

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Effetti sulla salute dell'inquinamento
atmosferico nelle aree urbane**

**Risultati di un progetto congiunto
Istituto Superiore di Sanità – Ministero dell'Ambiente**

A cura di
Riccardo Crebelli e Angelo Carere
Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia

ISSN 1123-3117
Rapporti ISTISAN
03/11

Istituto Superiore di Sanità

Effetti sulla salute dell'inquinamento atmosferico nelle aree urbane. Risultati di un progetto congiunto Istituto Superiore di Sanità – Ministero dell'Ambiente.

A cura di Riccardo Crebelli e Angelo Carere

2003, iv, 97 p. Rapporti ISTISAN 03/11

Un progetto di ricerca congiunto Istituto Superiore di Sanità - Ministero dell'Ambiente sugli effetti sulla salute dell'inquinamento atmosferico nelle aree urbane ha permesso di condurre indagini sugli effetti cardiovascolari e respiratori acuti, sul rischio di effetti a lungo termine e sulla prevalenza di fenomeni allergici in popolazioni modello esposte a inquinanti atmosferici. Il monitoraggio di soggetti suscettibili (con broncopneumopatia cronica ostruttiva, asma, infarto del miocardio) ha mostrato variazioni nella funzionalità respiratoria e cardiaca associate all'inquinamento da polveri fini. Uno studio di mortalità su una coorte di benzinai e l'analisi di biomarcatori di danni genetici nei vigili urbani, addetti al controllo del traffico veicolare a Roma, non hanno mostrato effetti avversi associati alla esposizione a inquinanti. Infine, una elevata incidenza di sensibilizzazione allergica è stata osservata nei vigili urbani con presente o pregressa esposizione a inquinanti atmosferici.

Parole chiave: Inquinamento atmosferico, Effetti sulla salute, Ambiente urbano

Istituto Superiore di Sanità

Health effects of urban air pollution. Results of a joint project Istituto Superiore di Sanità – Italian Ministry of Environment.

Edited by Riccardo Crebelli and Angelo Carere

2003, iv, 97 p. Rapporti ISTISAN 03/11 (in Italian)

A joint research project of the Istituto Superiore di Sanità (ISS, Italian National Institute of Health) and the Italian Ministry of Environment on the health effects of urban air pollution addressed the risks of both acute and long term adverse effects in study populations exposed to air pollutants. A panel study on susceptible individuals (affected by chronic bronchopneumo-obstructive diseases, myocardial ischemia, and asthma) highlighted a significant association between daily concentrations of fine particles and impaired respiratory and heart functions. No excess cancer risk was observed in a cohort of gasoline station attendants. In a survey of Rome traffic policemen, biomarkers of genotoxic damage were significantly increased by smoking habits rather than by the occupational exposure to air pollutants. Finally, an allergologic screening of Rome policemen, with current or past exposure to traffic fumes, revealed a high incidence of allergic sensitization in all study groups.

Key words: Air pollution, Health effects, Urban areas

Si ringrazia il Corpo di Polizia Municipale della città di Roma, l'Amministrazione Capitolina, il Medico Competente Francesco Tomei e gli specializzandi della cattedra di Medicina del Lavoro dell'Università "La Sapienza" di Roma per la collaborazione prestata nelle indagini sui vigili urbani.

Per informazioni rivolgersi a: crebelli@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it/pubblicazioni.

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© 2003 Istituto Superiore di Sanità (Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma)

INDICE

Premessa	iii
-----------------------	------------

Valutazione del rischio di tumori e di malattie neurologiche in una coorte di benzinai

<i>Susanna Lagorio, Ivano Iavarone, Francesco Forestiere, Alessandra Sperati, Elisabetta Rapiti, Marco Biocca, Adriana Pasquini, Claudia Galassi, Federica Sarti.....</i>	1
---	----------

Studio degli effetti dell'inquinamento atmosferico sulla funzionalità cardiaca e respiratoria in individui suscettibili

