	8,00	4,00	1,00

La *stabilità a lungo termine* è stata valutata nel seguente modo: sono stati preparati 27 campioni in matrice (urina acidificata con HNO_3 fumante e sangue intero diluito con Triton X₁₀₀ allo 0,1%) in modo da avere tre *batch* di 9 campioni per tre diverse concentrazioni, StabLT1, StabLT2 e StabLT3. In particolare, un *batch* (tre campioni StabLT1, tre StabLT2 e tre StabLT3) è stato analizzato immediatamente (tempo zero, t_0). I restanti due *batch* sono stati conservati a -20°C ed analizzati dopo una settimana ed un mese, rispettivamente. In questo modo ciascun *batch* è stato sottoposto ad un solo ciclo di congelamento/scongelamento, escludendo le possibili interferenze dei cicli termici sulla stabilità degli analiti. La valutazione della stabilità a lungo termine è stata effettuata comparando la concentrazione degli analiti nei campioni analizzati dopo una settimana e un mese rispetto a quella nei campioni immediatamente analizzati, che rappresentano il 100% della stabilità. I risultati ottenuti sono stati espressi, quindi, come recupero medio e SD (*tabella 9*).

Tabella 9 - Stabilità a lungo termine (espressa come Recm% \pm SD) di CrU, NiU e PbS dopo 1 settimana e 1 mese di conservazione a -20°C .

Analita	Stab LT 1		Stab LT 2		Stab LT 3	
	1 sett	1 mese	1 sett	1 mese	1 sett	1 mese
Ni	117,6 \pm 4,1	95,4 \pm 6,6	128,9 \pm 10,1	103,6 \pm 2,4	139,2 \pm 8,7	129,9 \pm 14,3
Cr	94,6 \pm 1,5	98,8 \pm 1,2	96,8 \pm 2,1	97,4 \pm 1,0	109,5 \pm 5,9	93,3 \pm 1,6
Pb	221,7 \pm 42,8	--	192,8 \pm 4,5	--	181,8 \pm 5,1	--

Per il cromo e il nichel urinari non sono state riscontrate perdite di analiti significative, essendo i recuperi maggiori o uguali all'80%, sia dopo una settimana, sia dopo un mese di congelamento. I campioni urinari per la determinazione del

cromo e del nichel, quindi, possono essere analizzati conservando i campioni fino a 30 giorni a -20°C.

Per quanto concerne il piombo ematico, invece, dopo una settimana di conservazione a -20°C, sono stati ottenuti dei valori di Rec% compresi tra il 180-220% circa per le tre concentrazioni prese in esame. Quanto riscontrato è imputabile al congelamento che può determinare un incremento della lisi dei globuli rossi nei quali è presente il piombo, liberandolo in misura maggiore e incontrollabile rispetto alla lisi ottenuta dalla diluizione del campione ematico con Triton X₁₀₀ allo 0,1%.

Al fine di confermare sperimentalmente quanto ipotizzato, è stata valutata la *Stabilità a breve termine* del piombo ematico, analizzando 6 campioni di sangue a diverse concentrazioni del metallo immediatamente dopo il prelievo e dopo 4, 5 e 11 giorni dal prelievo, conservati a 4°C sia diluiti sia tal quali (ovvero diluiti al momento dell'analisi), escludendo così il congelamento. I risultati della *Stabilità a breve termine* ottenuti sono schematizzati di seguito in *tabella 10*.

Tabella 10 - Stabilità a breve termine (Rec% ± SD e Recm% ± SD) del Pb in campioni ematici, conservati diluiti e non diluiti, a 4°C, per 4, 5 e 11 giorni.

Camp. N°	[Pb]	Stab dopo 4gg		Stab dopo 5gg		Stab dopo 11gg	
		diluiti	non diluiti	diluiti	non diluiti	diluiti	non diluiti
1	3,0	99,2	79,3	129,5	99,2	149,5	139,7
2	4,6	97,3	80,8	125,8	100,0	155,4	155,8
3	3,6	97,9	90,1	129,2	96,5	138,7	151,1
4	5,8	98,7	83,7	127,7	97,3	200,0	194,7
5	4,0	98,8	81,8	124,2	96,9	117,6	141,2
6	2,3	97,9	87,6	126,3	99,5	130,6	147,1
RECUPERI MEDI (Rec% ± DS)		98,3±0,7	83,9±4,2	127,1±2,1	98,2±1,5	148,6±28,5	154,9±20,4

Come si evince dalla tabella i recuperi migliori sono stati ottenuti per i campioni diluiti dopo 4 giorni di conservazione a 4°C e per i campioni tal quali, diluiti al momento dell'analisi, dopo 5 giorni di conservazione a 4°C. Dopo 11 giorni, per i campioni, sia diluiti sia tal quali, il Rec% aumenta in modo disomogeneo, come dimostra l'elevato valore della SD.

Alla luce di questi risultati, la stabilità dopo un mese di congelamento non è stata calcolata.

In conclusione, i campioni ematici per la determinazione del piombo possono essere conservati a 4°C ed analizzati entro 4 giorni se già diluiti e dopo 5 giorni se sono conservati tal quali.

9. Fase 4: Arruolamento del campione di popolazione da sottoporre a indagine

Tenendo conto della finalità dello studio, ovvero poter disporre di VR di specifici biomarcatori valutati nell'ambito della popolazione campana con cui confrontare i risultati di indagini di MB svolte in ambienti lavorativi locali, nelle fasi di arruolamento è stato necessario perseguire i seguenti obiettivi:

- arruolare una popolazione di riferimento quanto più simile ed omogenea ai lavoratori in termini di età, sesso ed esposizione extra-professionale e differenze unicamente per l'esposizione occupazionale;
- includere nello studio un numero di soggetti rappresentativo della popolazione in oggetto e sufficientemente grande da minimizzare possibili fattori di variabilità ovvero differenze inter-individuali e metodologiche; è da tener presente, infatti, che il numero dei partecipanti necessari in uno studio di MB deve essere sufficientemente ampio da permettere un adeguato trattamento statistico.

Al fine di arruolare nello studio un numero significativo di persone che rispondessero ai requisiti sopra elencati sono state intraprese numerose iniziative:

- sono stati coinvolti i dipendenti INAIL delle diverse sedi regionali;
- è stata chiesta la collaborazione della Regione Campania, al fine di coinvolgere i propri dipendenti che svolgessero svariate mansioni lavorative (non solo di ufficio);
- sono stati arruolati nello studio i medici iscritti alla Scuola di Specializzazione in Medicina del Lavoro della Seconda Università degli Studi di Napoli (ora Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli") e i dipendenti amministrativi della stessa;
- ad ogni persona che ha aderito allo studio è stato chiesto di coinvolgere familiari e conoscenti;
- è stata chiesta la collaborazione di laboratori di analisi chimico-cliniche ubicati nelle diverse province campane, al fine di coinvolgere i propri pazienti.

A tutti i partecipanti è stato illustrato il progetto nelle sue modalità e finalità ed è stato spiegato che la partecipazione era volontaria e il trattamento dei campioni e delle informazioni raccolte si sarebbe svolto nel completo anonimato nel rispetto delle leggi vigenti sulla privacy.

Alle persone che hanno deciso di partecipare allo studio, è stato chiesto di compilare il questionario anonimo (cfr. paragrafo 6.3), al fine di raccogliere tutte le informazioni necessarie alla stratificazione del campione di popolazione arruolato, e una scheda di consenso informato a partecipare allo studio.

10. Fase 5: Monitoraggio biologico - Raccolta e analisi dei campioni biologici

Le fasi di monitoraggio biologico, fulcro del progetto, hanno consentito di arruolare un totale di 185 persone; tutti hanno fornito il campione urinario per il dosaggio sia del CrU sia del NiU e 128 hanno dato il consenso al prelievo di sangue per il dosaggio del piombo ematico.

I campioni urinari per la determinazione di Cr e Ni e quelli ematici per la determinazione del Pb sono stati trattati ed analizzati secondo le modalità previste dalle procedure sviluppate nelle fasi precedenti (cfr. paragrafo 7).

11. Fase 6: Creazione del database

11.1. Variabili raccolte mediante questionario

Ciascuna domanda del questionario somministrato ai soggetti reclutati è stata trasformata in variabile “continua” o “categoriale”, allo scopo di costruire un database riassuntivo dei dati raccolti, aggiornato in continuo, e consentire la fase di elaborazione e valutazione su base statistica dei risultati. In particolare, sono state considerate le variabili concernenti l'età, il sesso, la provincia e la zona di residenza, l'intensità di traffico nell'ambiente di vita, l'abitudine al fumo di sigaretta e il consumo di molluschi e crostacei e di alcol.

Va precisato che non sempre i soggetti reclutati nello studio hanno compilato integralmente il questionario somministrato, quindi nell'elaborazione statistica dei dati i casi con informazioni mancanti sono stati automaticamente scartati dal software adoperato (SPSS, versione 21.0).

11.2. Analisi delle variabili raccolte mediante questionario

L'analisi delle variabili raccolte ha fornito i risultati di seguito riportati, distinti per donatori di campioni urine e donatori di campioni di sangue, sebbene tutti i soggetti che hanno acconsentito al prelievo ematico abbiano partecipato anche allo studio per la determinazione di CrU e NiU.

Cromo e nichel urinari

I 185 soggetti che hanno fornito il campione urinario per il dosaggio di cromo e nichel urinari sono così ripartiti:

- **sesso:** il 54,1% (100 casi) è rappresentato da donne e il 45,9% (85 casi) da uomini (*figura 2, pannello a*);
- **età:** sono state individuate quattro classi di età, ovvero la variabile continua età è stata categorizzata, dividendo il campione in quartili: ≤ 35 anni (43 casi, 25,1%), 36-46 anni (42 casi, 24,6%), 47- 54 anni (47 casi, 27,5%) e ≥ 55 anni (39 casi, 22,8%), come mostrato in *figura 2, pannello b*;
- **abitudine al fumo di sigaretta:** è stata indagata richiedendo a ciascun soggetto informazioni sulla condizione attuale di fumatore, non fumatore, ex fumatore

(non fumatore da almeno 6 mesi) e sul numero di sigarette fumate attualmente e negli anni precedenti. Dall'analisi di tale variabile è emerso che i fumatori rappresentano il 25,4% dei casi (44), i non fumatori il 57,3% (99) e gli ex fumatori il 17,3% (30). Dal confronto delle distribuzioni delle concentrazioni di CrU e NiU nelle classi di non fumatori ed ex fumatori è emerso che nel campione raccolto non vi è differenza di escrezione urinaria dei due metalli ($p=0,163$ per NiU e $p=0,352$ per CrU), pertanto nelle fasi successive di analisi non fumatori ed ex fumatori sono stati accorpatis nella classe "non fumatori" al fine di rendere dicotomica la variabile concernente l'abitudine al fumo: il 25,4% del campione (44 casi) è costituito da fumatori e il 74,6% (129 casi) da non fumatori ed ex fumatori (*figura 2, pannello c*).

- **provincia di residenza:** il 60,5% (112) dei soggetti reclutati risiede a Napoli, l'8,7% (16) a Salerno, il 17,3% (32) a Caserta, il 11,9% (22) ad Avellino e l'1,6% (3) a Benevento (*figura 2, pannello d*).
- **zona di residenza:** è stato chiesto ai partecipanti allo studio se vivessero in una zona urbana, semiurbana, periferica, rurale, collinare, montana, lacustre o marina. È da precisare che area urbana e semiurbana sono state distinte principalmente per la differente densità di popolazione e traffico veicolare. È risultata un'ampia variabilità dei dati che non avrebbe permesso l'uso di tale informazione nell'analisi statistica (*figura 3, pannello a*), pertanto le aree periferica, collinare, montana, rurale e marina sono state inglobate in un'unica classe denominata "area extraurbana". Il risultato è stato che una piccola percentuale di soggetti (8,9%, 15 casi) risiede in area semiurbana, mentre il 53,2% (90 soggetti) e il 37,9% (64 casi) risiedono, rispettivamente, in area urbana e extraurbana (*figura 3, pannello b*).
- **traffico veicolare nell'ambiente di vita:** il 14,5% (24 casi) dei soggetti vive in zone con intensità di traffico bassa, il 39,4% (65) moderata, il 30,9% (51) elevata e il 15,2% (25) molto elevata (*figura 3, pannello c*).
- **consumo di molluschi e crostacei:** ai soggetti è stato chiesto con quale frequenza mangiassero molluschi e crostacei: mai, da raramente a due volte/mese, più di 1 volta/settimana. Le tre classi sono rappresentate dall'8,1% (13 casi), il 77,5% (124 casi) e il 14,4% (23 casi) dei soggetti reclutati, rispettivamente (*figura 3, pannello d*);
- **consumo di alcol (come vino):** il 57,7% (94 casi) del campione non beve vino e il 42,3% (69 casi) consuma vino (*figura 3, pannello e*).
- **quantità di vino consumato:** ai soggetti bevitori è stato chiesto quanto vino bevessero, ovvero <500, tra 500 e 1000 o >1000 ml/die: nessun soggetto arruolato beve più di 1L di vino al giorno, solo il 4,3% (7 casi) tra 500ml e 1L, il 38,0% (62 casi) meno di 500ml e il 57,7% (94 casi) non beve vino (*figura 3, pannello f*).

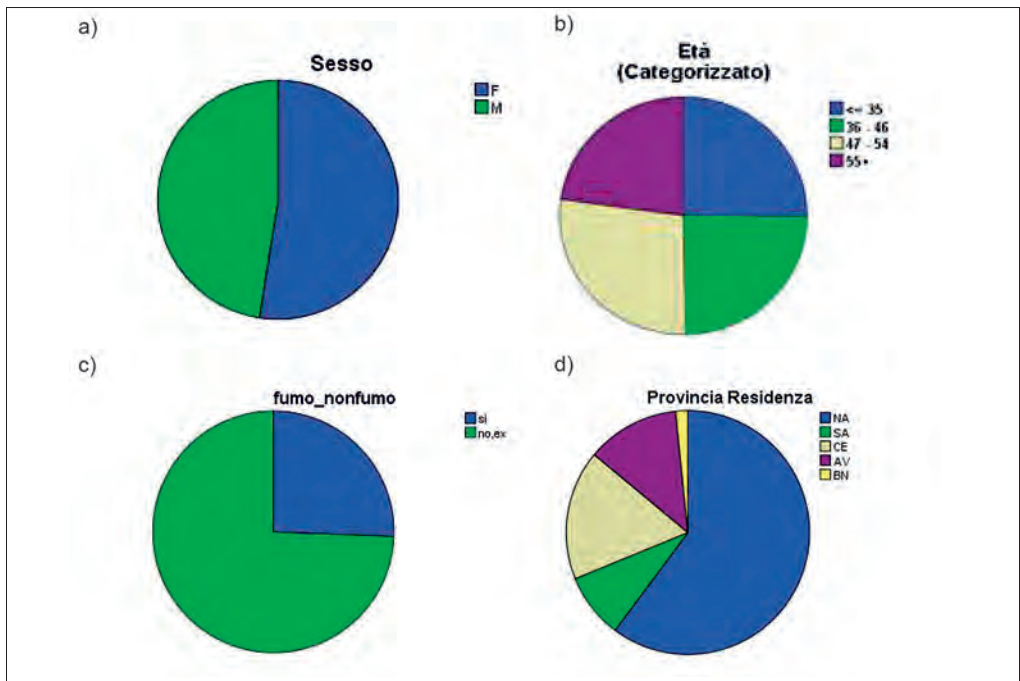


Figura 2 - Grafici delle frequenze di distribuzione dei soggetti arruolati nelle classi delle variabili sesso (a), età (b), abitudine al fumo (c) e provincia di residenza (d).

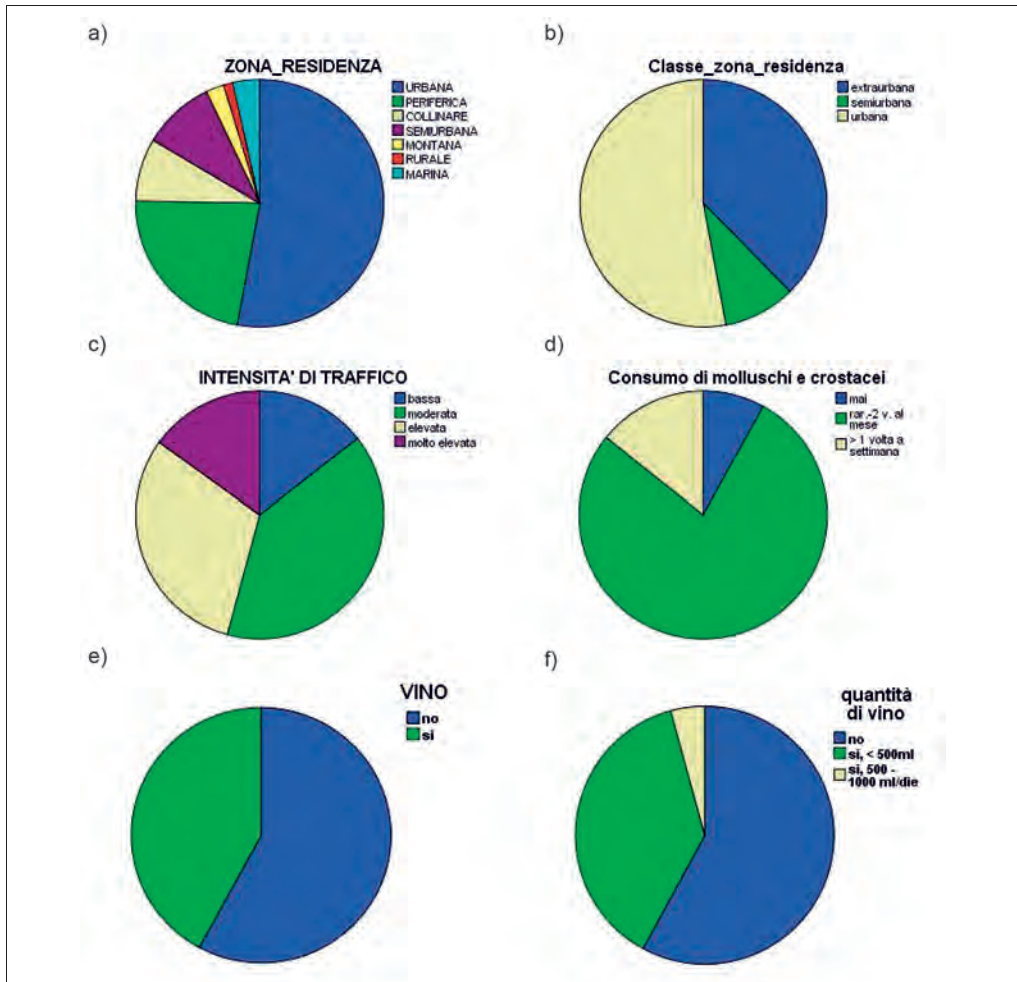


Figura 3 - Grafici delle frequenze di distribuzione dei soggetti arruolati nelle classi delle variabili zona di residenza (a), classe zona di residenza (b), intensità di traffico (c), consumo di molluschi e crostacei (d) e consumo di alcol (e) e quantità di alcol consumato (f).

Piombo ematico

I 128 soggetti che hanno fornito i campioni di sangue per il dosaggio del piombo ematico sono così ripartiti:

- **sexso**: il 57,8% (74 casi) è rappresentato da donne e il 42,2% (54 casi) da uomini (figura 4, pannello a);
- **età**: analogamente a quanto fatto per i soggetti che hanno fornito i campioni urinari, il campione è stato diviso in quattro classi di età: ≤ 35 anni (19,8%, 23 casi), 36- 46 anni (27,6%, 32 casi), 47-54 anni (26,7%, 29 casi) e ≥ 55 anni (25,9%, 35 casi) [figura 4, pannello b];

- **abitudine al fumo di sigaretta:** il campione è costituito per il 22% (26) dei casi da fumatori, per il 58,5% (69 casi) da non fumatori e per il 19,5% (23 casi) da ex fumatori (non fumatori da almeno 6 mesi), come rappresentato in *figura 4, pannello c*. Contrariamente a quanto dimostrato per CrU e NiU tra le distribuzioni delle concentrazioni di PbS nelle classi di non fumatori ed ex fumatori è emersa una differenza statisticamente significativa ($p=0,019$).
- **provincia di residenza:** il 69,5% (89) dei soggetti risiede a Napoli, il 17,2% (22) a Caserta, il 9,4% (12) ad Avellino, il 2,3% (3) a Salerno e l'1,6% (2) a Benevento (*figura 4, pannello d*).
- **zona di residenza:** per l'ampia variabilità dei dati ottenuti chiedendo ai partecipanti allo studio se vivessero in una zona urbana, semiurbana, periferica, rurale, collinare, montana, lacustre o marina (*figura 5, pannello a*), le aree periferica, collinare, montana, rurale e marina sono state inglobate in un'unica classe denominata "area extraurbana". Dall'analisi di frequenza delle classi di zona di residenza ottenute è emerso che una piccola percentuale di soggetti (8,6%, 10 casi) risiede in area semiurbana, mentre il 56,0% (65 casi) e il 35,4% (41 casi) risiedono, rispettivamente, in area urbana ed extraurbana (*figura 5, pannello b*).
- **traffico veicolare nell'ambiente di vita:** l'8,0% (9 casi) dei soggetti vive in zone con intensità di traffico bassa, il 41,6% (47 casi) moderata, il 31,8% (36 casi) elevata e il 18,6% (21 casi) molto elevata (*figura 5, pannello c*).
- **consumo di molluschi e crostacei:** ai soggetti è stato chiesto con quale frequenza mangiassero molluschi e crostacei: mai, da raramente a due volte/mese, più di 1 volta/settimana. Le tre classi sono rappresentate dal 9,0% (10 casi), il 73,0% (81 casi) e il 18,0% (20 casi) dei soggetti reclutati, rispettivamente (*figura 5, pannello d*);
- **consumo di alcol (come vino):** il 60,2% (68 casi) del campione non beve vino e il 39,8% (45 casi) consuma vino (*figura 5, pannello e*).
- **quantità di vino consumato:** ai soggetti è stato chiesto se bevessero vino e quanto, ovvero <500, tra 500 e 1000 o >1000 ml/die: nessun soggetto arruolato beve più di 1L di vino al giorno, solo il 2,7% (3 casi) tra 500ml e 1L, il 37,1% (42 casi) meno di 500ml e il 60,2% (68 casi) non beve vino (*figura 5, pannello f*).

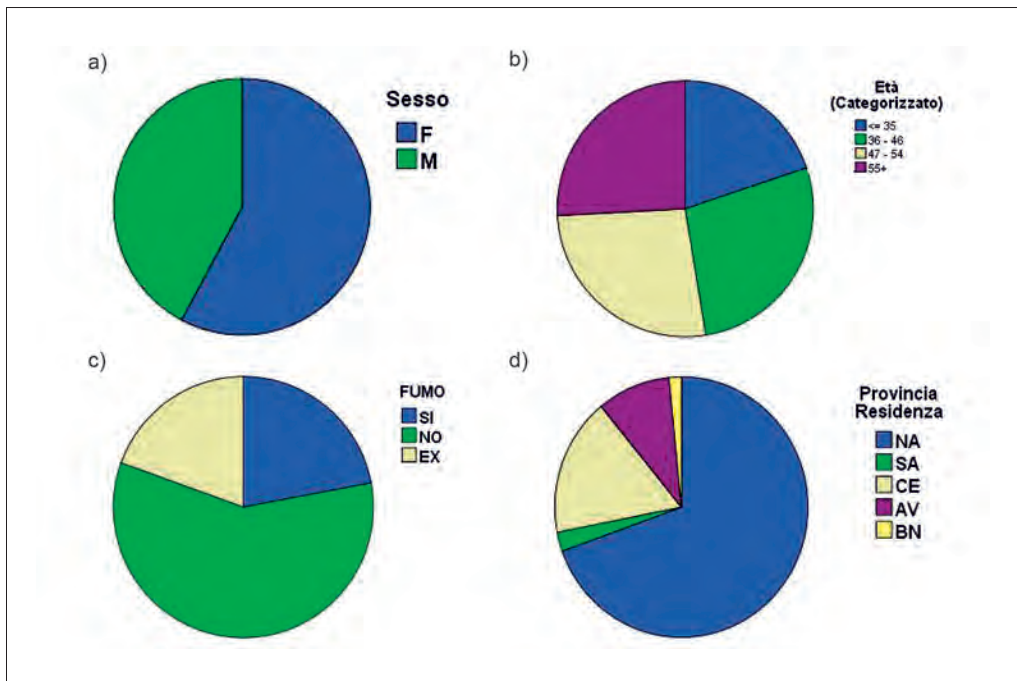


Figura 4 - Grafici delle frequenze di distribuzione dei soggetti arruolati nelle classi delle variabili sesso (a), età (b), abitudine al fumo (c) e provincia di residenza (d).

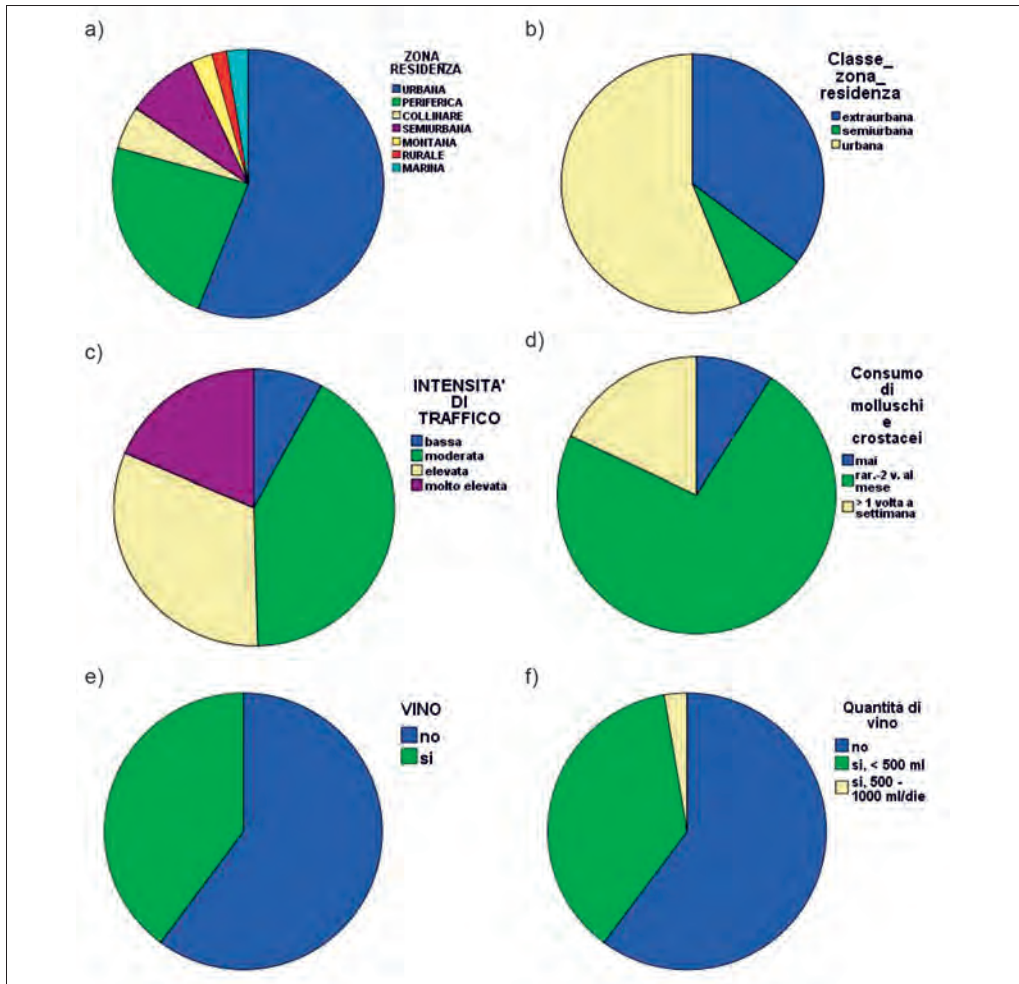


Figura 5 - Grafici delle frequenze di distribuzione dei soggetti arruolati nelle classi delle variabili zona di residenza (a), classe zona di residenza (b), intensità di traffico (c), consumo di molluschi e crostacei (d) e consumo di alcol (e) e quantità di alcol consumato (f).

12. Fase 7: Elaborazione statistica dei dati del monitoraggio biologico

12.1. Metodi di analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita mediante il software package SPSS, versione 21.0.

La normalità della distribuzione delle diverse variabili è stata verificata con il test di Shapiro-Wilk o Kolmogorov-Smirnov, a seconda che il numero di casi fosse < oppure > di 30, rispettivamente.

I test non parametrici applicati per il confronto tra le mediane di due o più campioni con distribuzioni non normali della variabile in esame sono i seguenti:

- test U di Mann-Whitney (somma dei ranghi), che verifica l'ipotesi che due campioni indipendenti provengano da popolazioni con la stessa distribuzione; tale test si applica a variabili dicotomiche, anche quando i campioni hanno dimensione diversa;
- test di Kruskal-Wallis (varianza dei ranghi), che verifica l'ipotesi che più campioni indipendenti provengano dalla stessa popolazione oppure da popolazioni che abbiano la stessa mediana;
- test della mediana, che stabilisce se due o più gruppi appartengono alla stessa popolazione o a popolazioni con mediane uguali.

In caso di normalità delle distribuzioni delle variabili in esame, sono stati applicati, per il confronto delle medie di due o più campioni, i test parametrici t di Student e ANOVA univariata (ANalysis Of VAriance), rispettivamente, eseguendo test di confronto multiplo (Bonferroni) in caso di differenze statisticamente significative tra le medie.

Per tutti i test è stata rifiutata l'ipotesi nulla H_0 se il *p-value* è risultato inferiore a 0,05.

Per l'analisi statistica dei dati i casi con concentrazione urinaria di cromo e nichel al di sotto dei limiti di rivelabilità delle metodiche (0,110 e 0,170 $\mu\text{g/L}$) sono stati inseriti nel database con un valore di 0,055 e 0,085 $\mu\text{g/L}$, rispettivamente, così come suggerito dallo specialista fornitore del software. In nessun caso la concentrazione di piombo ematico (da qui PbS) è risultata inferiore al limite di rivelabilità del metodo.

Ai dati mancanti nel database è stato attribuito il valore 100, affinché il software potesse riconoscerli e scartarli automaticamente.

12.2. Elaborazione statistica dei dati di concentrazione di cromo urinario

Campione della popolazione campana

Dall'analisi descrittiva delle concentrazioni di cromo nelle urine dei 185 soggetti campani indagati (*tabella 11*) e dal test di normalità è emerso che nel campione di popolazione preso in esame tali valori non seguono una distribuzione normale ($p=0,000$), come si evince anche dall'istogramma riportato in *figura 6*, anche applicando una trasformazione lognormale.

Tabella 11 - Statistiche descrittive delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione campana.

		Statistica	
[Cr], µg/L	Numero di casi	185	
	Media ± Errore std.	0,306 ± 0,034	
	Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,240
		Limite superiore	0,373
	Mediana	0,055	
	Media Geometrica	0,137	
	Deviazione std.	0,458	
	5° Percentile	0,055	
	95° Percentile	1,386	
	Minimo	0,055	
Massimo	2,540		

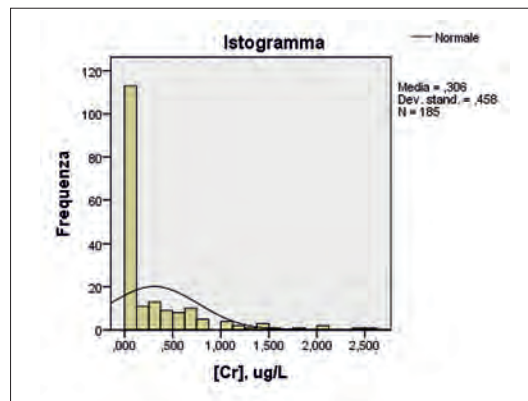


Figura 6 - Istogramma di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione campana.

Nel boxplot riportato di seguito (*figura 7*), si riassume la distribuzione della concentrazione di CrU del campione di popolazione campana arruolato nello studio: la

linea inserita all'interno del box indica il valore mediano; le estremità del box i quartili Q_1 (25° percentile) e Q_3 (75° percentile); le estremità dei baffi indicano il valore adiacente superiore e inferiore e racchiudono, nel caso di distribuzioni normali, il 95% dei dati; i cerchi e gli asterischi rappresentano i valori esterni e quelli estremi, rispettivamente.

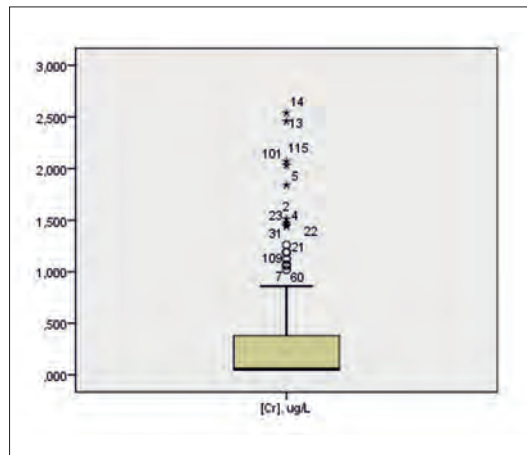


Figura 7 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione campana.

L'assenza nel boxplot del baffo inferiore è ascrivibile all'elevatissima frequenza percentuale di casi (58,9%, pari a 109 su 185) che ha presentato una concentrazione di cromo nelle urine al di sotto del limite di sensibilità del metodo analitico. Al fine di comprendere se vi fossero differenze significative tra le distribuzioni delle concentrazioni di cromo urinario nelle classi delle variabili precedentemente descritte, è stata eseguita l'analisi delle distribuzioni stratificate secondo ciascuna delle variabili prese in esame; di seguito si riportano i risultati ottenuti.

Campione della popolazione campana stratificato per sesso

Come già descritto in precedenza, il campione arruolato è costituito da 100 donne e 85 uomini.

La distribuzione dei livelli di cromuria non è normale in entrambe le classi ($p=0,000$), come si evince sia dagli istogrammi e dai boxplot rappresentativi delle distribuzioni dei valori della variabile in esame (*figure 8 e 9*), sia dai risultati dell'analisi descrittiva riportati in *tabella 12*.

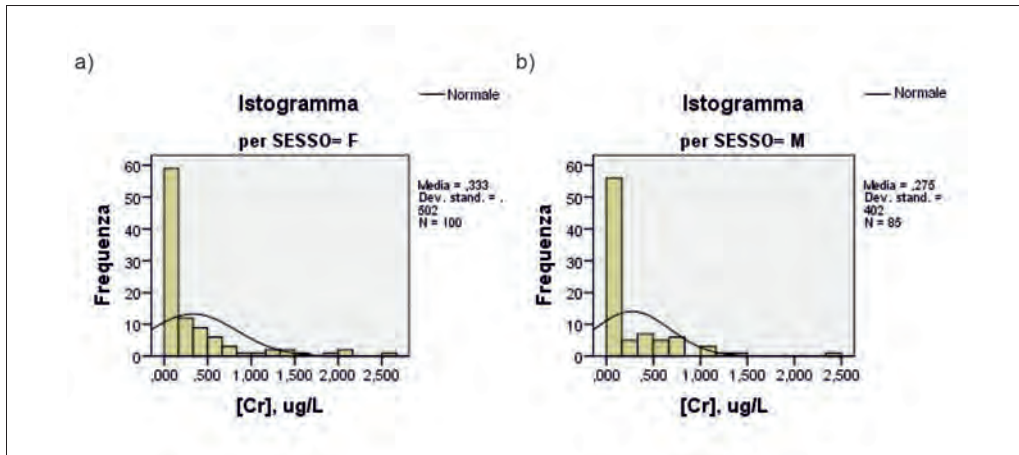


Figura 8 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione stratificato per sesso: donne nel pannello a e uomini nel pannello b.

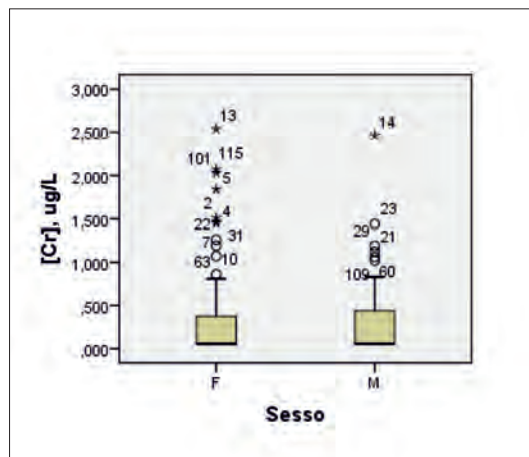


Figura 9 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione stratificato per sesso (F = femminile e M = maschile).

Tabella 12 - Statistiche descrittive delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione campana stratificata per sesso (F = femminile e M = maschile).

		Statistica		
[Cr], µg/L	F	Numero di casi	100	
		Media ± Errore std.	0,333 ± ,050	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,233
			Limite superiore	0,433
		Mediana	0,055	
		Media Geometrica	0,145	
		Deviazione std.	0,502	
		5° Percentile	0,055	
		95° Percentile	1,508	
		Minimo	0,055	
	Massimo	2,540		
	M	Numero di casi	85	
		Media ± Errore std.	0,275 ± ,044	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,188
			Limite superiore	0,361
		Mediana	0,055	
Media Geometrica		0,127		
Deviazione std.		0,406		
5° Percentile		0,055		
95° Percentile	1,102			
Minimo	0,055			
Massimo	2,460			

Il confronto delle distribuzioni delle concentrazioni di cromo nelle donne e negli uomini effettuato mediante il test non parametrico U di Mann-Whitney a campioni indipendenti non ha mostrato differenze significative di CrU tra le due categorie in esame ($p=0,565$), analogamente al test delle mediane ($p=0,670$).

Campione della popolazione campana stratificato per classi di età

Il campione arruolato è stato stratificato per classi di età, come precedentemente descritto (cfr. paragrafo 11.2).

Anche in questo caso la distribuzione dei livelli di CrU non è normale in nessuna delle quattro classi considerate ($p=0,000$ per tutte le sottodistribuzioni), come si evince sia dall'analisi descrittiva riportata in *tabella 13*, sia dagli istogrammi e dai boxplot rappresentativi delle distribuzioni dei valori della variabile in esame (*figure 10 e 11*).

Tabella 13 - Statistiche descrittive delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione campana stratificata per età categorizzata dividendo il campione in quartili.

		Statistica		
[Cr], µg/L	≤ 35 anni	Numero di casi	43	
		Media ± Errore std.	0,433 ± 0,088	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,257
			Limite superiore	0,610
		Mediana	0,120	
		Media Geometrica	0,187	
		Deviazione std.	0,574	
		5° Percentile	0,055	
		95° Percentile	1,958	
		Minimo	0,055	
	Massimo	2,460		
	36-46 anni	Numero di casi	42	
		Media ± Errore std.	0,245 ± 0,065	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,114
			Limite superiore	0,375
		Mediana	0,055	
		Media Geometrica	0,116	
		Deviazione std.	0,419	
		5° Percentile	0,055	
		95° Percentile	1,669	
		Minimo	0,055	
	Massimo	2,030		
	47-54 anni	Numero di casi	47	
		Media ± Errore std.	0,239 ± 0,063	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,112
			Limite superiore	0,366
		Mediana	0,055	
		Media Geometrica	0,111	
		Deviazione std.	0,433	
		5° Percentile	0,055	
		95° Percentile	1,166	
		Minimo	0,05	
	Massimo	2,540		
≥ 55 anni	Numero di casi	39		
	Media ± Errore std.	0,269 ± 0,055		
	Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,157	
		Limite superiore	0,380	
	Mediana	0,055		
	Media Geometrica	0,130		
	Deviazione std.	0,344		
	5° Percentile	0,055		
	95° Percentile	1,190		
	Minimo	0,055		
Massimo	1,260			

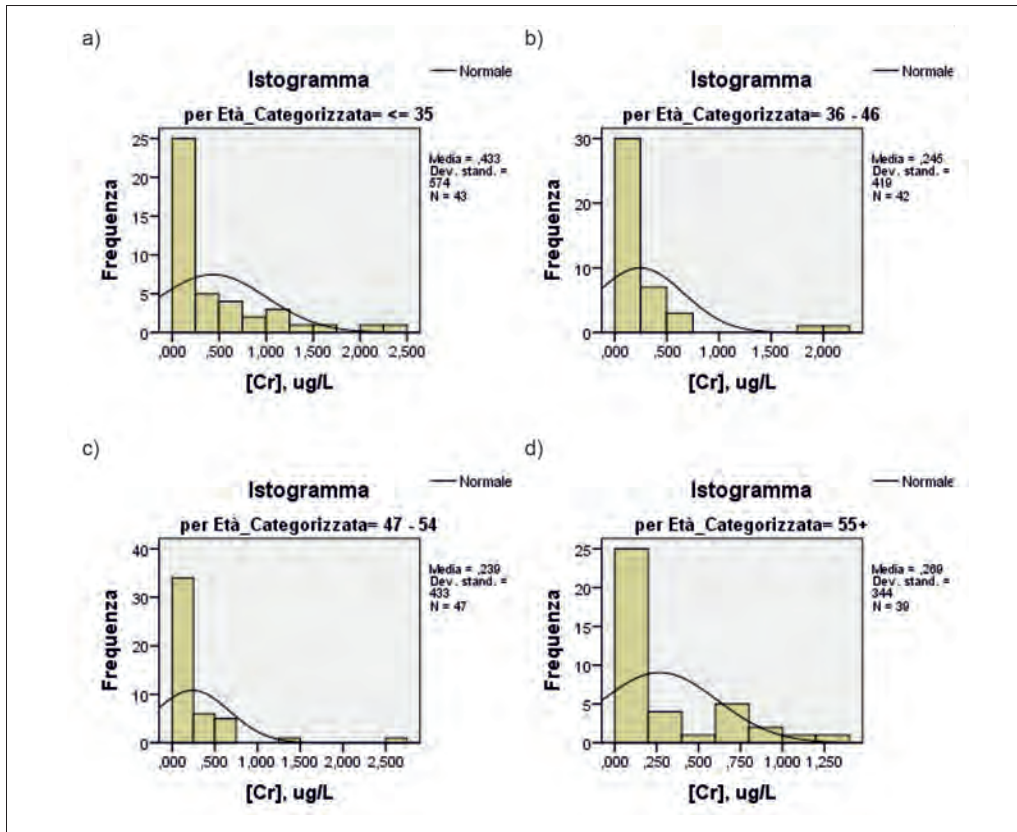


Figura 10 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione stratificato classi di età: ≤35 anni, pannello a; 36-46 anni, pannello b; 47-54, pannello c; ≥55 pannello d.

Sono state confrontate, quindi, le distribuzioni delle concentrazioni di cromo tra le classi di età individuate, mediante due test non parametrici, il test di Kruskal-Wallis per campioni indipendenti e il test delle mediane: entrambi non hanno mostrato differenze significative tra le quattro categorie di età in esame ($p=0,194$ e $p=0,390$, rispettivamente).

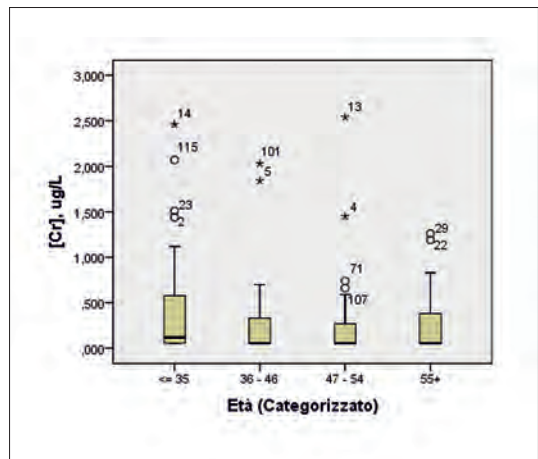


Figura 11 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione stratificato per classi di età.

Campione della popolazione campana stratificato per abitudine al fumo

Come già descritto in precedenza, il campione arruolato è costituito da 44 fumatori e 129 tra non fumatori ed ex fumatori. Dagli istogrammi e dai boxplot rappresentativi delle distribuzioni dei valori della variabile in esame (figure 12 e 13) e dai risultati dell'analisi descrittiva riportati in tabella 14, si comprende che la distribuzione dei livelli di cromuria non è normale in entrambe le classi considerate (p=0,000).

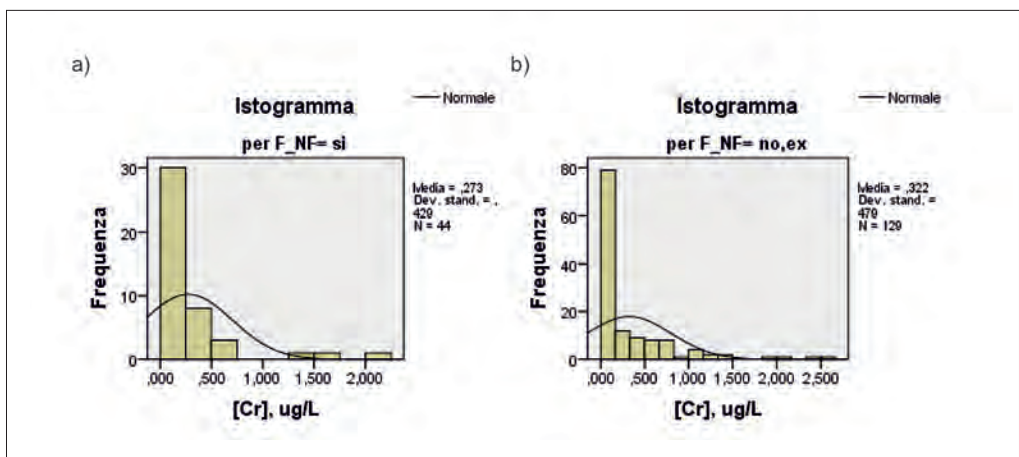


Figura 12 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione stratificato per presenza (pannello a) e assenza (pannello b) di abitudine al fumo.

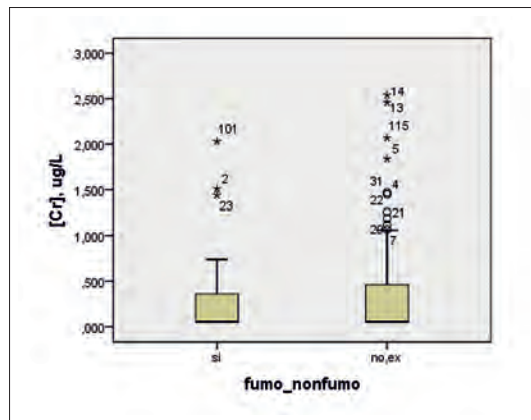


Figura 13 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione stratificato per presenza e assenza di abitudine al fumo.

Tabella 14 - Statistiche descrittive delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione campana stratificata per presenza e assenza di abitudine al fumo.

			Statistica	
[Cr], µg/L	Si	Numero di casi	44	
		Media ± Errore std.	0,273 ± 0,065	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,142
			Limite superiore	0,403
		Mediana	0,055	
		Media Geometrica	0,125	
		Deviazione std.	0,429	
		5° Percentile	0,055	
		95° Percentile	1,493	
	Minimo	0,055		
	Massimo	2,030		
	No, Ex	Numero di casi	129	
		Media ± Errore std.	0,322 ± 0,042	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,239
			Limite superiore	0,406
		Mediana	0,055	
		Media Geometrica	0,141	
Deviazione std.		0,479		
5° Percentile		0,055		
95° Percentile		1,355		
Minimo	0,055			
Massimo	2,540			

Applicando i test di confronto U di Mann-Whitney per campioni indipendenti e test della mediana, è emerso che le distribuzioni di concentrazioni di cromo urinario nei fumatori e non fumatori sono analoghe (p=0,564 e p=0,843, rispettivamente).

Campione della popolazione campana stratificato per provincia di residenza

Come si evince da quanto detto in precedenza circa la stratificazione del campione di popolazione campana per provincia di residenza (cfr. paragrafo 11.2), le classi così ottenute non sempre sono costituite da almeno 40 soggetti comportando, quindi, un numero non significativo di campioni per strato; tuttavia, per completezza si illustrano i risultati ottenuti.

In nessuna delle cinque province la distribuzione dei livelli di CrU è normale ($p=0,000$ per ogni distribuzione), come si evince, sia dai boxplot e dagli istogrammi rappresentativi delle distribuzioni dei valori della variabile in esame (figure 14 e 15) sia dall'analisi descrittiva riportata in tabella 15.

È opportuno precisare che per la provincia di Benevento sia per l'esiguità del campione, costituito da 3 casi, sia per la concentrazione di cromo urinario costante ($< LOD$), il software stesso ha ommesso qualsiasi output concernente tale provincia, ad eccezione del boxplot.

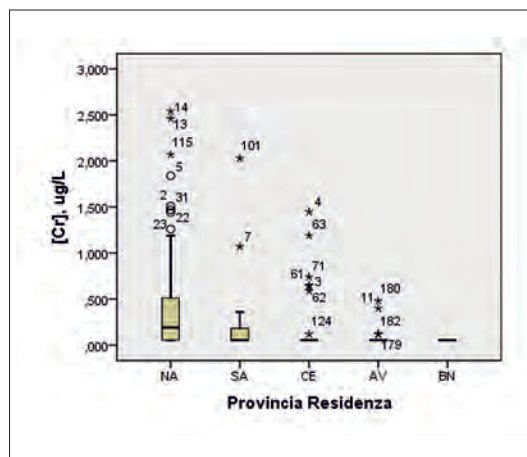


Figura 14 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione stratificato per provincia di residenza.

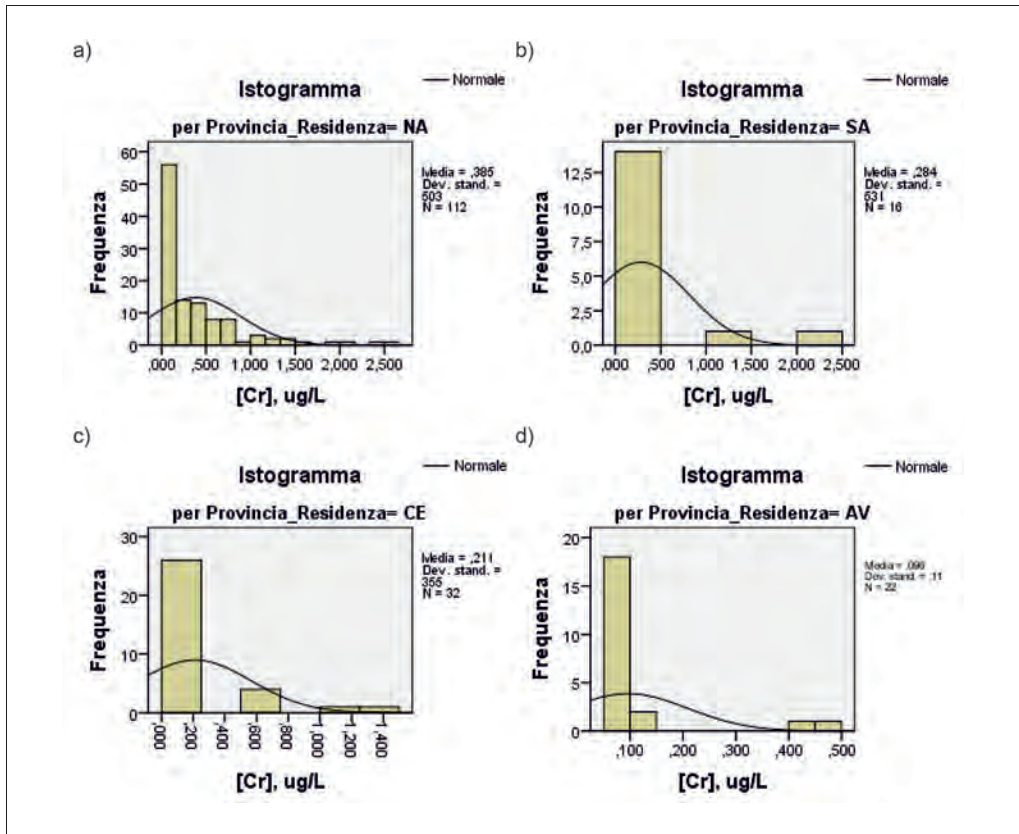


Figura 15 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione stratificato per provincia di residenza (per BN è stato omesso).

Tabella 15 - Statistiche descrittive delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione campana stratificata per provincia di residenza.

		Statistica		
[Cr], µg/L	NA	Numero di casi	112	
		Media ± Errore std.	0,385 ± 0,047	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,290
			Limite superiore	0,479
		Mediana	0,190	
		Media Geometrica	0,181	
		Deviazione std.	0,503	
		5° Percentile	0,055	
		95° Percentile	1,484	
		Minimo	0,055	
	Massimo	2,540		
	SA	Numero di casi	16	
		Media ± Errore std.	0,284 ± 0,133	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,001
			Limite superiore	0,567
		Mediana	0,055	
		Media Geometrica	0,116	
		Deviazione std.	0,531	
		5° Percentile	0,055	
		95° Percentile	1,358	
		Minimo	0,055	
	Massimo	2,030		
	CE	Numero di casi	32	
		Media ± Errore std.	0,219 ± 0,063	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,083
			Limite superiore	0,339
		Mediana	0,055	
		Media Geometrica	0,094	
		Deviazione std.	0,355	
		5° Percentile	0,055	
		95° Percentile	1,281	
		Minimo	0,055	
	Massimo	1,450		
	AV	Numero di casi	22	
		Media ± Errore std.	0,096 ± 0,024	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,0456
Limite superiore			0,146	
Mediana		0,055		
Media Geometrica		0,071		
Deviazione std.		0,114		
5° Percentile		0,055		
95° Percentile		0,468		
Minimo		0,055		
Massimo	0,480			

Sono state confrontate, quindi, le distribuzioni delle concentrazioni di cromo urinario nelle province di residenza, mediante i test non parametrici di Kruskal-Wallis e della mediana per campioni indipendenti, che hanno mostrato differenze significative tra le categorie in esame ($p=0,001$ in entrambi i casi).

Nonostante la bassa numerosità delle classi relative ad alcune delle province indagate renda poco significativa l'applicazione di test statistici (parametrici o non parametrici), analizzando il boxplot in figura 9 e i valori delle mediane in tabella 9, appare evidente che la concentrazione di cromo urinario riscontrata nella popolazione di Napoli (che è rappresentata da un campione di 112 casi) risulti nettamente differente da quelle di Avellino e Caserta (22 e 32 casi, rispettivamente). Tale osservazione è stata confermata dal confronto, mediante il test U di Mann-Whitney, tra la distribuzione della variabile in esame nella provincia di Napoli e nelle province di Avellino e Caserta ($p=0,001$ e $0,008$, rispettivamente).

Campione della popolazione campana stratificato per zona di residenza

Le distribuzioni dei livelli di CrU non sono normali nelle zone di residenza prese in considerazione ($p=0,000$ in ogni caso), come si evince sia dai boxplot e dagli istogrammi rappresentativi delle distribuzioni dei valori della variabile in esame (figure 16 e 17) sia dall'analisi descrittiva riportata in tabella 16.

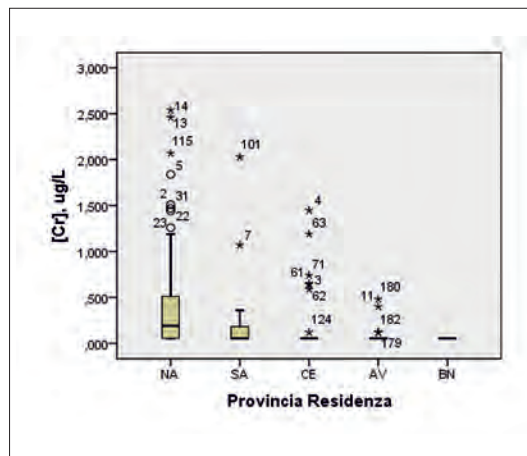


Figura 16 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione stratificato per zona di residenza.

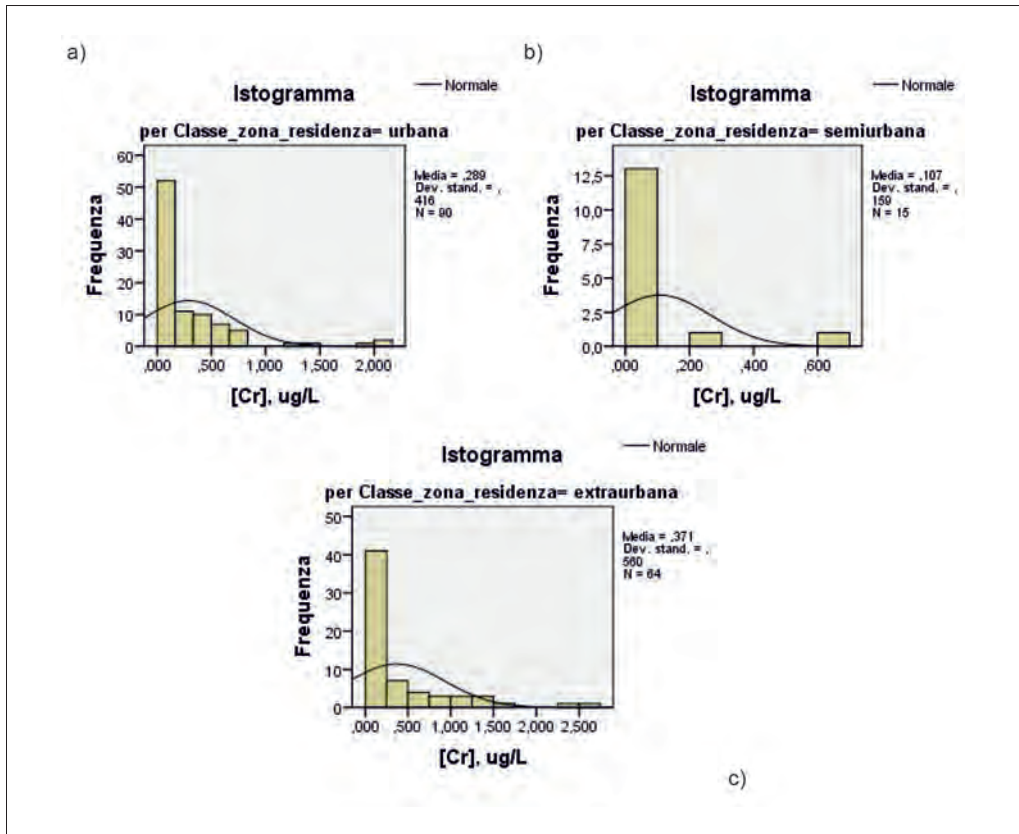


Figura 17 - Istogramma di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione stratificato per zona di residenza: a) urbana, b) semiurbana e c) extraurbana.

Tabella 16 - Statistiche descrittive delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione campana stratificata per zona di residenza.

		Statistica		
[Cr], µg/L	urbana	Numero di casi	90	
		Media ± Errore std.	0,289 ± 0,044	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,202
			Limite superiore	0,377
		Mediana	0,055	
		Media Geometrica	0,140	
		Deviazione std.	0,416	
		5° Percentile	0,055	
		95° Percentile	1,316	
	Minimo	0,055		
	Massimo	2,070		
	semiurbana	Numero di casi	15	
		Media ± Errore std.	0,107 ± 0,041	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,019
			Limite superiore	0,195
		Mediana	0,055	
		Media Geometrica	0,071	
		Deviazione std.	0,156	
		5° Percentile	0,055	
		90° Percentile	0,402	
	Minimo	0,055		
	Massimo	0,605		
	extraurbana	Numero di casi	64	
		Media ± Errore std.	0,371 ± 0,070	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,231
			Limite superiore	0,510
		Mediana	0,055	
Media Geometrica		0,148		
Deviazione std.		0,560		
5° Percentile		0,055		
95° Percentile		1,495		
Minimo	0,055			
Massimo	2,540			

Sono state confrontate, quindi, le distribuzioni delle concentrazioni di cromo urinario tra le aree di residenza, mediante i test non parametrici della mediana e di Kruskal-Wallis per campioni indipendenti: i test applicati non hanno mostrato differenze significative tra le CrU delle categorie in esame ($p=0,073$ e $p=0,080$, rispettivamente).

Campione della popolazione campana stratificato per intensità di traffico

Le distribuzioni dei livelli di CrU non sono normali nelle classi di intensità di traffico in cui il campione è stato stratificato in base alle informazioni ottenute ($p=0,000$ in ogni classe), come si evince sia dai boxplot e dagli istogrammi rappresentativi delle distribuzioni dei valori della variabile in esame (figure 18 e 19) sia dall'analisi descrittiva riportata in tabella 17.

Sono state confrontate, quindi, le distribuzioni delle concentrazioni di cromo tra le aree a diversa intensità di traffico, mediante il test non parametrico di Kruskal-Wallis per campioni indipendenti, che non ha mostrato differenze significative tra le categorie in esame ($p=0,499$); analogamente, il p -value del test della mediana è pari a 0,428.

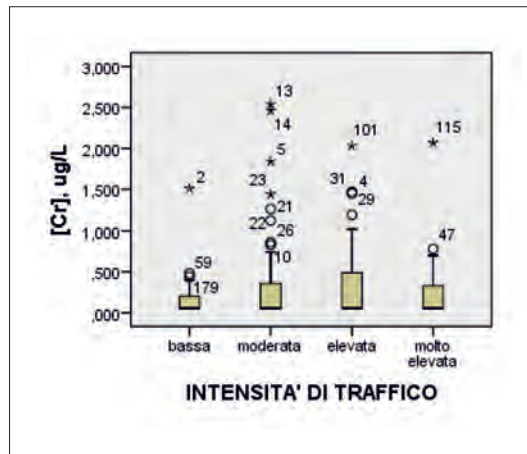


Figura 18 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione stratificato per intensità di traffico.

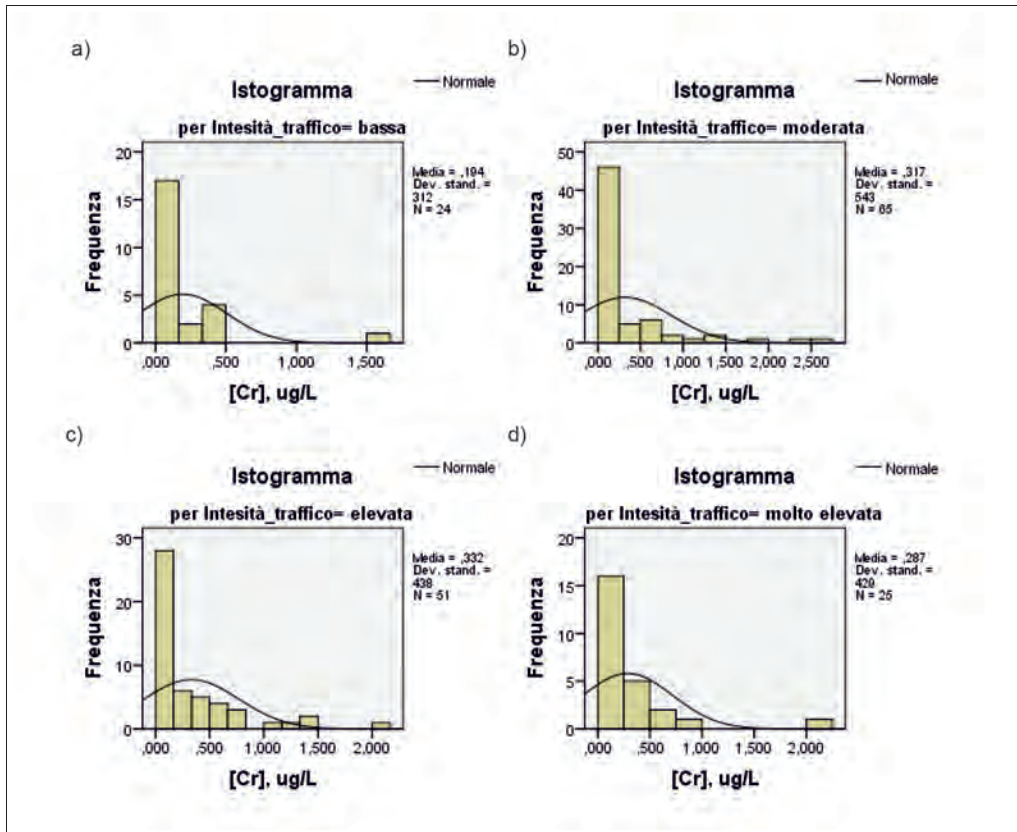


Figura 19 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione stratificato per intensità di traffico: a) bassa, b) moderata, c) elevata e d) molto elevata.

Tabella 17 - Statistiche descrittive delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione campana stratificato per intensità di traffico.

		Statistica		
[Cr], µg/L	Bassa	Numero di casi	24	
		Media ± Errore std.	0,193 ± 0,637	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,062
			Limite superiore	0,325
		Mediana	0,055	
		Media Geometrica	0,105	
		Deviazione std.	0,312	
		5° Percentile	0,055	
		95° Percentile	1,253	
	Minimo	0,055		
	Massimo	1,510		
	Moderata	Numero di casi	65	
		Media ± Errore std.	0,317 ± 0,067	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,183
			Limite superiore	0,452
		Mediana	0,055	
		Media Geometrica	0,123	
		Deviazione std.	0,543	
		5° Percentile	0,055	
		95° Percentile	1,720	
	Minimo	0,055		
	Massimo	2,540		
	Elevata	Numero di casi	51	
		Media ± Errore std.	0,332 ± 0,061	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,209
			Limite superiore	0,455
		Mediana	0,055	
		Media Geometrica	0,157	
		Deviazione std.	0,438	
		5° Percentile	0,055	
		95° Percentile	1,458	
	Minimo	0,055		
	Massimo	2,030		
Molto elevata	Numero di casi	25		
	Media ± Errore std.	0,287 ± 0,086		
	Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,110	
		Limite superiore	0,464	
	Mediana	0,055		
	Media Geometrica	0,145		
	Deviazione std.	0,429		
	5° Percentile	0,055		
	95° Percentile	1,683		
Minimo	0,055			
Massimo	2,070			

Campione della popolazione campana stratificato per consumo di molluschi e crostacei

Le distribuzioni dei livelli di CrU non è normale nelle classi ottenute dalla stratificazione del campione per frequenza di consumo di molluschi e crostacei, ovvero mai, da raramente a 2 volte al mese e più di una volta a settimana ($p=0,004$, $0,000$ e $0,000$, rispettivamente). Di seguito si riportano i boxplot, gli istogrammi (*figure 20 e 21*) e l'analisi descrittiva (*tabella 18*) rappresentativi delle distribuzioni dei valori della variabile in esame.

Sono state confrontate, inoltre, le distribuzioni delle concentrazioni di cromo per ciascuno strato, mediante il test non parametrico di Kruskal-Wallis per campioni indipendenti e il test della mediana, che non hanno mostrato differenze significative tra le categorie in esame ($p=0,956$ e $p=0,719$, rispettivamente).

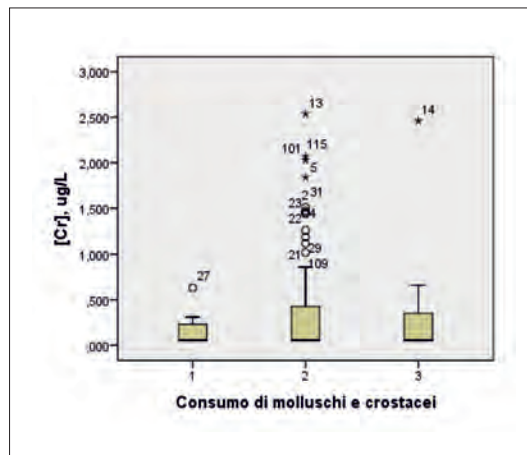


Figura 20 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione stratificato per frequenza di consumo di molluschi e crostacei (1 = mai; 2 = da raramente a 2 volte al mese; 3 = più di una volta a settimana).

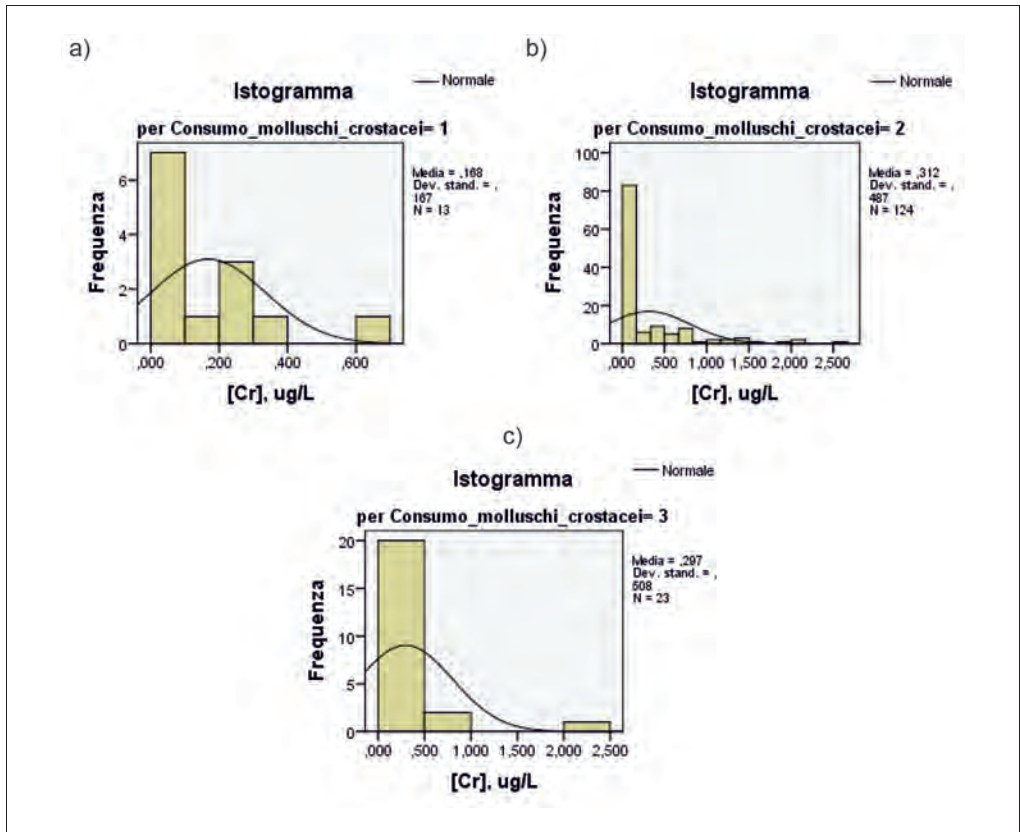


Figura 21 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione stratificato per frequenza di consumo di molluschi e crostacei: a) mai, b) da raramente a 2 volte al mese, c) più di una volta a settimana.

Tabella 18 - Statistiche descrittive delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione campana stratificata per frequenza di consumo di molluschi e crostacei.

		Statistica		
[Cr], µg/L	mai	Numero di casi	13	
		Media ± Errore std.	0,168 ± 0,046	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,067
			Limite superiore	0,269
		Mediana	0,055	
		Media Geometrica	0,115	
		Deviazione std.	0,167	
		5° Percentile	0,055	
		90° Percentile	0,502	
		Minimo	0,055	
	Massimo	0,630		
	Da raramente a 2 volte/mese	Da raramente a 2 volte/mese Numero di casi	124	
		Media ± Errore std.	0,312 ± 0,043	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,225
			Limite superiore	0,398
		Mediana	0,055	
		Media Geometrica	0,193	
		Deviazione std.	0,487	
		5° Percentile	0,055	
		95° Percentile	1,465	
		Minimo	0,055	
	Massimo	2,540		
	Più di una volta a settimana	Numero di casi	23	
		Media ± Errore std.	0,296 ± 0,105	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,077
			Limite superiore	0,516
		Mediana	0,055	
Media Geometrica		0,140		
Deviazione std.		0,507		
5° Percentile		0,055		
95° Percentile		2,100		
Minimo		0,055		
Massimo	2,460			

Campione della popolazione campana stratificato per consumo di alcol

Per quanto concerne la stratificazione del campione di popolazione in base al consumo di alcol inteso come vino, il 57,7% dei soggetti non beve vino; la parte rimanente di soggetti beve tra 500ml e 1L (4,3%) e meno di 500ml (38,0%) di vino al giorno. Tutte le distribuzioni di concentrazione di CrU non sono normali ($0,000 < p < 0,014$), come si comprende anche dagli istogrammi riportati in *figura 22* e dal boxplot di *figura 23*.

Si riporta di seguito (*tabella 19*) l'analisi descrittiva delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione campana stratificata per consumo di vino.

Tabella 19 - Statistiche descrittive delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione campana stratificato per consumo di vino.

		Statistica		
[Cr], µg/L	NO	Numero di casi	94	
		Media ± Errore std	0,285 ± 0,045	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,196
			Limite superiore	0,374
		Mediana	0,055	
		Media Geometrica	0,130	
		Deviazione std.	0,436	
		5° Percentile	0,055	
		95° Percentile	1,443	
		Minimo	0,055	
	Massimo	0,190		
	< 500 ml/die	Numero di casi	62	
		Media ± Errore std	0,298 ± 0,061	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,174
			Limite superiore	0,422
		Mediana	0,055	
		Media Geometrica	0,127	
		Deviazione std.	0,487	
		5° Percentile	0,055	
		95° Percentile	1,428	
		Minimo	0,055	
	Massimo	2,540		
	500-1000 ml/die	Numero di casi	7	
		Media ± Errore std	0,267 ± 0,102	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,017
			Limite superiore	0,517
		Mediana	0,055	
Media Geometrica		0,147		
Deviazione std.		0,270		
5° Percentile		0,055		
75° Percentile		0,510		
Minimo		0,055		
Massimo	0,660			

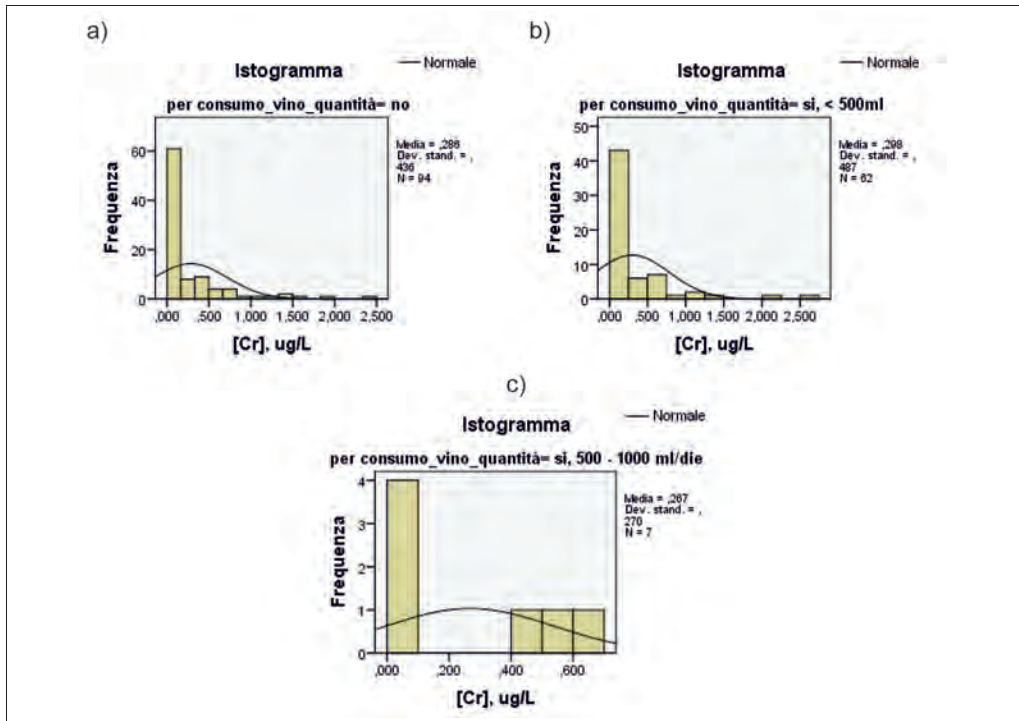


Figura 22 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione stratificato per consumo di vino: a) no, b) si, <500ml/die, c) si, 500-1000ml/die.

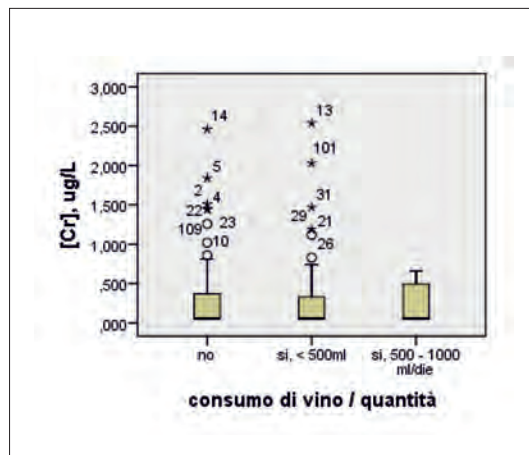


Figura 23 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione stratificato per consumo di vino.

Essendo esiguo il numero di soggetti che bevono tra 500ml e 1L di vino al giorno (7 casi), sono state confrontate le distribuzioni delle concentrazioni di cromo urinario tra le classi costituite da soggetti che non bevono e soggetti che bevono <500ml/die, mediante il test U di Mann-Whitney; non è stata evidenziata una differenza significativa di CrU tra le due classi confrontate ($p=0,819$).

12.3. Elaborazione statistica dei dati di concentrazione di nichel urinario

Campione della popolazione campana

Nell'elaborazione dei dati di NiU si è ritenuto opportuno scartare un soggetto (con NiU=9,65 μ g/L) affetto da sensibilizzazione chimica multipla e consumatore abituale di integratori alimentari, che spesso contengono il metallo in esame.

Dall'analisi descrittiva delle concentrazioni di nichel nelle urine dei 184 soggetti campani indagati (*tabella 20*), dall'istogramma riportato in *figura 24* e dal test di normalità è emerso che nel campione di popolazione preso in esame le concentrazioni di NiU non seguono una distribuzione normale ($p=0,000$), anche applicando una trasformazione logaritmica (logaritmo naturale), verosimilmente a seguito dell'elevata frequenza percentuale di casi (38,6% pari a 71 soggetti su 184) con concentrazione di nichel urinario al di sotto del limite di sensibilità del metodo analitico.

In *figura 25* si riporta il boxplot della distribuzione della concentrazione di NiU del campione di popolazione campana indagato.

Tabella 20 - Statistiche descrittive delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione campana.

		Statistica	
[Ni], μ g/L	Numero di casi	184	
	Media \pm Errore std.	0,704 \pm 0,073	
	Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,561
		Limite superiore	0,848
	Mediana	0,240	
	Media Geometrica	0,303	
	Deviazione std.	0,987	
	5° Percentile	0,085	
	95° Percentile	2,988	
	Minimo	0,085	
	Massimo	6,00	

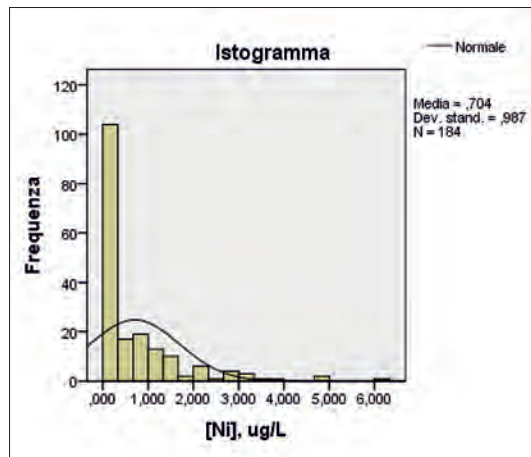


Figura 24 - Istogramma di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione campana.

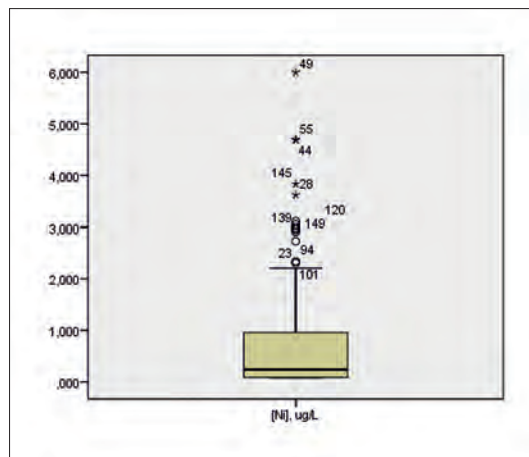


Figura 25 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione campana.

Campione della popolazione campana stratificato per sesso

Il campione arruolato nello studio è costituito da 99 donne e 85 uomini. La distribuzione dei livelli di nichel nelle urine non è normale in entrambe le classi ($p=0,000$), come si evince sia dagli istogrammi e dai boxplot rappresentativi delle distribuzioni dei valori della variabile in esame (*figure 26 e 27*) sia dai risultati dell'analisi descrittiva riportati in *tabella 21*.

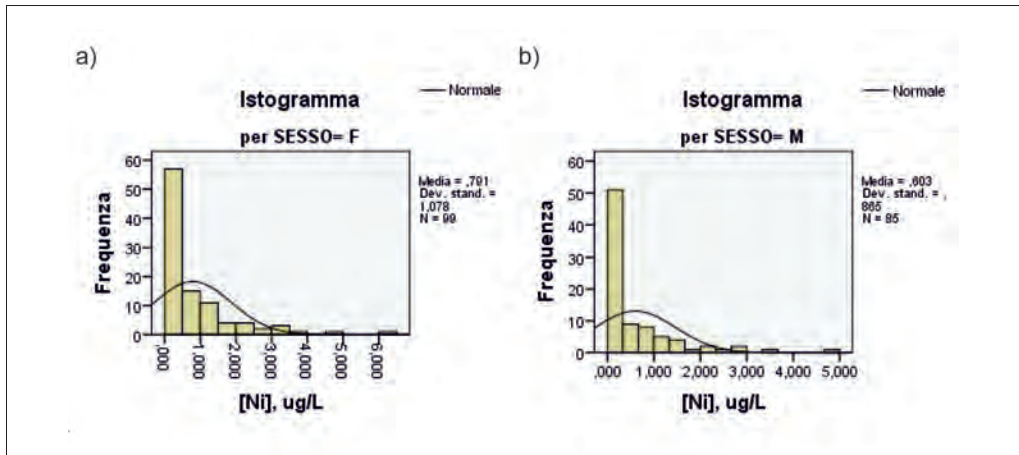


Figura 26 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione stratificato per sesso: a) F = femminile e b) M = maschile.

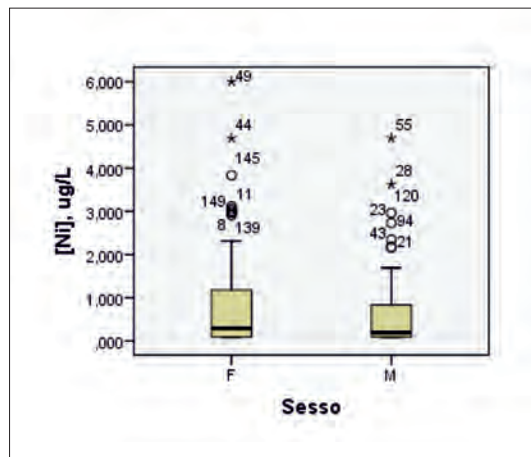


Figura 27 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione stratificato per sesso: F = femminile e M = maschile.

Tabella 21 - Statistiche descrittive delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione campana stratificata per sesso: F = femminile e M = maschile.

		Statistica		
[Ni], µg/L	F	Numero di casi	99	
		Media ± Errore std.	0,791 ± 0,108	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,576
			Limite superiore	1,006
		Mediana	0,290	
		Media Geometrica	0,340	
		Deviazione std.	1,078	
		5° Percentile	0,085	
		95° Percentile	3,050	
		Minimo	0,085	
		Massimo	6,000	
		M	Numero di casi	85
			Media ± Errore std.	0,602 ± 0,094
			Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore
Limite superiore	0,789			
Mediana	0,190			
Media Geometrica	0,264			
Deviazione std.	0,865			
5° Percentile	0,085			
95° Percentile	2,613			
Minimo	0,085			
Massimo	4,690			

Il confronto delle distribuzioni delle concentrazioni di cromo nelle donne e negli uomini, mediante il test non parametrico U di Mann-Whitney e il test della mediana per campioni indipendenti, non ha mostrato differenze significative tra le due categorie in esame ($p=0,184$ e $p=0,554$).

Campione della popolazione campana stratificato per classi di età

Anche per il NiU il campione arruolato è stato stratificato per classi di età.

Le distribuzioni dei livelli di NiU non sono normali nei quartili considerati ($p=0,000$ in ogni sottogruppo), come si evince sia dall'analisi descrittiva riportata in *tabella 22*, sia dagli istogrammi e dai boxplot rappresentativi delle distribuzioni dei valori della variabile in esame (*figure 28 e 29*).

Tabella 22 - Statistiche descrittive delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione campana stratificata per età categorizzata in quartili.

		Statistica		
[Ni], µg/L	≤ 35 anni	Numero di casi	42	
		Media ± Errore std.	0,926 ± 0,178	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,565
			Limite superiore	1,286
		Mediana	0,545	
		Media Geometrica	0,405	
		Deviazione std.	1,156	
		5° Percentile	0,085	
		95° Percentile	4,437	
		Minimo	0,085	
	Massimo	4,690		
	36-46 anni	Numero di casi	42	
		Media ± Errore std.	0,804 ± 0,191	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,419
			Limite superiore	1,190
		Mediana	0,225	
		Media Geometrica	0,308	
		Deviazione std.	1,236	
		5° Percentile	0,085	
		95° Percentile	3,713	
		Minimo	0,085	
	Massimo	6,000		
	47-54 anni	Numero di casi	47	
		Media ± Errore std.	0,398 ± 0,087	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,222
			Limite superiore	0,573
		Mediana	0,085	
		Media Geometrica	0,195	
		Deviazione std.	0,597	
		5° Percentile	0,085	
		95° Percentile	1,926	
		Minimo	0,085	
	Massimo	2,960		
	≥ 55 anni	Numero di casi	39	
		Media ± Errore std.	0,816 ± 0,149	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,514
Limite superiore			1,118	
Mediana		0,500		
Media Geometrica		0,392		
Deviazione std.		0,931		
5° Percentile		0,085		
95° Percentile		3,110		
Minimo		0,085		
Massimo	3,620			

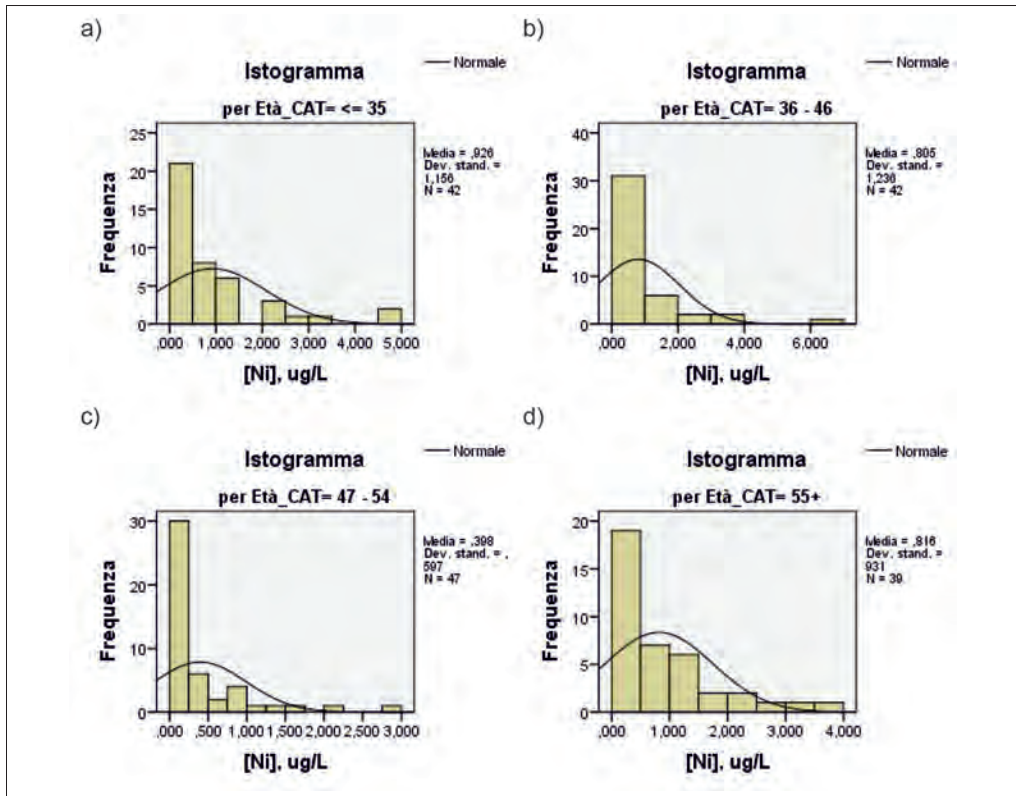


Figura 28 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione stratificato classi di età: a) ≤35 anni, b) 36-46 anni, c) 47-54, d) ≥55.

Il confronto delle distribuzioni delle concentrazioni di nichel urinario tra le classi di età individuate (boxplot in figura 29), mediante il test non parametrico di Kruskal-Wallis per campioni indipendenti e il test delle mediane, fornisce valori di p pari a 0,048 e 0,091, rispettivamente. L'applicazione del test U di Mann-Whitney su ciascuna coppia di classi di età mostra che l'unica differenza statisticamente significativa è relativa al gruppo 47-54 anni, con una mediana di gran lunga inferiore rispetto al gruppo ≤35 anni ($p=0,014$) e al gruppo ≥55 anni ($p=0,013$). Si ricorda che il test di Kruskal-Wallis indica la diversità delle distribuzioni e dei valori mediani confrontati tra loro; il test della mediana paragona, invece, la mediana di ciascuna classe rispetto alla mediana dell'intera distribuzione di NiU (non stratificata in classi di età).

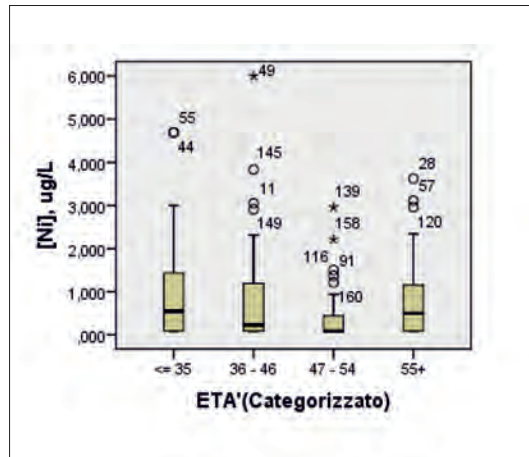


Figura 29 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione stratificato per classi di età.

Campione della popolazione campana stratificato per abitudine al fumo

Il campione arruolato è costituito da 44 fumatori e 128 tra non fumatori ed ex fumatori. Dagli istogrammi, dai boxplot rappresentativi delle distribuzioni dei valori della variabile in esame (figure 30 e 31) e dai risultati dell'analisi descrittiva riportati in tabella 23, appare evidente che la distribuzione dei livelli di NiU non è normale in entrambe le classi considerate (test di Kolmogorov-Smirnov: p=0,000 in entrambi i casi).

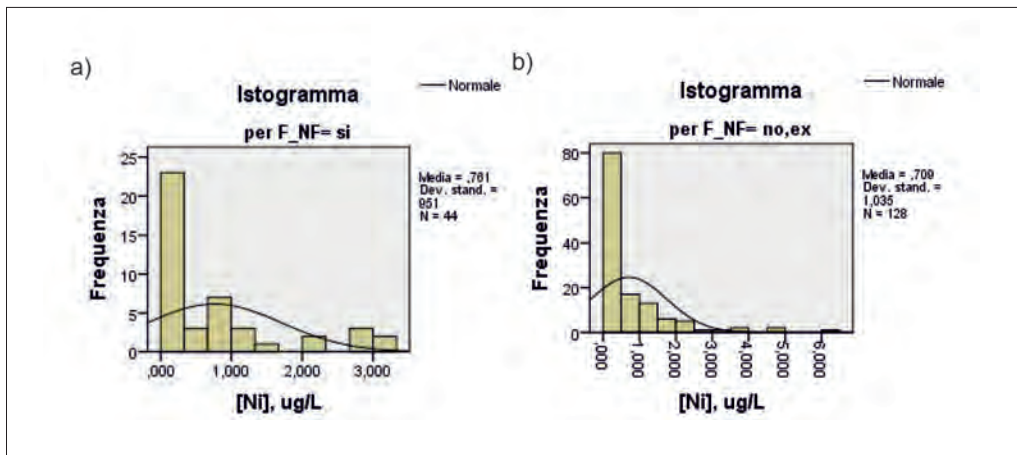


Figura 30 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione stratificato per presenza (pannello a) e assenza (pannello b) di abitudine al fumo.

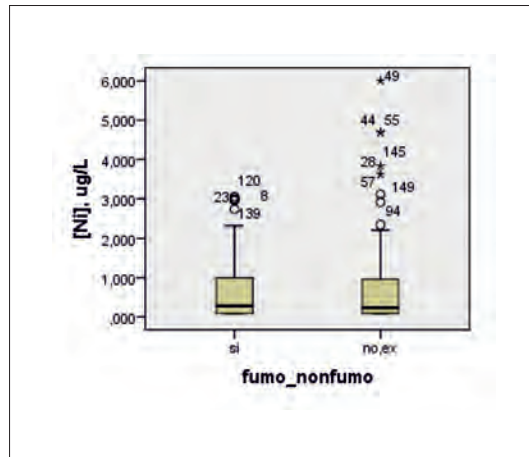


Figura 31 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione stratificato secondo l'abitudine al fumo.

Tabella 23 - Statistiche descrittive delle concentrazioni di CrU nel campione di popolazione campana stratificata secondo l'abitudine al fumo.

		Statistica		
[Ni], µg/L	Si	Numero di casi	44	
		Media ± Errore std.	0,760 ± 0,143	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,472
			Limite superiore	1,050
		Mediana	0,280	
		Media Geometrica	0,334	
		Deviazione std.	0,951	
		5° Percentile	0,085	
		95° Percentile	2,990	
	Minimo	0,085		
	Massimo	3,050		
	No, Ex	Numero di casi	128	
		Media ± Errore std.	0,709 ± 0,092	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,573
			Limite superiore	0,890
		Mediana	0,230	
		Media Geometrica	0,298	
Deviazione std.		1,035		
5° Percentile		0,085		
95° Percentile		3,020		
Minimo	0,085			
Massimo	6,000			

Applicando il test U di Mann-Whitney e il test delle mediane per campioni indipendenti, è emerso che tra le distribuzioni di concentrazioni di nichel urinario nei fumatori e non fumatori non c'è differenza statisticamente significativa ($p=0,667$ e $0,861$, rispettivamente).

Campione della popolazione campana stratificato per provincia di residenza

Le distribuzioni dei livelli di NiU non sono normali nelle province di Napoli, Salerno, Caserta e Avellino ($0,000 < p < 0,002$); i livelli di NiU riscontrati nei 3 campioni relativi alla provincia di Benevento sono pari a: $< \text{LOD}$; $0,540$; $0,910$ $\mu\text{g/L}$.

Si riportano schematicamente i risultati dell'analisi descrittiva (*tabella 24*) e gli istogrammi rappresentativi delle distribuzioni dei valori della variabile in esame nelle province campane, ad eccezione di Benevento (*figura 32*).

Come si evince dal boxplot riportato un *figura 33* le distribuzioni di NiU riscontrate nelle province di SA e AV risultano abbastanza omogenee, mentre i valori di concentrazione relativi a NA e CE sono alquanto dispersi. Il test non parametrico di Mann-Witney applicato ai dati relativi alle province di Salerno ed Avellino ha dimostrato che non c'è differenza significativa tra le concentrazioni di NiU ($p=0,766$), pertanto tali dati sono stati accorpati.

È stato, quindi, applicato il test U di Mann-Whitney su ogni coppia di province preso in esame: NA vs SA-AV, $p=0,143$; NA vs CE, $p=0,043$; SA-AV vs CE, $p=0,003$.

Tali confronti, quindi, hanno evidenziato che la concentrazione di NiU nelle province di Napoli, Salerno e Avellino è significativamente differente (maggiore) rispetto a quella della popolazione residente nella provincia di Caserta.

Tabella 24 - Statistiche descrittive delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione campana stratificata per provincia di residenza (BN è stata omessa).

		Statistica		
[Ni], µg/L	NA	Numero di casi	112	
		Media ± Errore std.	0,744 ± 0,100	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,545
			Limite superiore	0,943
		Mediana	0,255	
		Media Geometrica	0,310	
		Deviazione std.	1,063	
		5° Percentile	0,085	
		95° Percentile	3,039	
		Minimo	0,085	
	Massimo	6,000		
	SA	Numero di casi	15	
		Media ± Errore std.	0,796 ± 0,221	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,323
			Limite superiore	1,270
		Mediana	0,460	
		Media Geometrica	0,403	
		Deviazione std.	0,855	
		5° Percentile	0,085	
		90° Percentile	2,322	
		Minimo	0,085	
	Massimo	2,340		
	CE	Numero di casi	32	
		Media ± Errore std.	0,348 ± 0,103	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,138
			Limite superiore	0,559
		Mediana	0,085	
		Media Geometrica	0,174	
		Deviazione std.	0,584	
		5° Percentile	0,085	
		95° Percentile	1,901	
		Minimo	0,085	
	Massimo	2,960		
AV	Numero di casi	22		
	Media ± Errore std.	0,984 ± 0,235		
	Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,494	
		Limite superiore	1,473	
	Mediana	0,530		
	Media Geometrica	0,482		
	Deviazione std.	1,104		
	5° Percentile	0,085		
	95° Percentile	3,713		
	Minimo	0,085		
Massimo	3,830			

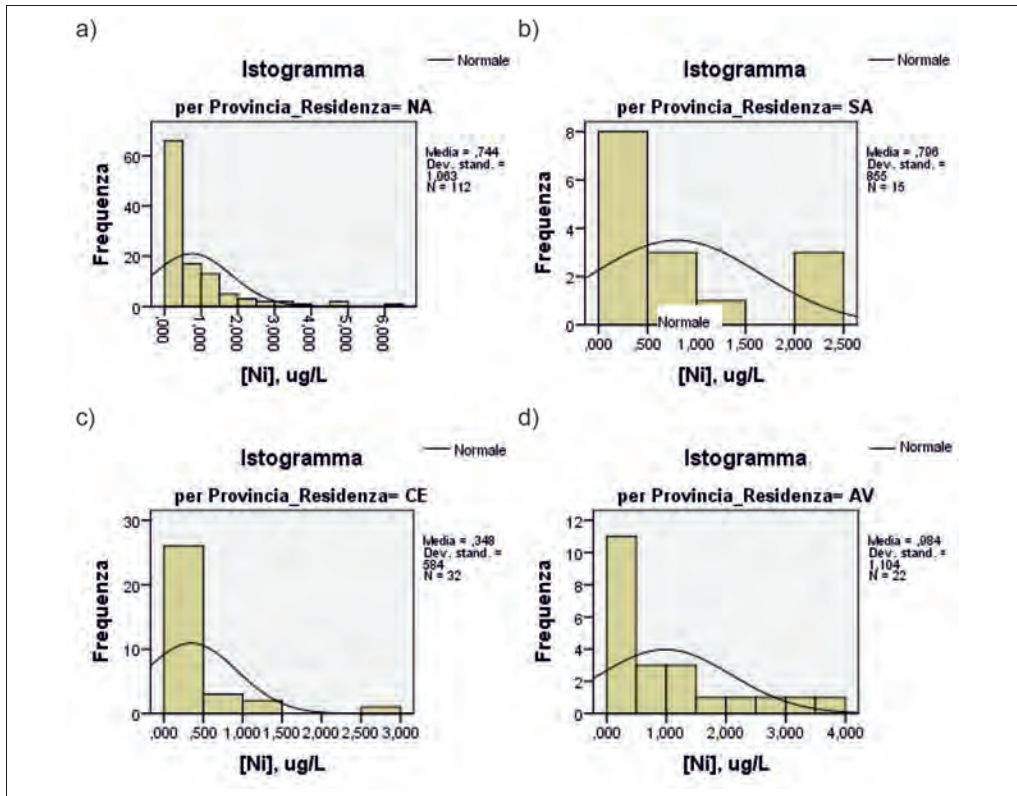


Figura 32 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione stratificato per provincia di residenza (BN è stato omesso).

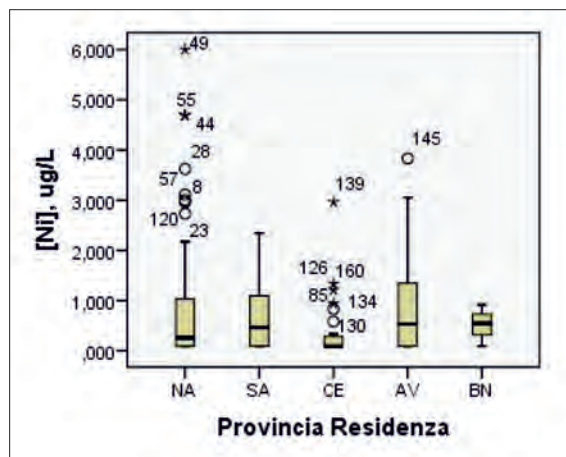


Figura 33 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione stratificato per provincia di residenza.

Campione della popolazione campana stratificato per zona di residenza

Le distribuzioni dei livelli di NiU non sono normali nelle zone di residenza prese in considerazione ($p < 0,050$ in tutti i sottogruppi), come si evince sia dall'analisi descrittiva riportata in *tabella 25*, sia dagli istogrammi e dal boxplot rappresentativi delle distribuzioni dei valori della variabile in esame (*figure 34 e 35*).

Tabella 25 - Statistiche descrittive delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione campana stratificato per zona di residenza.

		Statistica		
[Ni], µg/L	urbana	Numero di casi	89	
		Media ± Errore std.	0,883 ± 0,123	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,639
			Limite superiore	1,128
		Mediana	0,430	
		Media Geometrica	0,374	
		Deviazione std.	1,161	
		5° Percentile	0,085	
		95° Percentile	3,365	
	Minimo	0,085		
	Massimo	6,000		
	semiurbana	Numero di casi	15	
		Media ± Errore std.	0,546 ± 0,159	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,204
			Limite superiore	0,888
		Mediana	0,290	
		Media Geometrica	0,312	
		Deviazione std.	0,617	
		5° Percentile	0,085	
		90° Percentile	1,728	
	Minimo	0,085		
	Massimo	2,340		
	extraurbana	Numero di casi	64	
		Media ± Errore std.	0,559 ± 0,105	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,348
			Limite superiore	0,771
		Mediana	0,128	
Media Geometrica		0,237		
Deviazione std.		0,847		
5° Percentile		0,085		
95° Percentile		2,865		
Minimo	0,085			
Massimo	3,830			

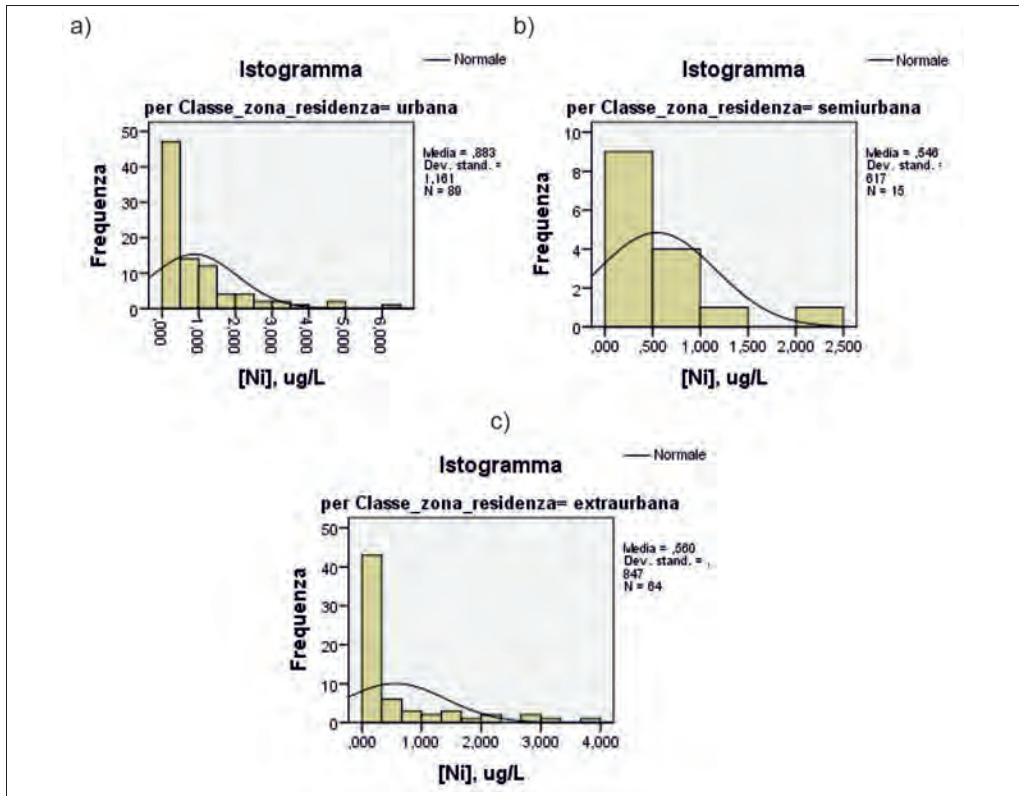


Figura 34 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione stratificato per zona di residenza.

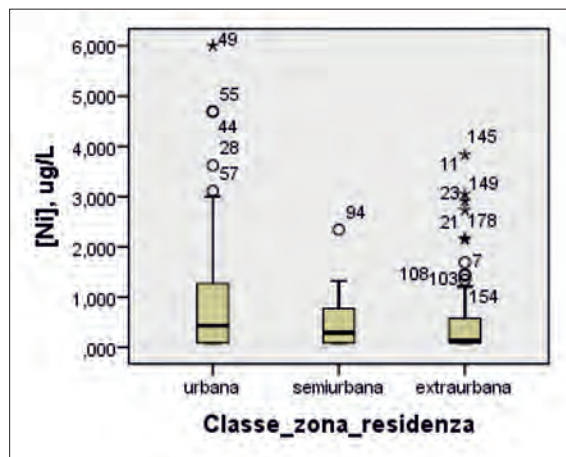


Figura 35 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione stratificato per zona di residenza.

Sono state confrontate, quindi, le distribuzioni delle concentrazioni di nichel tra le aree di residenza, mediante il test non parametrico di Kruskal-Wallis per campioni indipendenti e il test delle mediane, che non hanno mostrato differenze significative tra le categorie in esame ($p=0,149$ e $p=0,202$).

Campione della popolazione campana stratificato per intensità di traffico

Le distribuzioni dei livelli di NiU non sono normali nelle classi di intensità di traffico in cui il campione è stato stratificato in base alle informazioni ottenute ($p=0,000$ in tutti i casi), come si evince sia dall'analisi descrittiva riportata in *tabella 26*, sia dal boxplot e dagli istogrammi rappresentativi delle distribuzioni dei valori della variabile in esame (*figure 36 e 37*).

Il test non parametrico di Kruskal-Wallis per campioni indipendenti non ha mostrato differenze significative tra le categorie in esame ($p=0,594$), così come il test delle mediane ($p=0,766$).

Tabella 26 - Statistiche descrittive delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione campana stratificato per intensità di traffico.

		Statistica		
[Ni], µg/L	Bassa	Numero di casi	24	
		Media ± Errore std.	0,606 ± 0,200	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,191
			Limite superiore	1,021
		Mediana	0,240	
		Media Geometrica	0,261	
		Deviazione std.	0,984	
		5° Percentile	0,085	
		95° Percentile	3,635	
		Minimo	0,085	
	Massimo	3,830		
	Moderata	Numero di casi	65	
		Media ± Errore std.	0,589 ± 0,097	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,395
			Limite superiore	0,783
		Mediana	0,190	
		Media Geometrica	0,264	
		Deviazione std.	0,785	
		5° Percentile	0,085	
		95° Percentile	2,856	
		Minimo	0,085	
	Massimo	2,960		
	Elevata	Numero di casi	50	
		Media ± Errore std.	0,741 ± 0,119	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,501
			Limite superiore	0,980
		Mediana	0,355	
		Media Geometrica	0,353	
		Deviazione std.	0,842	
		5° Percentile	0,085	
		95° Percentile	2,621	
		Minimo	0,085	
	Massimo	3,620		
	Molto elevata	Numero di casi	25	
		Media ± Errore std.	0,931 ± 0,295	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,321
Limite superiore			1,539	
Mediana		0,220		
Media Geometrica		0,326		
Deviazione std.		1,476		
5° Percentile		0,085		
95° Percentile		5,607		
Minimo		0,085		
Massimo	6,000			

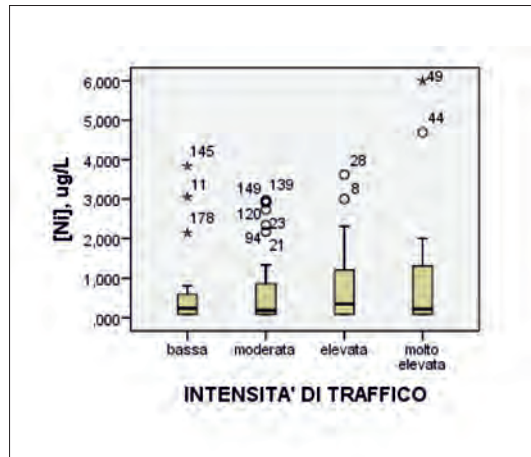


Figura 36 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione stratificato per intensità di traffico.

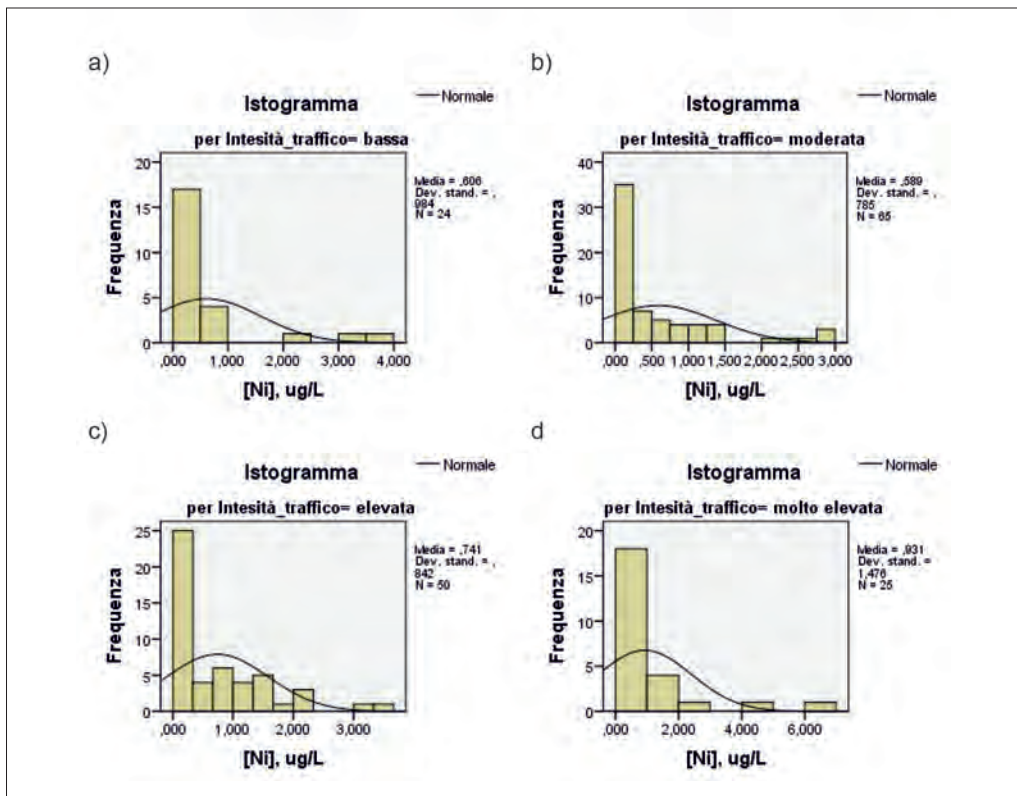


Figura 37 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione stratificato per intensità di traffico.

Campione della popolazione campana stratificato per consumo di molluschi e crostacei
 Le distribuzioni dei livelli di NiU non sono normali (anche dopo trasformazione dei dati in logaritmo naturale) nelle classi ottenute dalla stratificazione del campione per frequenza di consumo di molluschi e crostacei, ovvero mai ($p=0,013$), da raramente a 2 volte al mese ($p=0,000$) e più di una volta a settimana ($p=0,000$). Di seguito si riporta l'analisi descrittiva (tabella 27), il boxplot e gli istogrammi delle distribuzioni dei valori della variabile in esame (figure 38 e 39).

Tabella 27 - Statistiche descrittive delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione campana stratificato per consumo di molluschi e crostacei.

		Statistica		
[Ni], µg/L	mai	Numero di casi	13	
		Media ± Errore std.	0,895 ± 0,357	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,116
			Limite superiore	1,673
		Mediana	0,230	
		Media Geometrica	0,364	
		Deviazione std.	1,289	
		5° Percentile	0,085	
		90° Percentile	3,470	
	Minimo	0,085		
	Massimo	4,690		
	Da raramente a 2 volte/mese	Numero di casi	124	
		Media ± Errore std.	0,665 ± 0,078	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,509
			Limite superiore	0,819
		Mediana	0,220	
		Media Geometrica	0,291	
		Deviazione std.	0,873	
		5° Percentile	0,085	
		95° Percentile	2,948	
	Minimo	0,085		
	Massimo	3,830		
	Più di una volta a settimana	Numero di casi	22	
		Media ± Errore std.	0,568 ± 0,167	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,219
			Limite superiore	0,915
		Mediana	0,210	
Media Geometrica		0,260		
Deviazione std.		0,784		
5° Percentile		0,085		
95° Percentile		2,848		
Minimo	0,085			
Massimo	2,960			

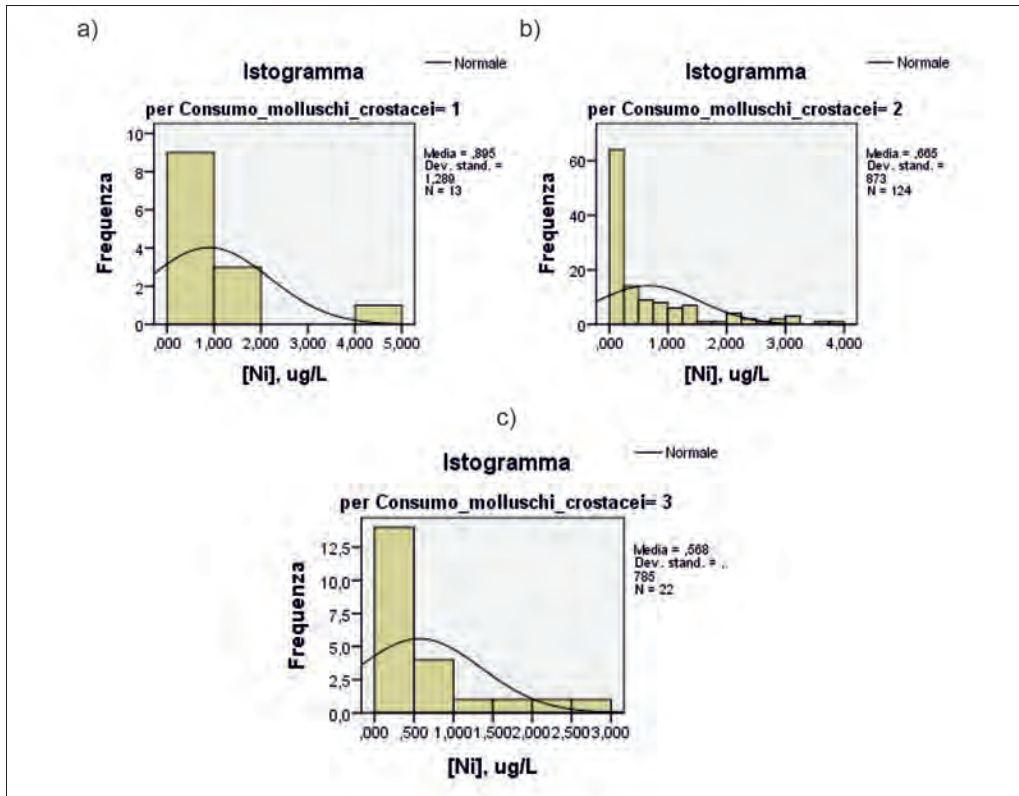


Figura 38 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione stratificato per frequenza di consumo di molluschi e crostacei: a) mai; b) da raramente a 2 volte al mese; c) più di una volta a settimana.

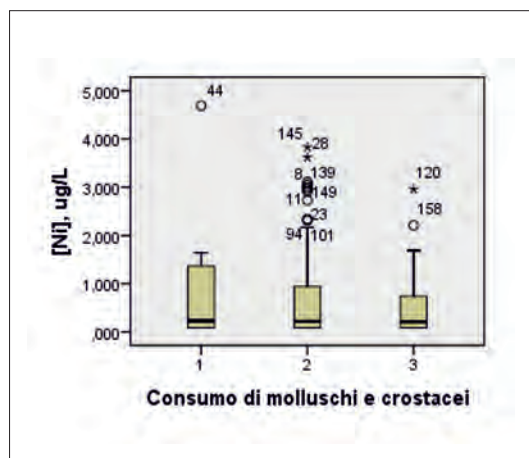


Figura 39 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione stratificato per frequenza consumo di molluschi e crostacei 1= mai; 2= da raramente a 2 volte al mese; 3= più di una volta a settimana.

Sono state confrontate le distribuzioni delle concentrazioni di nichel per ciascuno strato, sia mediante il test non parametrico di Kruskal-Wallis per campioni indipendenti sia mediante il test delle mediane: entrambi i test condotti non hanno mostrato differenze significative tra le categorie in esame ($p=0,787$ e $p=0,950$, rispettivamente).

Campione della popolazione campana stratificato per consumo di alcol

Tutte le distribuzioni di concentrazioni di NiU non sono normali ($p < 0,050$) per ciascuna categoria di consumo di alcol (inteso come vino) presa in esame (*figure 40 e 41*). In *tabella 28* sono riportati i risultati dell'analisi descrittiva delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione campana stratificata per consumo di vino.

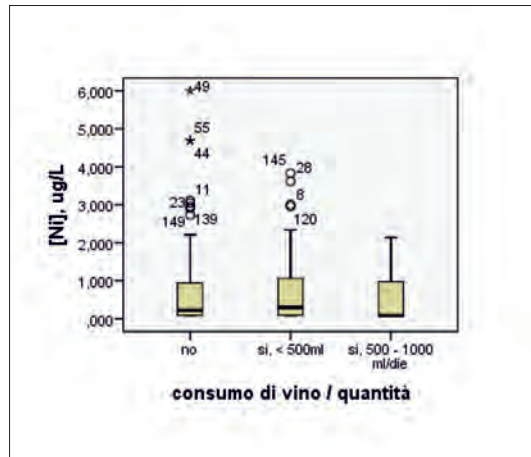


Figura 40 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione stratificato per consumo di vino.

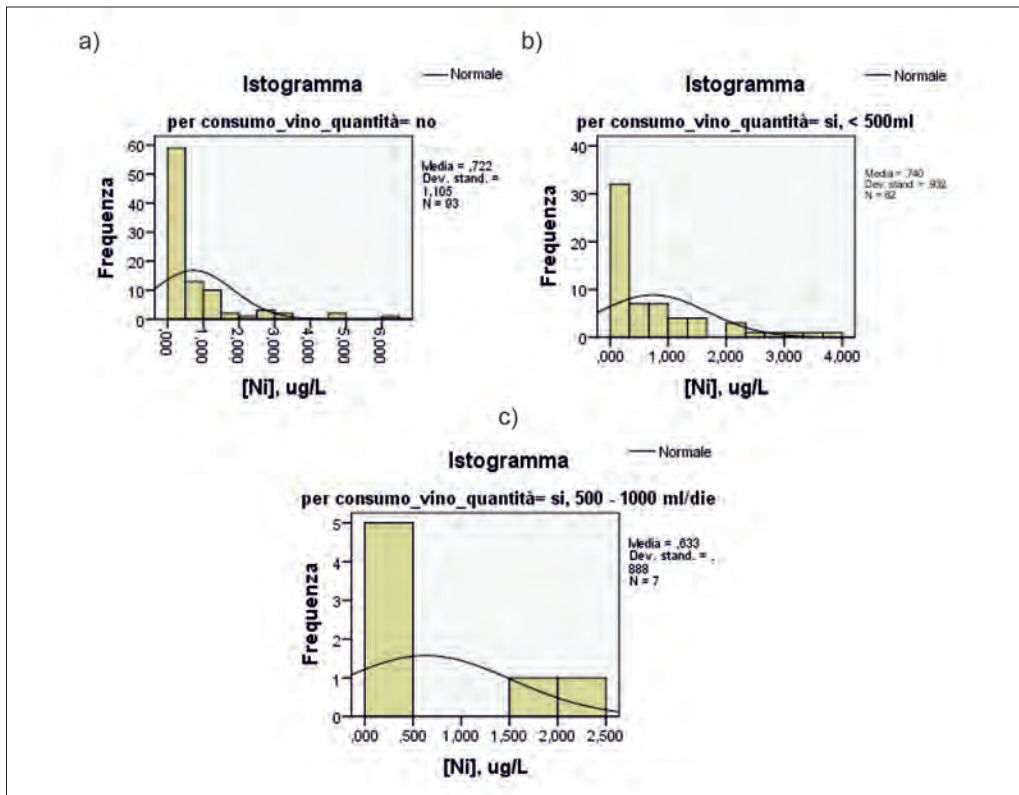


Figura 41 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione stratificato per consumo di vino: a) no; b) <500ml/die; c) 500-1000ml/die.

Essendo esiguo il numero di soggetti che bevono tra 500ml e 1L di vino al giorno (7 casi), sono state confrontate unicamente le distribuzioni delle concentrazioni di nichel urinario tra le classi costituite da soggetti che non bevono e soggetti che bevono <500ml/die, mediante il test U di Mann-Whitney e il test delle mediane, senza riscontrare differenze significative ($p=0,504$ e $p=0,491$).

Tabella 28 - Statistiche descrittive delle concentrazioni di NiU nel campione di popolazione campana stratificata per consumo di vino.

		Statistica		
[Ni], µg/L	NO	Numero di casi	93	
		Media ± Errore std.	0,721 ± 0,114	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,494
			Limite superiore	0,949
		Mediana	0,220	
		Media Geometrica	0,292	
		Deviazione std.	1,105	
		5° Percentile	0,085	
		95° Percentile	3,068	
	Minimo	0,085		
	Massimo	6,000		
	< 500 ml/die	Numero di casi	124	
		Media ± Errore std.	0,740 ± 0,250	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	0,504
			Limite superiore	0,977
		Mediana	0,300	
		Media Geometrica	0,335	
		Deviazione std.	0,932	
		5° Percentile	0,085	
		95° Percentile	2,994	
	Minimo	0,085		
	Massimo	3,830		
	500-1000 ml/die	Numero di casi	7	
		Media ± Errore std.	0,633 ± 0,336	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	-0,188
			Limite superiore	1,453
		Mediana	0,085	
Media Geometrica		0,242		
Deviazione std.		0,887		
5° Percentile		0,085		
75° Percentile		1,690		
Minimo	0,085			
Massimo	2,140			

12.4. Elaborazione statistica dei dati di concentrazione di piombo sierico

Campione della popolazione campana

Dal test di normalità eseguito sul campione di popolazione campana è emerso che le concentrazioni di piombo ematico non seguono una distribuzione normale ($p=0,026$); al contrario, la distribuzione delle concentrazioni di piombo trasformate in logaritmo naturale è risultata normale ($p=0,200$).

Le statistiche descrittive, gli istogrammi e i boxplot relativi sono riportati in *tabella 29* e nelle *figure 42 e 43* (pannelli a = dati non trasformati; pannelli b = dati trasformati in logaritmo naturale).

Tabella 29 - Statistiche descrittive della distribuzione logaritmica del PbS riscontrato nel campione di popolazione campana espresse in logaritmo naturale (3a colonna) e in $\mu\text{g/L}$ (4a colonna).

		Statistica lnPbS	Statistica $\mu\text{g/L}$	
[Pb]	Numero di casi	128		
	Media \pm Errore std.	3,170 \pm 0,046	23,807 \pm 1,047	
	Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	3,079	21,737
		Limite superiore	3,261	26,076
	Mediana	3,200	24,533	
	Media Geometrica	3,123	22,714	
	Deviazione std.	0,521	1,684	
	5° Percentile	2,164	8,706	
	95° Percentile	3,970	52,985	
	Minimo	1,48	4,393	
Massimo	4,11	60,947		

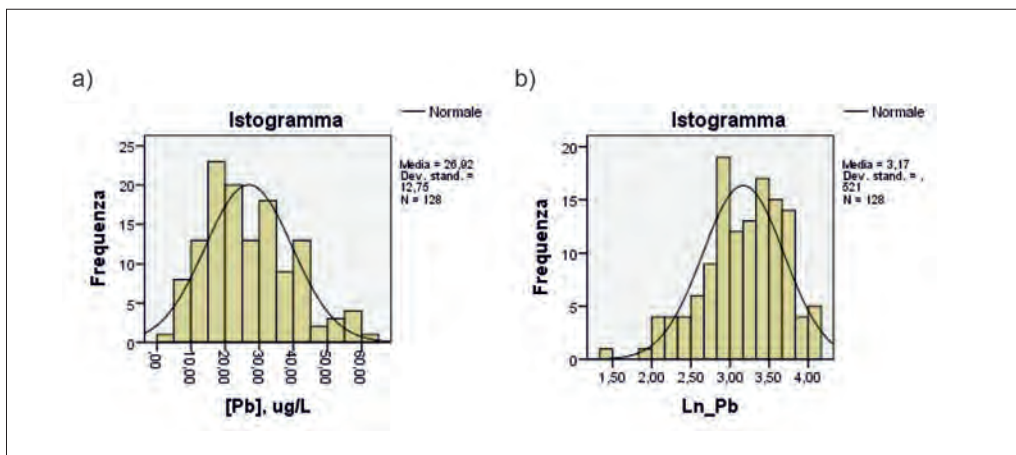


Figura 42 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di PbS nel campione di popolazione campana: a) dati non trasformati; b) dati trasformati in logaritmo naturale.

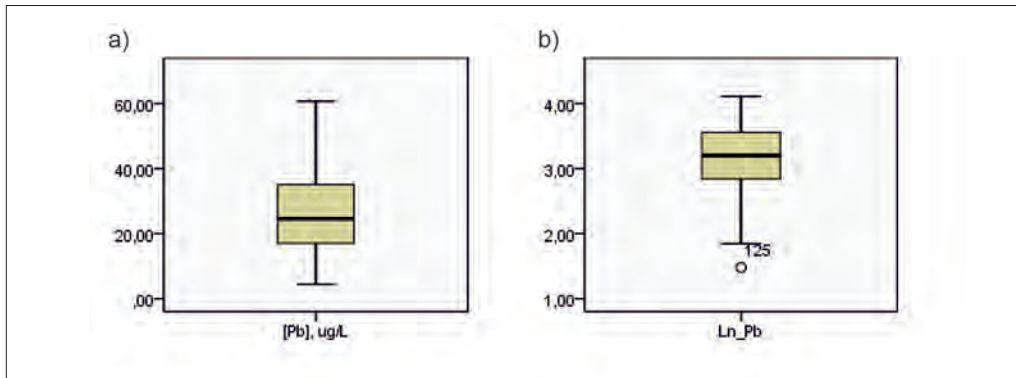


Figura 43 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di PbS nel campione di popolazione campana: a) dati non trasformati; b) dati trasformati in logaritmo naturale.

Campione della popolazione campana stratificato per sesso

Come già descritto in precedenza, il campione arruolato è rappresentato per il 57,8% da donne (74 soggetti) e per il 42,2% da uomini (54 soggetti).

La distribuzione dei livelli di piombo ematico (figura 44) non segue un andamento normale nel caso delle donne ($p=0,009$); al contrario (figura 45), i dati trasformati in logaritmo naturale danno luogo a distribuzioni normali per entrambi i sessi ($p=0,200$ per le donne e $p=0,058$ per gli uomini).

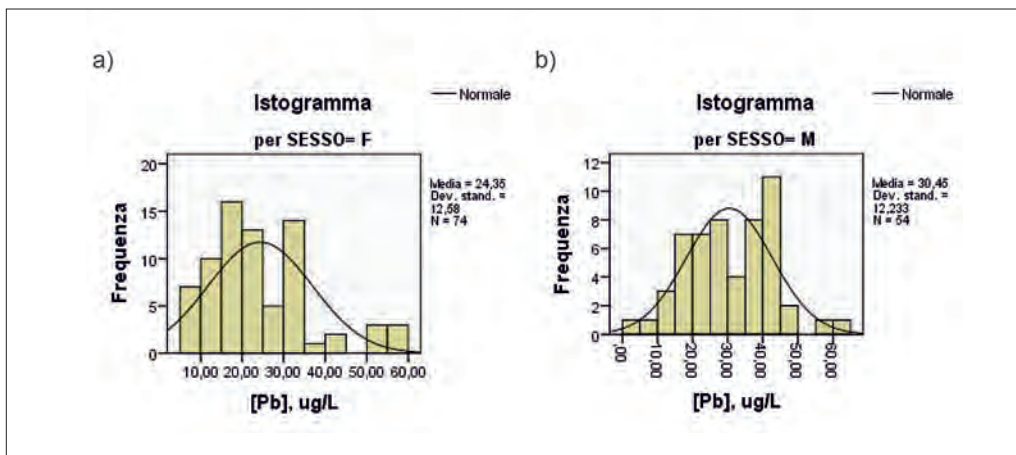


Figura 44 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di PbS nel campione di popolazione stratificato per sesso: a) femminile; b) maschile.

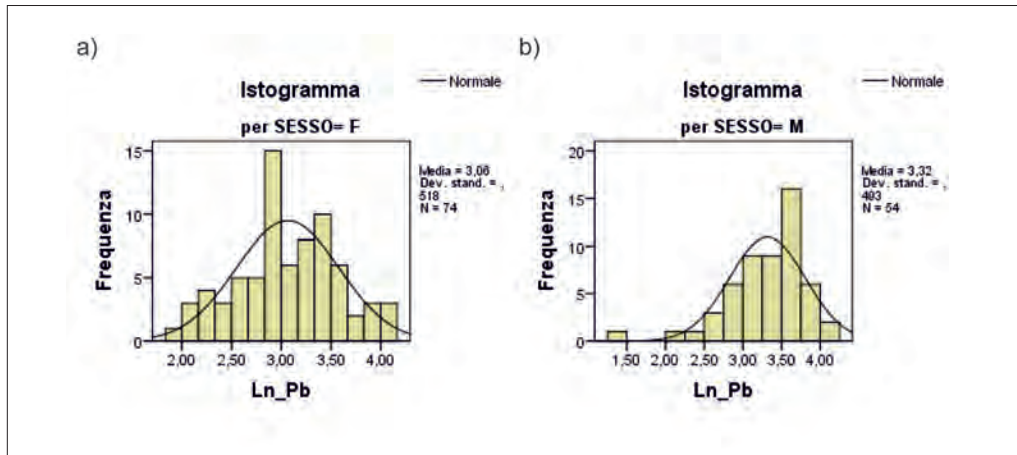


Figura 45 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di PbS trasformate in logaritmo naturale nel campione di popolazione stratificato per sesso: a) femminile; b) maschile.

In *figura 46* sono riportati i boxplot delle distribuzioni delle concentrazioni di PbS nel campione di popolazione stratificato per sesso tal quali e trasformate in logaritmo naturale e in *tabella 30* l'analisi descrittiva delle concentrazioni di PbS trasformate in logaritmo naturale ed espresse in $\mu\text{g/L}$.

L'applicazione del t-test alle distribuzioni logaritmiche ha mostrato differenze significative tra le concentrazioni di PbS misurate nelle due categorie in esame ($p=0,006$).

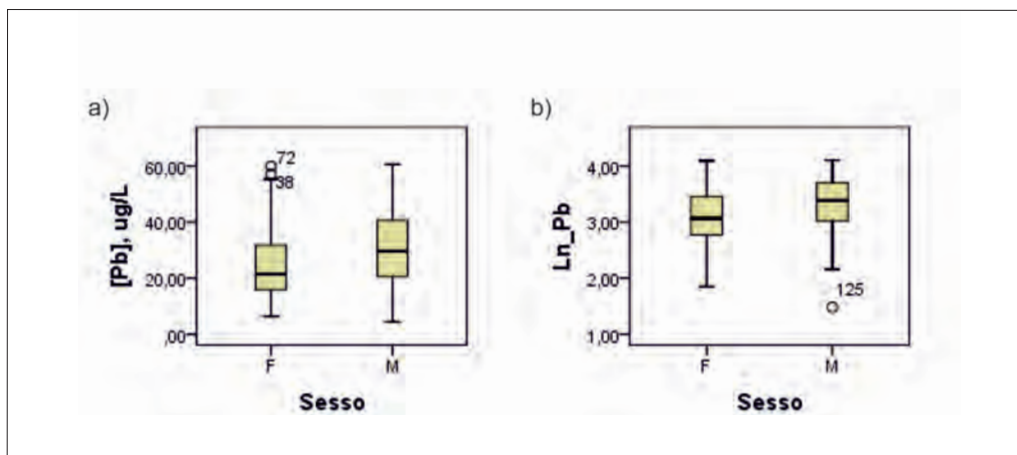


Figura 46 - Boxplot delle distribuzioni delle concentrazioni di PbS nel campione di popolazione stratificato per sesso (F = femminile e M = maschile).

Tabella 30 - Statistiche descrittive delle concentrazioni di PbS riscontrato nel campione di popolazione campana stratificata per sesso, espresse in logaritmo naturale (4a colonna) e in µg/L (5a colonna).

		Statistica lnPbS	Statistica µg/L		
[Pb]	F	Numero di casi	74		
		Media ± Errore std.	3,064 ± 0,060	21,413 ± 1,062	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	2,944	18,992
			Limite superiore	3,184	24,143
		Mediana	3,068	21,499	
		Media Geometrica	3,019	20,471	
		Deviazione std.	0,518	1,679	
	5° Percentile	2,141	8,508		
	95° Percentile	4,000	54,598		
	Minimo	1,85	6,360		
	Massimo	4,09	59,740		
	M	Numero di casi	54		
		Media ± Errore std.	3,316 ± 0,067	27,550 ± 1,069	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	3,182	24,095
Limite superiore			3,451	31,532	
Mediana		3,389	29,636		
Media Geometrica		3,273	26,390		
Deviazione std.		0,493	1,637		
5° Percentile	2,360	10,591			
95° Percentile	3,901	49,452			
Minimo	1,48	4,393			
Massimo	4,11	60,947			

Campione della popolazione campana stratificato per classi di età

Il campione arruolato è stato stratificato per classi di età, come precedentemente descritto.

La distribuzione dei livelli di PbS è normale nei quartili considerati ($p=0,012$ per ≤ 35 anni e $p=0,200$ per 36 - 46 anni, 47 - 54 anni e ≥ 55 anni), come si evince sia dall'analisi descrittiva riportata in *tabella 31*, sia dal boxplot e dagli istogrammi rappresentativi delle distribuzioni dei valori della variabile in esame (*figure 47 e 48*).

Tabella 31 - Statistiche descrittive delle concentrazioni di PbS nel campione di popolazione campana stratificata per età categorizzata in quartili.

		Statistica		
[Pb], µg/L	≤ 35 anni	Numero di casi	23	
		Media ± Errore std.	19,912 ± 1,679	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	16,430
			Limite superiore	23,395
		Mediana	17,800	
		Media Geometrica	18,542	
		Deviazione std.	8,053	
		5° Percentile	8,244	
		95° Percentile	42,704	
		Minimo	8,11	
	Massimo	44,88		
	36-46 anni	Numero di casi	32	
		Media ± Errore std.	20,211 ± 1,600	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	16,948
			Limite superiore	23,473
		Mediana	19,510	
		Media Geometrica	18,168	
		Deviazione std.	9,049	
		5° Percentile	7,842	
		95° Percentile	36,167	
		Minimo	6,34	
	Massimo	42,12		
	47-54 anni	Numero di casi	31	
		Media ± Errore std.	27,111 ± 2,346	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	22,319
			Limite superiore	31,903
		Mediana	26,000	
		Media Geometrica	23,766	
		Deviazione std.	13,065	
		5° Percentile	6,556	
		95° Percentile	55,224	
		Minimo	4,39	
	Massimo	57,06		
	≥ 55 anni	Numero di casi	30	
		Media ± Errore std.	36,882 ± 2,288	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	32,202
Limite superiore			41,561	
Mediana		35,745		
Media Geometrica		34,642		
Deviazione std.		12,532		
5° Percentile		15,400		
95° Percentile		60,269		
Minimo		11,22		
Massimo	60,67			

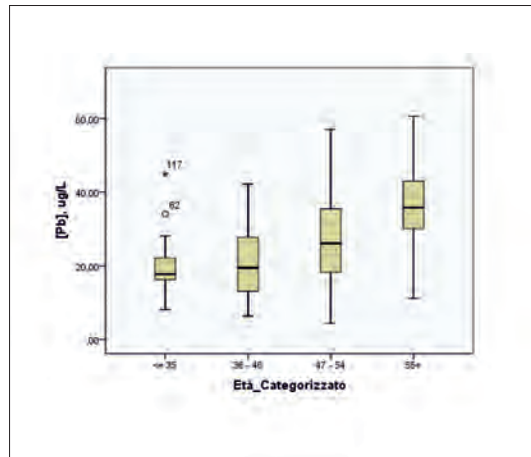


Figura 47 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di PbS nel campione di popolazione stratificato per classi di età.

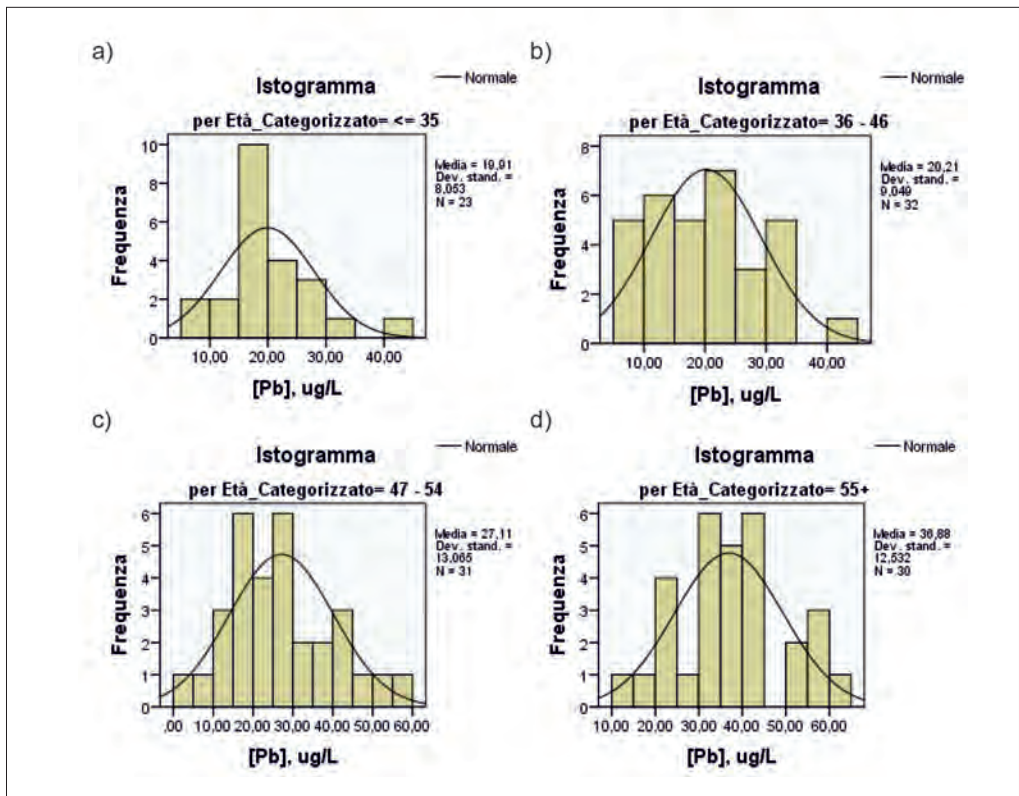


Figura 48 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di PbS nel campione di popolazione stratificato per classi di età: ≤35 anni, pannello a; 36-46 anni, pannello b; 47-54, pannello c; ≥55 pannello d.

Dal boxplot in *figura 47* e dai valori in *tabella 31* sembrerebbe che i valori medi di PbS seguano un andamento crescente al crescere dell'età: infatti, il test parametrico ANOVA univariata è risultato significativo ($p=0,000$), tuttavia, il test post hoc a confronti multipli di Bonferroni ha evidenziato che l'unica differenza statisticamente significativa sussiste tra la concentrazione di piombo ematico relativa alla classe ≥ 55 anni e le altre ($p=0,000$ per ≥ 55 anni vs. ≤ 35 anni e vs. 36-46 anni e $p=0,005$ per ≥ 55 anni vs. 47-54 anni).

Campione della popolazione campana stratificato per abitudine al fumo

Stratificando il campione di popolazione in base all'abitudine al fumo come descritto in precedenza, è stata valutata la normalità delle distribuzioni delle concentrazioni per ciascuna categoria: la distribuzione è normale per ex fumatori e non fumatori ($p=0,741$ e $0,059$, rispettivamente), e non lo è per i fumatori ($p=0,007$). Le distribuzioni delle concentrazioni di piombo trasformate in logaritmo naturale, invece, sono normali per tutte le classi considerate ($p=0,268$ per i fumatori, $p=0,200$ per i non fumatori e $p=0,088$ per gli ex fumatori), come mostrato nel boxplot e negli istogrammi (*figure 49 e 50*) e dai risultati dell'analisi descrittiva (*tabella 32*).

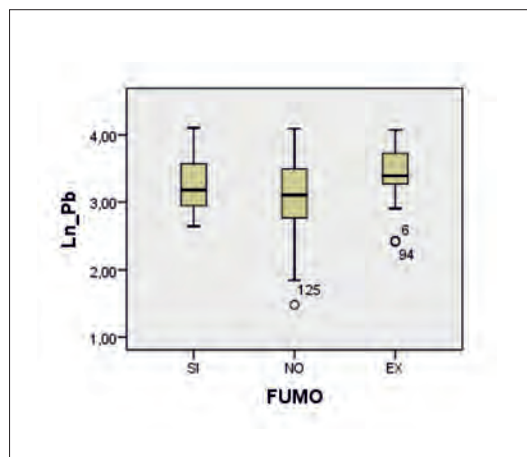


Figura 49 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di PbS trasformate in logaritmo naturale nel campione di popolazione stratificato secondo l'abitudine al fumo.

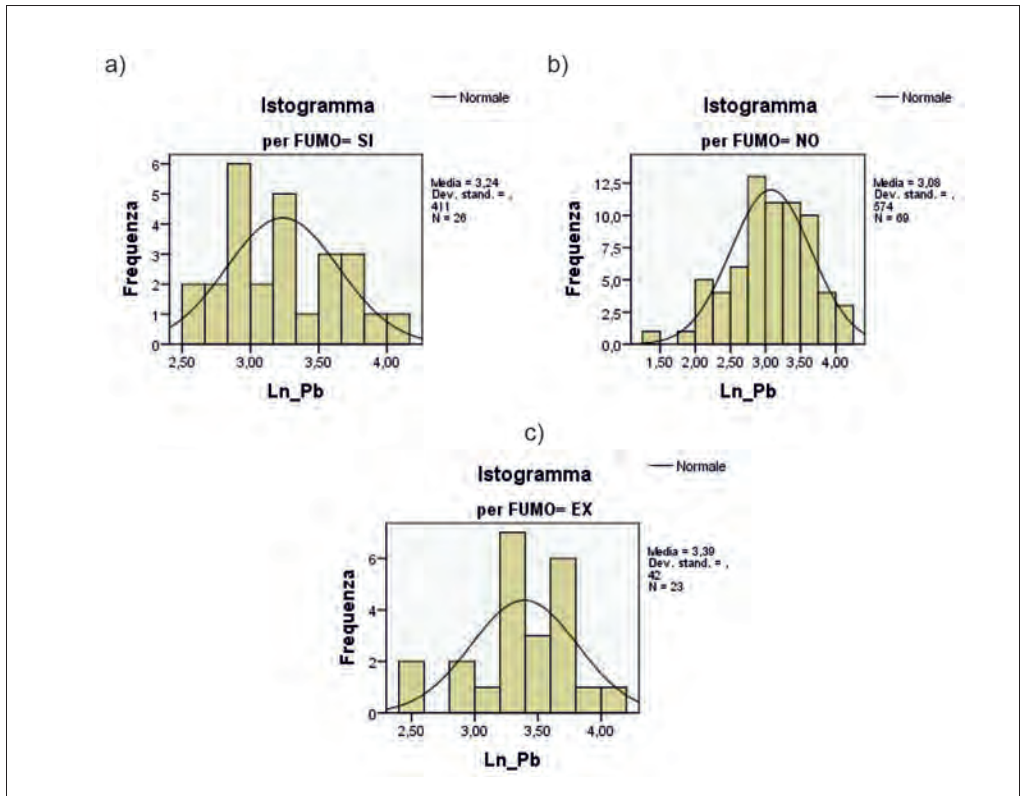


Figura 50 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di PbS trasformate in logaritmo naturale nel campione di popolazione stratificato secondo l'abitudine al fumo: a) fumatori, b) non fumatori e c) ex fumatori.

Tabella 32 - Statistiche descrittive delle concentrazioni di PbS riscontrato nel campione di popolazione campana stratificata secondo l'abitudine al fumo espresse in logaritmo naturale (4^a colonna) e in µg/L (5^a colonna).

		Statistica lnPbS	Statistica µg/L		
[Pb]	SI	Numero di casi	26		
		Media ± Errore std.	3,236 ± 0,081	25,432 ± 1,084	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	3,070	21,542
			Limite superiore	3,402	30,024
		Mediana	3,181	24,071	
		Media Geometrica	3,211	24,804	
		Deviazione std.	0,411	1,508	
		5° Percentile	2,645	14,083	
		95° Percentile	4,050	57,397	
		Minimo	2,64	14,013	
		Massimo	4,11	60,947	
		NO	Numero di casi	69	
			Media ± Errore std.	3,079 ± 0,069	21,737 ± 1,071
	Intervallo di confidenza per la media al 95%		Limite inferiore	2,901	18,192
			Limite superiore	3,217	24,953
	Mediana		3,107	22,354	
	Media Geometrica		3,020	20,491	
	Deviazione std.		0,574	1,775	
	5° Percentile		2,086	8,053	
	95° Percentile		4,001	54,653	
	Minimo		1,48	4,393	
	Massimo	4,09	59,740		
	EX	Numero di casi	23		
		Media ± Errore std.	3,392 ± 0,088	29,725 ± 1,092	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	3,210	24,779
			Limite superiore	3,573	35,623
Mediana		3,393	29,755		
Media Geometrica		3,365	28,933		
Deviazione std.		0,420	1,522		
5° Percentile		2,420	11,246		
95° Percentile		4,044	57,054		
Minimo		2,42	11,246		
Massimo	4,02	55,701			

Contrariamente a quanto verificato per le distribuzioni delle concentrazioni di CrU e NiU, per il PbS è stata dimostrata una differenza significativa tra le distribuzioni delle concentrazioni nelle categorie fumatori, non fumatori ed ex fumatori (test parametrico ANOVA univariata, $p=0,036$). Dal test post hoc a confronti multipli applicato (test di Bonferroni) è emerso che le concentrazioni di PbS (trasformate in logaritmo naturale) degli ex fumatori sono statisticamente diverse da quelle dei

non fumatori ($p=0,039$), ma non da quelle dei fumatori ($p=0,876$) e che tra fumatori e non fumatori non c'è differenza significativa di livelli di PbS ($p=0,565$).

Campione della popolazione campana stratificato per provincia di residenza

Il campione regionale arruolato è stato stratificato per provincia di residenza. Come già descritto precedentemente, solo nel caso della provincia di Napoli sono stati arruolati più di 40 soggetti (89), mentre il numero di individui relativo alle province di CE e AV è pari a 22 e 12, rispettivamente, e si riduce a 3 e 2 per SA e BN. La distribuzione dei livelli di PbS è normale per le province di NA, CE e AV ($p=0,200$, $p=0,076$ e $p=0,413$, rispettivamente); nelle *figure 51 e 52* sono mostrati i boxplot e istogrammi rappresentativi delle distribuzioni dei valori della variabile in esame, mentre in *tabella 33* sono riportate le statistiche descrittive delle relative distribuzioni e le concentrazioni di PbS dei soggetti residenti nelle diverse province campane.

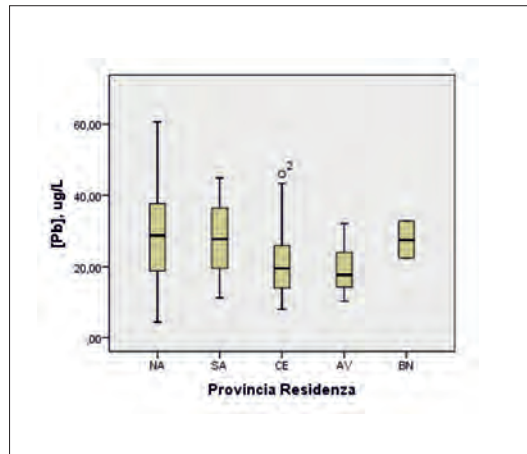


Figura 51 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di PbS nel campione di popolazione stratificato per provincia di residenza.

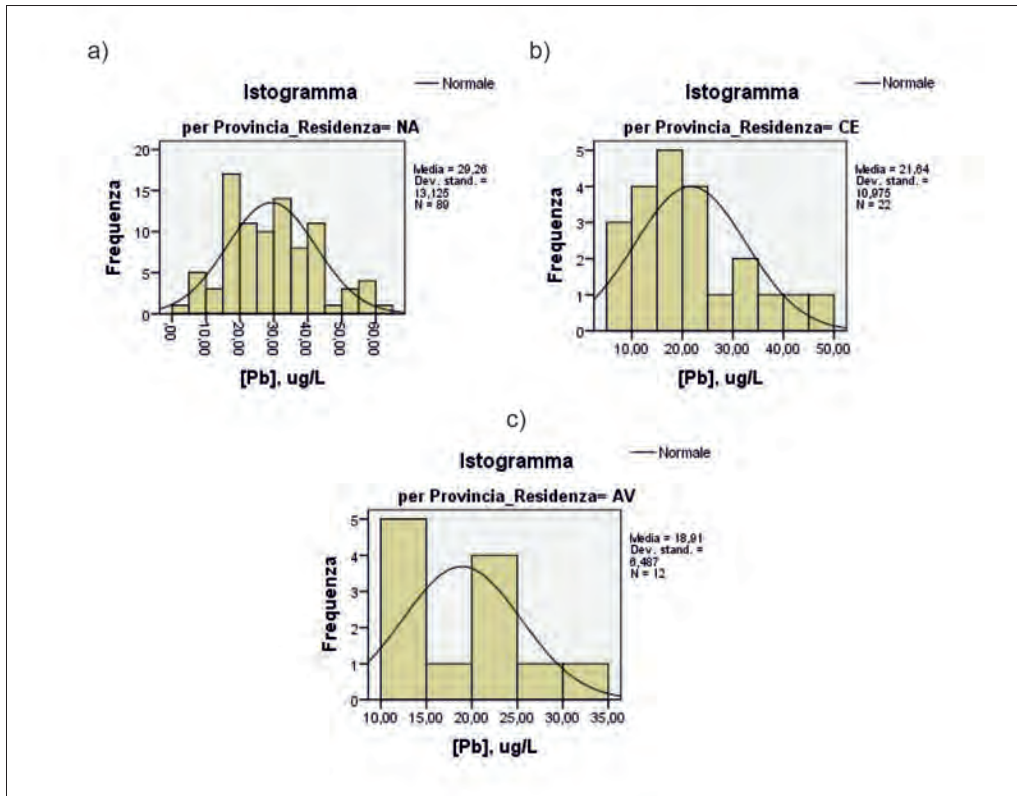


Figura 52 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di PbS nel campione di popolazione stratificato per provincia di residenza; a) Napoli, b) Caserta, c) Avellino; per SA e BN sono stati omessi.

Tabella 33 - Statistiche descrittive delle concentrazioni di PbS nel campione di popolazione campana stratificata per provincia di residenza.

		Statistica		
[Pb], µg/L	NA	Numero di casi	89	
		Media ± Errore std.	29,258 ± 1,391	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	26,493
			Limite superiore	32,023
		Mediana	28,820	
		Media Geometrica	26,044	
		Deviazione std.	13,125	
		5° Percentile	8,715	
		95° Percentile	56,195	
		Minimo	4,39	
	Massimo	60,67		
	CE	Numero di casi	22	
		Media ± Errore std.	21,635 ± 2,340	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	16,769
			Limite superiore	26,501
		Mediana	19,510	
		Media Geometrica	19,110	
		Deviazione std.	10,975	
		5° Percentile	8,017	
		95° Percentile	45,557	
		Minimo	8,00	
	Massimo	45,95		
	AV	Numero di casi	12	
		Media ± Errore std.	18,909 ± 1,873	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	14,788
			Limite superiore	23,031
		Mediana	17,700	
		Media Geometrica	17,922	
		Deviazione std.	6,487	
		5° Percentile	10,240	
		90° Percentile	29,900	
		Minimo	10,24	
	Massimo	32,00		
SA	Concentrazione di PbS soggetto 1	11,22		
	Concentrazione di PbS soggetto 2	27,80		
	Concentrazione di PbS soggetto 3	44,88		
BN	Concentrazione di PbS soggetto 1	22,44		
	Concentrazione di PbS soggetto 2	32,67		

Sono state confrontate, quindi, le distribuzioni delle concentrazioni di piombo ematico tra le province di NA, CE e AV mediante il test parametrico ANOVA univariata, che ha mostrato differenze significative tra le categorie in esame ($p=0,003$), come si evince anche dal grafico degli errori sotto riportato (*figura 53*) e dall'esito del test di Bonferroni, che ha mostrato differenze significative tra NA e CE ($p=0,031$) e NA e AV ($p=0,021$), mentre non vi è differenza tra AV e CE ($p=1,000$).

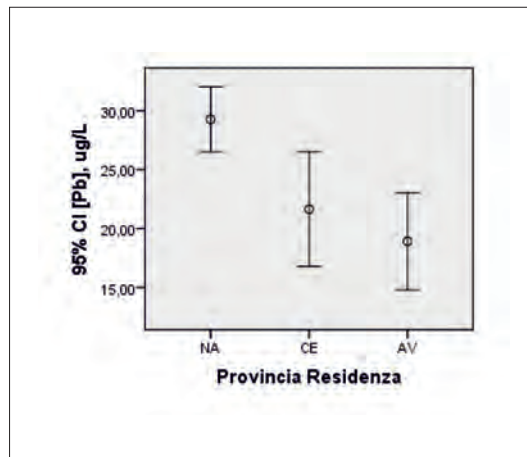


Figura 53 -Grafico degli errori delle concentrazioni medie di PbS nel campione di popolazione stratificato per provincia di residenza.

Campione della popolazione campana stratificato per zona di residenza

Il campione arruolato è stato stratificato per zona di residenza, dividendo le zone in urbana, semiurbana ed extraurbana, come illustrato in precedenza.

Le distribuzioni dei livelli di PbS è normale nelle tre classi di residenza considerate ($p=0,196$ per zona urbana; $p=0,083$ per semiurbana; $p=0,200$ per extraurbana), come si evince sia dall'analisi descrittiva riportata in *tabella 34*, sia dal boxplot e dagli istogrammi rappresentativi delle distribuzioni dei valori della variabile in esame (*figure 54 e 55*).

Tabella 34 - Statistiche descrittive delle concentrazioni di PbS nel campione di popolazione campana stratificata per zona di residenza.

		Statistica		
[Pb], µg/L	urbana	Numero di casi	65	
		Media ± Errore std.	28,690 ± 1,663	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	25,3667
			Limite superiore	32,0124
		Mediana	26,6700	
		Media Geometrica	25,481	
		Deviazione std.	13,410	
		5° Percentile	9,074	
		95° Percentile	58,292	
		Minimo	4,39	
	Massimo	60,67		
	semiurbana	Numero di casi	10	
		Media ± Errore std.	17,242 ± 3,228	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	9,939
			Limite superiore	24,545
		Mediana	14,900	
		Media Geometrica	14,947	
		Deviazione std.	10,209	
		5° Percentile	6,340	
		90° Percentile	37,256	
		Minimo	6,34	
	Massimo	37,84		
	extraurbana	Numero di casi	41	
		Media ± Errore std.	24,524 ± 1,765	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	20,958
			Limite superiore	28,090
		Mediana	23,410	
Media Geometrica		22,012		
Deviazione std.		11,298		
5° Percentile		8,650		
95° Percentile		49,864		
Minimo		8,00		
Massimo	54,00			

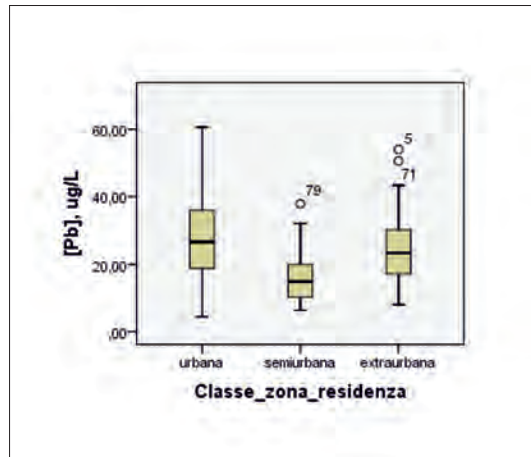


Figura 54 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di PbS nel campione di popolazione stratificato per zona di residenza.

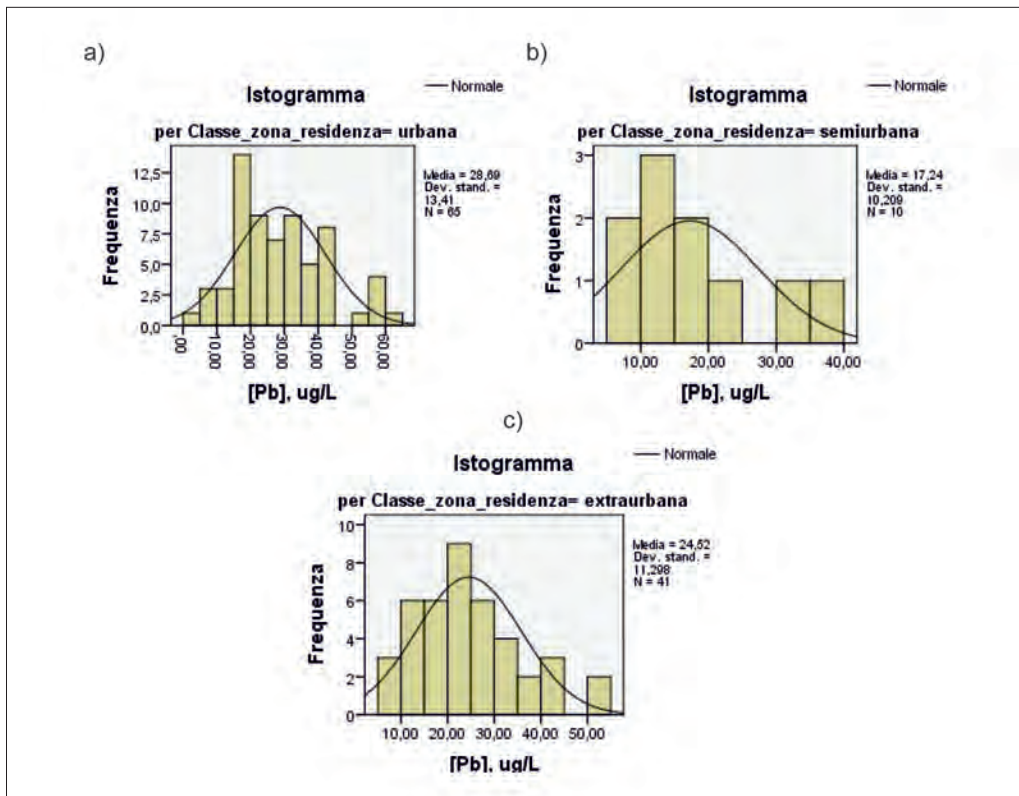


Figura 55 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di PbS nel campione di popolazione stratificato per zona di residenza: a) zona urbana; b) zona semiurbana; c) zona extraurbana.

Sono state confrontate, quindi, le distribuzioni delle concentrazioni di piombo ematico ritrovate nei soggetti appartenenti alle diverse zone di residenza mediante il test parametrico ANOVA univariata, che ha mostrato differenze significative tra le categorie in esame ($p=0,017$), come si evince anche dal grafico degli errori sotto riportato (figura 56).

Al fine di individuare quali valori medi differissero, è stato eseguito il test Bonferroni, riscontrando una differenza significativa tra le medie delle concentrazioni di PbS delle aree semiurbana e urbana ($p=0,024$); al contrario non vi è differenza significativa né tra le medie delle aree extraurbana e urbana ($p=0,290$) né tra quelle extraurbana e semiurbana ($p=0,301$).

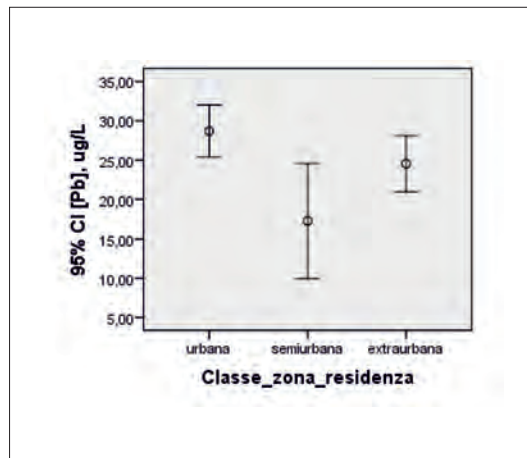


Figura 56 - Grafico degli errori delle concentrazioni medie di PbS nel campione di popolazione stratificato per zona di residenza.

Campione della popolazione campana stratificato per intensità di traffico

La distribuzione dei livelli di PbS è normale in tre delle quattro partizioni considerate ($p=0,503$ per intensità di traffico bassa; $p=0,200$ per moderata ed elevata); fa eccezione la distribuzione non normale della categoria intensità di traffico molto elevata ($p=0,024$). Eseguendo la trasformazione dei dati in logaritmo naturale, invece, risultano normali tutte le distribuzioni in esame: per intensità di traffico bassa $p=0,822$, moderata ed elevata $p=0,200$ e molto elevata $p=0,706$. Quanto detto è evidente anche dal boxplot e dagli istogrammi rappresentativi delle distribuzioni dei valori della variabile in esame trasformati in logaritmi naturali (figure 57 e 58); in tabella 35 sono riportati i risultati dell'analisi descrittiva eseguita sulla variabile [PbS] espressa sia in logaritmo naturale sia in $\mu\text{g/L}$.

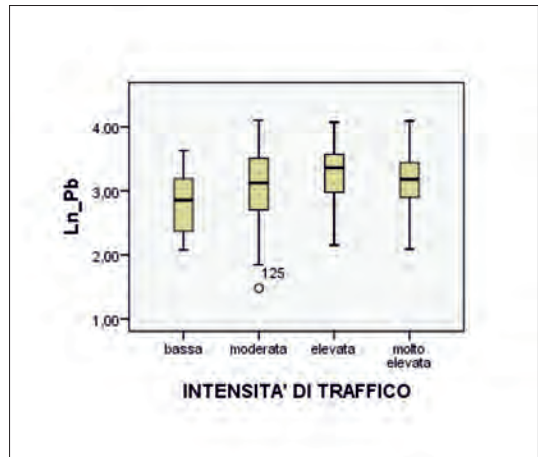


Figura 57 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di PbS trasformate in logaritmo naturale nel campione di popolazione stratificato per intensità di traffico.

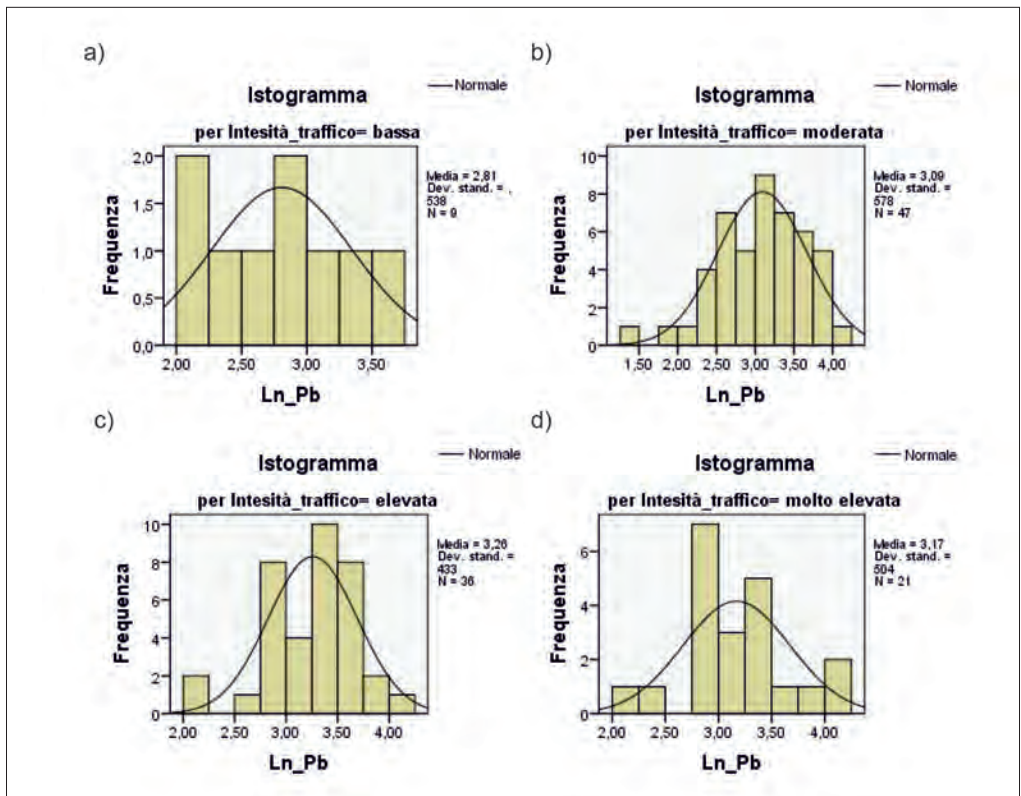


Figura 58 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di PbS nel campione di popolazione stratificato per intensità di traffico: a) bassa; b) moderata; c) elevata; d) molto elevata.

Tabella 35 - Statistiche descrittive delle distribuzioni delle concentrazioni di PbS riscontrato nel campione di popolazione campana stratificata per intensità di traffico, espresse in logaritmo naturale (4^a colonna) e in µg/L (5^a colonna).

		Statistica lnPbS	Statistica µg/L		
[Pb]	Bassa	Numero di casi	9		
		Media ± Errore std.	2,808 ± 0,179	16,577 ± 1,196	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	2,395	10,968
			Limite superiore	3,222	25,078
		Mediana	2,852	17,322	
		Media Geometrica	2,761	15,816	
		Deviazione std.	0,538	1,713	
		5° Percentile	2,080	8,004	
		75° Percentile	3,268	26,259	
		Minimo	2,08	8,004	
	Massimo	3,63	37,713		
	moderata	Numero di casi	47		
		Media ± Errore std.	3,093 ± 0,084	22,043 ± 1,088	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	2,924	18,616
			Limite superiore	3,263	26,128
		Mediana	3,121	22,669	
		Media Geometrica	3,034	20,780	
		Deviazione std.	0,578	1,782	
		5° Percentile	1,977	7,221	
		95° Percentile	3,972	53,091	
		Minimo	1,48	4,39	
	Massimo	4,11	60,947		
	elevata	Numero di casi	36		
		Media ± Errore std.	3,258 ± ,072	25,997 ± 1,075	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	3,111	22,443
			Limite superiore	3,404	30,084
		Mediana	3,359	28,760	
		Media Geometrica	3,227	25,204	
		Deviazione std.	,433	1,542	
		5° Percentile	2,170	8,758	
		95° Percentile	3,845	46,759	
		Minimo	2,16	8,671	
	Massimo	4,07	58,557		
molto elevata	Numero di casi	21			
	Media ± Errore std.	3,169 ± 0,110	23,784 ± 1,116		
	Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	2,939	18,897	
		Limite superiore	3,398	29,904	
	Mediana	3,178	23,999		
	Media Geometrica	3,129	22,851		
	Deviazione std.	0,504	1,655		
	5° Percentile	2,112	8,265		
	95° Percentile	4,088	59,620		
	Minimo	2,09	8,085		
Massimo	4,09	59,740			

Il test parametrico ANOVA univariata non ha mostrato differenze significative tra le categorie in esame ($p=0,119$) come si evince anche dal grafico degli errori sotto riportato (*figura 59*), in cui si notano aree di sovrapposizione degli intervalli di confidenza delle varie distribuzioni.

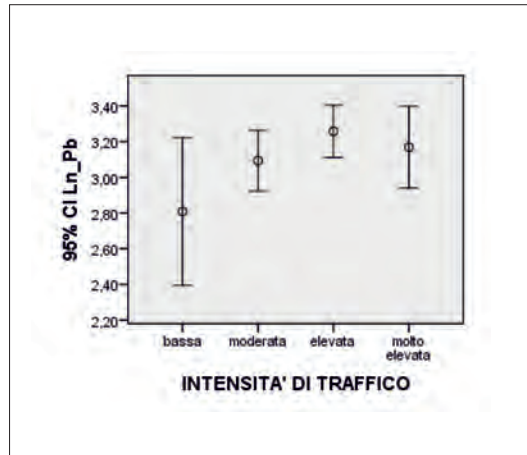


Figura 59 - Grafico degli errori delle concentrazioni medie di PbS, trasformate in logaritmo naturale, nel campione di popolazione stratificato per intensità di traffico.

Campione della popolazione campana stratificato per consumo di molluschi e crostacei
Il campione di popolazione campana è stato stratificato per frequenza di consumo di molluschi e crostacei: classe 1 = mai; classe 2 = da raramente a 2 volte al mese; classe 3 = più di una volta a settimana. La distribuzione dei livelli di PbS è normale nelle classi 1 e 3 ($p=0,405$ e $p=0,626$, rispettivamente), ma non nella classe 2 ($p=0,017$). Trasformando in logaritmo naturale i dati di concentrazione di PbS tutte le distribuzioni sono risultate normali: classe 1, $p=0,502$; classe 2, $p=0,200$; classe 3, $p=0,393$.

Di seguito si riporta l'analisi descrittiva della variabile in Ln e $\mu\text{g/L}$ (*tabella 36*), il box-plot e gli istogrammi rappresentativi delle distribuzioni dei valori trasformati in Ln della variabile in esame (*figure 59 e 60*).

Tabella 36 - Statistiche descrittive della concentrazione del PbS riscontrato nel campione di popolazione campana stratificata per frequenza di consumo di molluschi e crostacei, espresse in logaritmo naturale (4^a colonna) e in µg/L (5^a colonna).

		Statistica lnPbS	Statistica µg/L		
[Pb]	mai	Numero di casi	10		
		Media ± Errore std.	3,337 ± 0,204	28,135 ± 1,226	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	2,876	17,743
			Limite superiore	3,799	44,657
		Mediana	3,310	27,385	
		Media Geometrica	3,275	26,443	
		Deviazione std.	0,645	1,906	
		5° Percentile	2,093	8,109	
		90° Percentile	4,088	59,620	
		Minimo	2,09	8,085	
	Massimo	4,09	59,740		
	da raramente a 2 volte/mese	Numero di casi	81		
		Media ± Errore std.	3,110 ± 0,057	22,421 ± 1,059	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	2,996	20,005
			Limite superiore	3,224	25,128
		Mediana	3,121	22,669	
		Media Geometrica	3,064	21,413	
		Deviazione std.	0,514	1,672	
		5° Percentile	2,173	8,785	
		95° Percentile	3,967	52,826	
		Minimo	1,48	4,393	
	Massimo	4,11	60,947		
	più di una volta a settimana	Numero di casi	20		
		Media ± Errore std.	3,181 ± ,114	24,071 ± 1,121	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	2,942	19,954
			Limite superiore	3,420	30,569
		Mediana	3,279	26,549	
Media Geometrica		3,139	23,081		
Deviazione std.		,511	1,667		
5° Percentile		2,164	8,706		
95° Percentile		3,918	50,300		
Minimo		2,16	8,671		
Massimo	3,92	50,400			

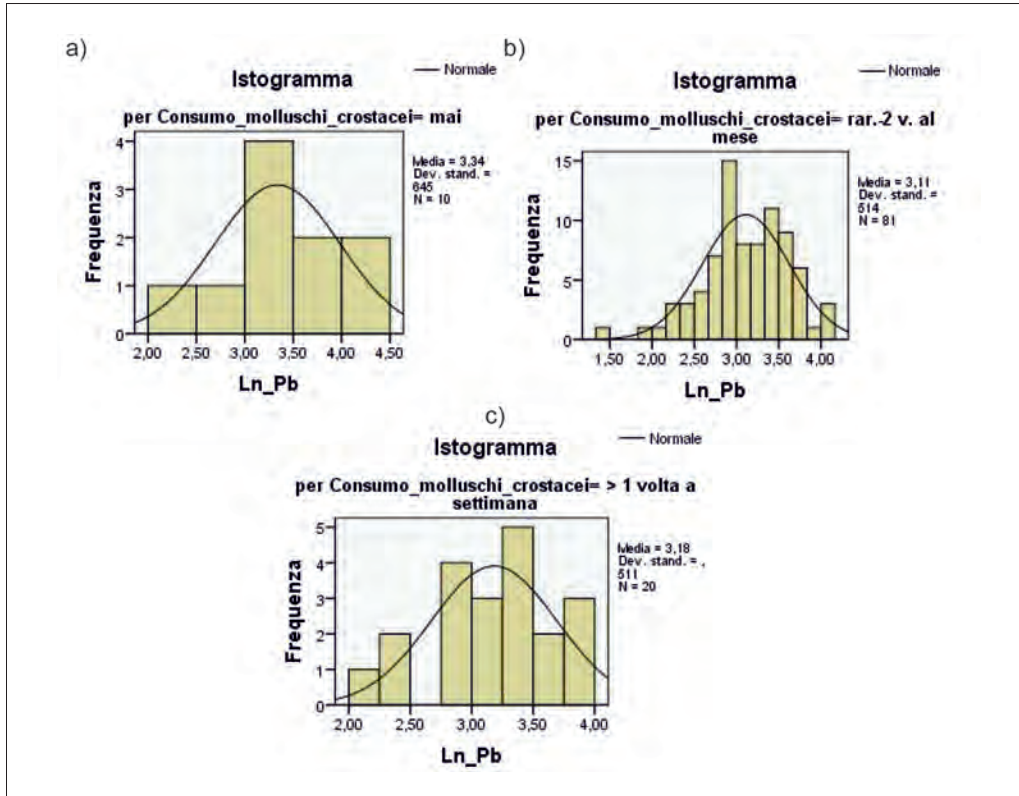


Figura 60 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di PbS trasformate in logaritmo naturale nel campione di popolazione stratificato per frequenza di consumo di molluschi e crostacei: a) mai; b) da raramente a 2 volte al mese; c) più di una volta a settimana.

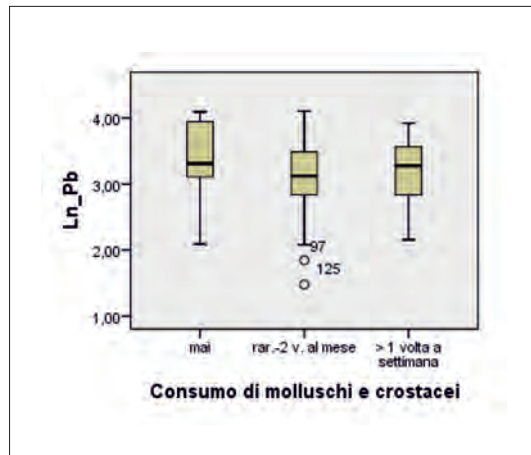


Figura 61 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di PbS trasformate in logaritmo naturale nel campione di popolazione stratificato per frequenza consumo di molluschi e crostacei.

Sono stati confrontati i valori medi delle concentrazioni di PbS per ciascuno strato, mediante il test parametrico ANOVA univariata, che non ha mostrato differenze significative tra le categorie in esame ($p=0,412$), come confermato dal test post hoc di Bonferroni: non vi è differenza significativa tra i valori medi di PbS delle classi 1 vs. 2 ($p=0,600$), 1 vs. 3 e 2 vs. 3 ($p=1,000$ in entrambi i casi).

Campione della popolazione campana stratificato per consumo di alcol

Ai soggetti arruolati è stato chiesto se bevessero vino e quanto, al fine di stratificare il campione in: (a) soggetti che non bevono, (b) soggetti che bevono meno di 500 ml/die, (c) soggetti che bevono tra 500 e 1000 ml/die e (d) soggetti che bevono più di 1000 ml/die. Come detto in precedenza, nessun soggetto arruolato beve più di 1L di vino al giorno e solo 3 soggetti bevono tra 500 e 1000 ml/die.

Le distribuzioni di concentrazione di PbS per (a) e (b) non sono normali ($p<0,05$), pertanto è stata applicata una trasformazione logaritmica (\ln) dei valori di concentrazione ematica del metallo in esame, ottenendo la normalità ($p=0,200$ in entrambi i casi).

L'andamento delle distribuzioni delle concentrazioni di PbS è rappresentato graficamente nel boxplot e negli istogrammi riportati nelle *figure 62 e 63* e quello delle distribuzioni delle concentrazioni trasformate in logaritmo naturale nelle *figure 64 e 65*.

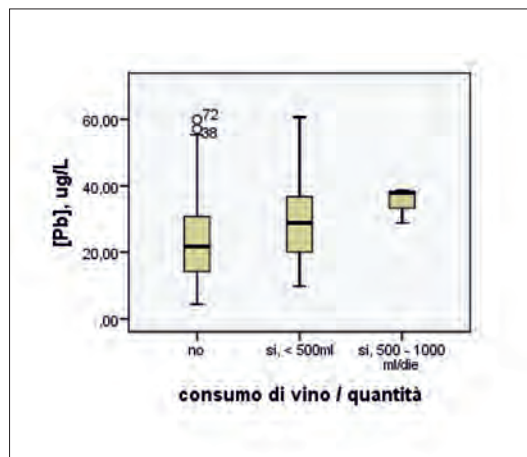


Figura 62 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni di PbS nel campione di popolazione stratificato per consumo di vino.

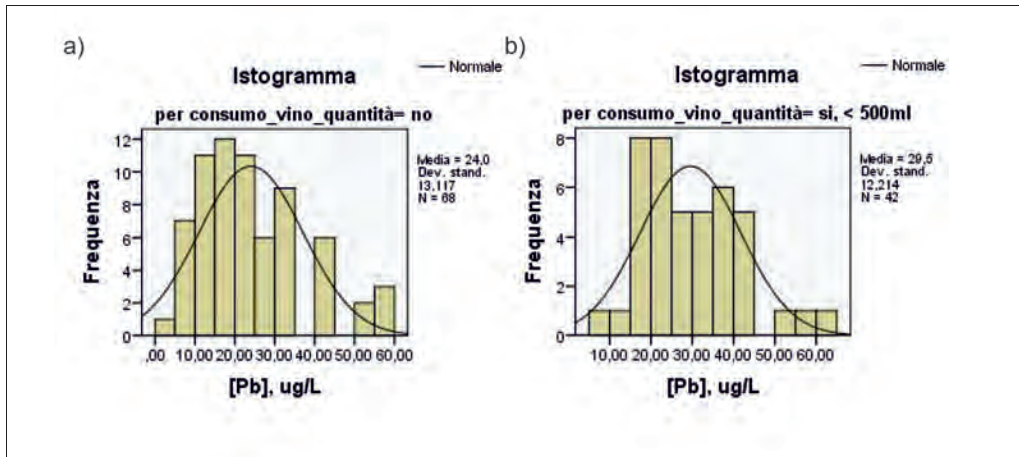


Figura 63 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni di PbS nel campione di popolazione stratificato per consumo di vino: a) no, b) <500ml/die.

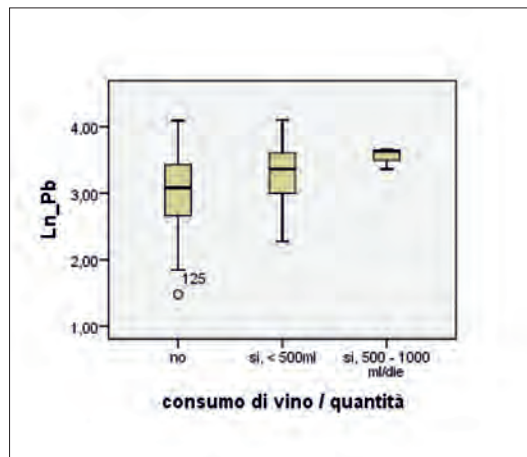


Figura 64 - Boxplot della distribuzione delle concentrazioni lognormali di PbS nel campione di popolazione stratificato per consumo di vino.

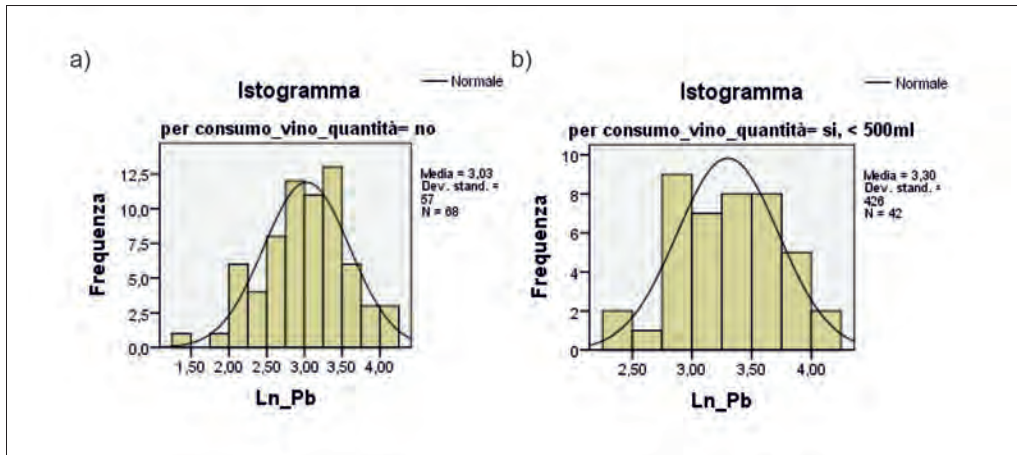


Figura 65 - Istogrammi di frequenza di distribuzione delle concentrazioni lognormali di PbS nel campione di popolazione stratificato per consumo di vino: a) no, b) <500ml/die.

In *tabella 37* sono riportati i risultati dell'analisi descrittiva delle concentrazioni (trasformate e non) di PbS nel campione di popolazione campana stratificato per consumo di vino.

Tabella 37 - Statistiche descrittive della concentrazione di PbS riscontrato nel campione di popolazione campana stratificata per consumo di vino, espresse in logaritmo naturale (4^a colonna) e in µg/L (5^a colonna).

		Statistica lnPbS	Statistica µg/L		
[Pb]	NO	Numero di casi	68		
		Media ± Errore std.	3,030 ± 0,069	20,697 ± 1,071	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	2,892	18,029
			Limite superiore	3,168	23,760
		Mediana	3,079	21,737	
		Media Geometrica	3,006	20,206	
		Deviazione std.	0,570	1,768	
		5° Percentile	2,086	8,053	
		95° Percentile	3,983	53,678	
		Minimo	1,48	4,39	
	Massimo	4,09	59,740		
	> 500 mL/die	Numero dei casi	42		
		Media ± Errore std.	3,300 ± 0,066	27,113 ± 1,068	
		Intervallo di confidenza per la media al 95%	Limite inferiore	3,168	23,760
			Limite superiore	3,433	30,969
		Mediana	3,360	28,789	
		Media Geometrica	3,292	26,897	
		Deviazione std.	0,426	1,270	
		5° Percentile	2,464	11,752	
		95° Percentile	4,062	58,090	
Minimo		2,28	9,777		
Massimo	4,11	60,947			
500-1000 mL/die	Concentrazione PbS soggetto 1		28,82		
	Concentrazione PbS soggetto 2		37,84		
	Concentrazione PbS soggetto 3		38,67		

Confrontando i valori medi delle concentrazioni logaritmiche di piombo ematico dei soggetti che non bevono e che consumano meno di 500 ml/die, mediante il t-test, è stata riscontrata una differenza significativa tra le due categorie in esame ($p=0,009$).

13. Fase 8: Definizione dei valori di riferimento

I Valori di Riferimento degli xenobiotici sono forniti da agenzie nazionali ed internazionali, tra cui la Società Italiana Valori di Riferimento, che li ricavano mediante indagini di monitoraggio solitamente condotte non in singole aree geografiche ma in intere nazioni. Poiché la concentrazione dei biomarcatori può essere influenzata da diversi fattori che variano secondo la collocazione geografica, quali i livelli di industrializzazione ed urbanizzazione e gli stili di vita della popolazione, sarebbe auspicabile poter disporre di VR regionali.

In quest'ambito si colloca il presente lavoro, volto alla definizione di valori di riferimento di cromo e nichel urinari e di piombo ematico nella popolazione campana non professionalmente esposta a tali metalli, al fine di fornire una solida base scientifica in grado di contribuire da un lato a dirimere casi di denunce di malattie professionali posti all'attenzione dell'INAIL a seguito di presunte esposizioni professionali al metallo in esame e dall'altro a stabilire l'eventuale presenza di un rischio incrementale per la salute dovuto all'attività lavorativa.

A scopo riassuntivo e comparativo dei risultati ottenuti dallo svolgimento del presente progetto di studio rispetto ai VR nazionali disponibili in letteratura, nella tabella sottostante (*tabella 38*) sono schematizzati sia i VR dei biomarcatori in esame relativi alla popolazione campana e determinati mediante l'indagine di monitoraggio condotta, sia quelli forniti dalla SIVR e inerenti alla popolazione nazionale (Quarta lista SIVR). In entrambi i casi i VR sono espressi come intervallo di concentrazioni (5°-95° percentile) e indice di tendenza centrale (media geometrica, MG, o mediana, Med).

Tabella 38 - Valori di riferimento di CrU, NiU e PbS della popolazione campana e nazionale, espressi come intervallo di concentrazioni (5°-95° percentile) e indice di tendenza centrale (MG o Med) e fattori di variabilità.

Biomarcatore	Valori riferimento campani			Valori riferimento nazionali (SIVR)		
	5°-95° percentile, µg/L	MG o Med, µg/L	Fattori di variabilità	5°-95° percentile, µg/L	MG o Med, µg/L	Fattori di variabilità
Cromo urinario	<LOD ¹ – 1,386	<LOD ^{1.#}	Prov	0,05 – 0,6	0,22 [#]	E, R, F, ANT
Nichel urinario	<LOD ² – 2,988	0,240 [#]	Prov	0,372 – 4,44	1,47 [#]	F, S, E
Piombo ematico	7,706 – 52,985	22,714 [*]	R, A, E, S, F, Prov	7,38 – 51,7	19,9 [#]	R, A, E, S, Far

* = MG; # = Med
 1 = LOD per cromo urinario = 0,110 µg/L
 2 = LOD per nichel urinario = 0,170 µg/L

I valori possono essere condizionati da variabili quali: Sesso (S), Età (E), Residenza (R), Fumo di tabacco (F), Consumo di alcol (A), Farmaci o medicinali, inclusi preparati ayurvedici o di medicina alternativa, integratori dietetici (Far), attività antropiche (ANT), Provincia di residenza (Prov)

Osservando i valori degli indici di tendenza centrale, è possibile notare che:

- per il cromo urinario, i VR campani sono circa inferiori alla metà di quelli nazionali;
- per il nichel urinario, i VR campani sono circa 1/6 di quelli nazionali;
- per il piombo ematico, i VR campani sono paragonabili/leggermente superiori a quelli nazionali.

Dagli intervalli di concentrazione, si nota che:

- per il cromo urinario è stata riscontrata un'ampia variabilità dei dati e il 95° percentile del range campano decisamente maggiore rispetto a quello nazionale;
- per il nichel urinario, la variabilità dei dati campani è inferiore rispetto a quella nazionale e il 95° percentile del range campano è inferiore a quello nazionale;
- per il piombo ematico, invece, i valori riscontrati sono sovrapponibili rispetto a quelli riportati nella SIVR 2017.

In base ai risultati ottenuti, quindi, è verosimile affermare che in Campania l'esposizione non professionale ai metalli oggetto di studio sia mediamente inferiore rispetto a quella nazionale, ad eccezione del piombo ematico, che risulta analoga; inoltre, gli ampi intervalli di concentrazione riscontrati, in particolare per il cromo urinario e il piombo ematico, denotano un'ampia variabilità interindividuale. Nei

casi di denuncia di malattia professionale, quindi, è auspicabile non solo tener conto dell'esposizione occupazionale, ma valutare di volta in volta i potenziali fattori di variabilità individuale.

Al fine di indagare i fattori potenzialmente responsabili della variabilità dei valori di riferimento campani per i suddetti metalli, in base a quanto suggerito dalla letteratura e riportato nella Quarta Lista SIVR, il campione della popolazione campana arruolato è stato stratificato per diverse variabili, quali sesso, età, abitudine al fumo di tabacco, provincia e zona di residenza, intensità di traffico, consumo di alcol e di molluschi e crostacei.

Per quanto concerne i **VR di CrU e NiU**, è stato verificato che, a differenza di quanto riscontrato dalla SIVR, nessuno dei fattori considerati influisce significativamente sulle concentrazioni urinarie di cromo e nichel, ad eccezione della provincia di residenza.

Dai risultati ottenuti, infatti, è emerso che:

- le concentrazioni di CrU nella popolazione di Napoli (mediana: 0,190 µg/L) sono statisticamente diverse (maggiori) da quelle della popolazione di Caserta e Avellino (mediane <LOD in entrambi i casi; si veda *tabella 15*);
- i livelli di NiU della popolazione di NA, AV e SA sono statisticamente diversi (maggiori) di quelli della popolazione di Caserta (0,255; 0,530; 0,460 µg/L vs <LOD; si veda *tabella 24*).

Si ricorda che il campione di popolazione della provincia di Benevento, essendo costituito da un numero esiguo di soggetti, non è stato incluso nell'analisi.

La non corrispondenza con i fattori di confondimento individuati dalla SIVR trova spiegazione nelle seguenti considerazioni:

- età: l'intervallo preso in considerazione (in base all'obiettivo del progetto) è ristretto all'età lavorativa (18-65 anni), pertanto, a differenza della SIVR, non sono stati arruolati nello studio gli anziani nei quali spesso si riscontrano concentrazioni di xenobiotici differenti; inoltre, i risultati emersi si riferiscono alla variabile età "categorizzata", ovvero il campione di popolazione è stato stratificato dividendolo in quartili, con il semplice scopo di constatare l'andamento delle distribuzioni delle concentrazioni dei metalli in esame al variare dell'età (lavorativa) in via preliminare. Va sottolineato che una diversa categorizzazione oppure un'analisi di correlazione, che prescindono dagli scopi specifici del presente progetto, potrebbero fornire risultati differenti, concordando con le considerazioni della SIVR.
- zona di residenza: nel presente studio sono stati analizzati dati provenienti da zone urbane, semiurbane ed extraurbane appartenenti unicamente alla regione Campania, mentre i VR della Quarta Lista SIVR si riferiscono a dati provenienti dalla popolazione dell'intera nazione, dove le differenze tra zone urbane, semiurbane ed extraurbane sono verosimilmente più accentuate;
- tra le attività antropiche è stato preso in considerazione, allo stato attuale, esclusivamente il traffico veicolare, che dai dati emersi non influenza i valori di concentrazione di CrU e NiU;

- abitudine al fumo: i risultati ottenuti (l'abitudine al fumo non influisce sui livelli di CrU e NiU) non sono confrontabili con quelli della SIVR, in quanto i criteri di stratificazione non coincidono (la SIVR considera solo i non fumatori e gli ex fumatori da almeno 5 anni). In diversi lavori disponibili in letteratura^{3,20-22}, inoltre, sono riportati risultati contrastanti circa l'influenza del fumo sulle concentrazioni urinarie dei metalli in esame e sul contenuto degli stessi nelle sigarette prodotte da diversi marchi. Anche in questo caso, come per il fattore "età", va precisato che la variabile "fumo" è stata presa in considerazione allo scopo di disporre di una banca dati preliminare, la cui analisi potesse fornire spunti per ulteriori approfondimenti al di là degli obiettivi specifici del presente progetto.

I risultati della stratificazione del campione di popolazione campana per i fattori di variabilità considerati nella determinazione dei **VR del PbS**, invece, hanno confermato quanto emerso dall'indagine della SIVR circa l'influenza di età, sesso, zona di residenza e consumo di alcol. In aggiunta, è stata qui riscontrata anche l'influenza della provincia di residenza e dell'abitudine al fumo di sigaretta sui livelli di tale biomarcatore. Più in dettaglio (*tabella 39*), la concentrazione di PbS:

- aumenta con l'età: nella classe ≥ 55 anni i livelli di PbS sono risultati significativamente differenti (maggiori) da quelli delle altre classi di età considerate;
- è maggiore negli uomini rispetto alle donne;
- è maggiore per la popolazione di Napoli rispetto a Caserta e Avellino, che riflettono valori di PbS analoghi (non statisticamente differenti). È opportuno precisare che dalla stratificazione operata sul campione di popolazione campana per provincia di residenza si è ottenuta una scarsa numerosità campionaria per le province di SA e BN, i cui risultati (*tabella 33*), quindi, sono privi di significato statistico, pur rappresentando un'informazione da tenere in considerazione per indagini future volte ad evidenziare eventuali differenze nei livelli di "inquinamento" da piombo delle varie province campane.
- è minore nei soggetti residenti nelle zone semiurbane rispetto ai livelli relativi alle aree urbane; tuttavia, dal confronto tra le concentrazioni di PbS negli abitanti delle zone semiurbana-extraurbana e urbana-extraurbana non sono emerse differenze significative. Va precisato che, a causa della presumibile minore presenza di fonti antropiche di inquinamento, nelle aree extraurbane (periferica, rurale, collinare, montana, lacustre e marina) erano attesi livelli minori di PbS; invece, i risultati ottenuti hanno mostrato concentrazioni di PbS estremamente variabili, comprese in un ampio intervallo, sovrapponibile a quello delle zone urbane e semiurbane: tale dato mostra che anche nel caso di individui residenti in zone extraurbane il potenziale inquinamento ambientale va tenuto in debita considerazione in quanto potrebbe costituire una fonte di esposizione non professionale.
- aumenta con il consumo di alcol, inteso come vino, poiché, come riportato da numerosi studi presenti in letteratura^{1,3-6}, oltre al contenuto di piombo del vino stesso, l'alcol incrementa l'assorbimento di tale metallo;

- non è statisticamente differente tra le categorie fumatori/non fumatori, in accordo con la SIVR, che non inserisce l'abitudine al fumo tra i fattori di confondimento. Va sottolineato, però, che le concentrazioni di PbS degli ex fumatori risultano differenti (maggiori) da quelle dei non fumatori, suggerendo che gli ex fumatori (classe non distinta dalla SIVR) dovrebbero essere trattati separatamente.

A differenza di quanto valutato dalla SIVR, nel presente progetto l'uso di farmaci e di integratori dietetici (Far) non è stato studiato quale fattore di variabilità in quanto considerato quale criterio di esclusione.

Tabella 39 - Valori di riferimento del piombo ematico del campione di popolazione campano stratificato per età, sesso, provincia e zona di residenza, consumo di alcol, abitudine al fumo. I valori sono espressi come indice di tendenza centrale (Media \pm Err. Std. o MG) e intervalli di concentrazioni (5°-95° percentile).

		Valori riferimento PbS	
		5°-95° percentile, $\mu\text{g/L}$	Media \pm Err. Std. o MG, $\mu\text{g/L}$
Età	≤ 35 anni	8,244 – 42,704	19,912 \pm 1,679 §
	36-46 anni	7,842 – 36,167	20,211 \pm 1,600 §
	47-54 anni	6,556 – 55,224	27,111 \pm 2,346 §
	≥ 55 anni	15,400 – 60,269	36,882 \pm 2,288 §
Sesso	Uomo	10,591 - 49,452	26,390 *
	Donna	8,508 - 54,598	20,471*
Provincia di residenza	Napoli	8,715 – 56,195	29,258 \pm 1,391 §
	Caserta	8,017 – 45,557	21,635 \pm 2,340 §
	Avellino	10,240 – 29,900	18,909 \pm 1,873 §
Zona di residenza	Urbana	9,074 – 58,292	28,690 \pm 1,663 §
	Semiurbana	6,340 – 37,256	17,242 \pm 3,228 §
	Extraurbana	8,650 – 49,864	24,524 \pm 1,765 §
Consumo di alcol	No	8,053 – 53,678	20,206*
	Si	11,752 – 58,090	26,897*
Abitudine al fumo	Fumatori	14,083 – 57,397	24,804*
	Non fumatori	8,053 – 54,653	20,491*
	Ex fumatori	11,246 – 57,054	28,933*

* = MG; § = Media \pm Err. Std

I risultati ottenuti nello svolgimento del progetto di studio qui riportato non solo hanno consentito di raggiungere gli obiettivi prefissi nella definizione di Valori di Riferimento di cromo e nichel urinari e piombo ematico, ma suggeriscono anche potenziali filoni di studio per la delucidazione del rapporto tra fattori confondenti ed esposizione non professionale a cromo, nichel e piombo.

Infatti, da un lato evidenziano come in Campania i livelli di cromo urinario della

popolazione non professionalmente esposta variano in un intervallo molto più ampio rispetto a quelli determinati su base nazionale, mentre, al contrario, il nichel urinario risulta inferiore; dall'altro individuano l'età, la zona di residenza (in particolare extraurbana nel valutare l'esposizione a piombo) e l'abitudine al fumo (tenendo in considerazione anche gli ex-fumatori) quali fattori di variabilità su cui è auspicabile programmare futuri studi di approfondimento.

Bibliografia

1. A. Alimonti, B. Bocca, D. Mattei, A. Pino. Istituto Superiore di Sanità, *Biomonitoraggio della popolazione italiana per l'esposizione ai metalli: valori di riferimento 1990-2009*. Rapporti ISTISAN 10/22, 2010, iii, 58 p.
2. Società Italiana Valori di Riferimento, *Quarta lista dei valori di riferimento per elementi, composti organici e loro metaboliti*. Edizione 2017
3. P. Apostoli. *Valori di riferimento degli elementi in traccia nei fluidi biologici*. Ann. Ist. Super. Sanità, 1995, Vol. 31(2): 261-274
4. S. Dally, C. Girre, E. Hisperd G., Thomas, L. Fournier. *High blood lead level in alcoholics: wine vs. beer*. Drug Alcohol Depend., 1989, 23(1): 45-48
5. C.G. Elinder, B. Lind, B. Nilsson, A. Oskarsson. *Wine- An important source of lead exposure*. Food Addit Contam., 1988, 5(4):641-644
6. R. Neri, F. Palmieri. *Indagini sui livelli ematici di piombo sulla popolazione spezzina*. Ann. Ist. Super. Sanità, 1998, Vol. 34(1): 51-57
7. G.K. Tasneem, I. Hassan, K. Naveed, K.J. Mohammad, B.A. Mohammad, J. Nussarat, A.K. Ghulam, *Copper, Chromium, Manganese, Iron, Nickel, and Zinc Levels in Biological Samples of Diabetes Mellitus Patients*, Biol. Trace Elem. Res., 2008, 122(1):1-18
8. E.K. Silbergeld, J. Schwartz, K. Mahaffey. *Lead and osteoporosis: mobilization of lead from bone in postmenopausal women*, Environ Res. 1988, 47(1):79-94
9. J. Tallkvist, C.L. Bowlus, B. Lonnerdal. *Effect of iron treatment on nickel absorption and gene expression of the divalent metal transporter (DMT1) by human intestinal Caco-2 cells*. Pharmacol Toxicol., 2003, 92(3):121-124
10. C.A. Davery. *Exposure to metals can be Therapeutic*. Chimia (Aarau), 2015, 69(3):125-130
11. A. Levina, P.A. Lay. *Chemical properties and toxicity of chromium (III) nutritional supplements*. Chem. Res. in Toxicology, 2008, 21:563-571
12. G. Psomas, D.P. Kessissoglou. *Quinolones and non-steroidal anti-inflammatory drugs interacting with copper(II), nickel(II), cobalt(II) and zinc(II): structural features, biological evaluation and perspectives*. Dalton Trans, 2013, 42(18):6252-76

D.R. Pan, H. Zhu, Z.Y. Hu, S. Pang, W. Wu, N.L. Tian, B. Xu, J. Iqbal, Y.J. Zhang. *Cobalt chromium-based biodegradable polymer sirolimus-eluting stent: rationale, evidence and clinical experience*. *Minerva Cardioangiol.*, 2015, 63(5):411-26

M. Peng, X. Yang. *Controlling diabetes by chromium complexes: The role of the ligands*. *J Inorg Biochem.*, 2015, 146:97-103

J. Błoniarczyk, S. Zaręba. *The study of nickel and chromium contents in dietary supplements supporting slimming*. *Rocz. Panstw. Zakł. Hig.*, 2011, 62(2):153-158

J. Błoniarczyk, S. Zaręba. *Selected microelements (Cr, Zn, Cu, Mn, Fe, Ni) in slimming preparations*. *Rocz. Panstw. Zakł. Hig.*, 2007, 58(1):165-170

Norman, Streiner. *Biostatistica-Biostatistics: the bare essentials*. Casa editrice Ambrosiana, 2004. ISBN: 88-408-1043-9

http://dati.istat.it/Index.aspx?DataSetCode=DCIS_POPRES1" sulla popolazione residente, ultimo accesso 23 giugno 2017

Dipartimento della Funzione Pubblica-Pubblica Amministrazione di qualità-Cassetta degli attrezzi-Tabella per la definizione del campione, consultabile al sito http://qualitapa.gov.it/fileadmin/mirror/i-migliora/materiali/8_Strumento_8_Tabelle_per_la_definizione_del_campione.pdf", ultimo accesso: 23 giugno 2017.

Y. Tian, H. Hou, F. Zhu, A. Wang, Y. Liu, Q. Hu. *Simultaneous determination of chromium, cadmium, and lead and evaluation of the correlation between chromium and cotinine in Chinese smokers*. *Biol Trace Elem Res.*, 2014, 158(1):9-14

H.I. Afridi, T.G. Kazi, N.G. Kazi, M.K. Jamali, M.B. Arain, Sirajuddin, J.A. Baig, G.A. Kandhro, S.K. Wadhwa, A.Q. Shah. *Evaluation of cadmium, lead, nickel and zinc status in biological samples of smokers and nonsmokers hypertensive patients*. *J Hum Hypertens.*, 2010, 24(1):34-43

H.I. Afridi, T.G. Kazi, F.N. Talpur, D. Brabazon. *Evaluation of trace and toxic elements in the samples of different cigarettes and their impact on human health of Irish diabetes mellitus patients*. *Clin Lab.*, 2015, 61(1-2):123-40

M. Esposito, P. Maglio, T. Hauber, O. Miedico, F. P. Serpe, F.A. Chiaravalle. *Studio sulla contaminazione da metalli in prodotti ittici provenienti dall'area marina di Crotone* *La Rivista di Scienza dell'Alimentazione*, 01/2012, 1:7-15

A. Sepe, L. Ciaralli, M. Ciprotti, R. Giordano, E. Funari, S. Costantini *Determination of cadmium, chromium, lead and vanadium in six fish species from the Adriatic Sea*. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2003, 20(6):543-52