<i>Susanna Lagorio, Francesco Forastiere, Riccardo Pistelli, Ivano Iavarone, Giorgio Cattani, Giordano Stacchini, Giovanni Ziemacki, Achille Marconi, Paola Michelozzi, Valeria Fano, Alessia Trivini, Raffaele Antonelli Incalzi, Salvatore Basso, Raffaella Tiziana Benedetto, Anna Maria Della Corte, Leonello Fuso, Carmela Maiolo, Sandra Sammarro, Maria Serra, Salvatore Spadaro, Lorenzo Maria Tramaglino, Bart Ostro.....</i>	14
--	-----------

Monitoraggio biologico dell'esposizione ad inquinanti atmosferici nei vigili urbani del comune di Roma

<i>Riccardo Crebelli, Andrea Zijno, Paola Leopardi, Francesca Marcon, Luigi Conti, Cristina Andreoli, Sabrina Rossi, Angelo Carere, Stefania Caiola, Francesco Tomei, Agnese Martini, Laura Marcellini, Alessandra Verdina, Rossella Galati, Sergio Ghittori, Marcello Imbriani.....</i>	53
--	-----------

Valutazione dei parametri allergologici su gruppi di popolazione con alti livelli di esposizione ad inquinanti atmosferici

<i>Carlo Pini, Gabriella Di Felice, Bianca Barletta, Patrizia Iacovacci, Raffaella Tinghino, Claudia Afferni, Cinzia Butteroni, Chiara Alisi, Barbara Brunetto, Cristina D'Ippolito, Corrado Fagnani, Maria Antonietta Stazi.....</i>	80
---	-----------

PREMESSA

L'inquinamento atmosferico rappresenta uno dei principali fattori di rischio per la salute nelle aree urbane, ed è inserito dall'Organizzazione Mondiale della Sanità tra le dieci più importanti cause di morte per i cittadini europei (*OMS Annual Report 2002*). L'elevato inquinamento atmosferico che si misura tuttora nelle aree urbane italiane richiede quindi interventi tempestivi e incisivi, a tutela dell'ambiente e della sanità pubblica. L'attuazione di efficaci misure preventive non può d'altra parte prescindere da una migliore conoscenza dei meccanismi patogenetici degli inquinanti e dei rischi ad essi associati. In particolare, la definizione dei rischi di patologie acute e di effetti a lungo termine, e del ruolo dell'inquinamento atmosferico nella eziologia di patologie con crescente diffusione nelle aree urbane, sono aspetti di interesse prioritario che richiedono ulteriore delucidazione.

L'Istituto Superiore di Sanità (ISS), da lungo tempo impegnato sul binomio salute-ambiente, ha fornito negli anni passati significativi contributi sulle tematiche sopra indicate. Il Ministero dell'Ambiente ha affidato all'ISS, nell'ambito delle attività previste dal Piano Triennale per la Tutela Ambientale 1994-1996, la realizzazione del programma di ricerca "Aspetti igienico-sanitari dell'inquinamento atmosferico nelle aree urbane (PR22-IS, 1998-2002)". Il programma PR22-IS si articola in tre sottoprogetti che affrontano varie tematiche attinenti l'inquinamento atmosferico, dagli aspetti metodologici con uno studio pilota sugli inquinanti atmosferici nella città di Roma, allo studio di combustibili alternativi per il trasporto pubblico urbano, all'impatto sulla salute dei cittadini.

Questo rapporto presenta una sintesi dei risultati del sottoprogetto "Effetti sulla salute dell'inquinamento atmosferico nelle aree urbane". Le ricerche descritte, relative al rischio cancerogeno, agli effetti mutageni, agli effetti cardiovascolari e respiratori acuti e agli effetti immunologici e allergici, affrontano in modo trasversale la tematica e concorrono a definire lo scenario complessivo dell'impatto igienico-sanitario dell'inquinamento atmosferico nelle nostre aree urbane.

Riccardo Crebelli

Responsabile Scientifico del Sottoprogetto
"Effetti sulla salute dell'inquinamento
atmosferico nelle aree urbane"

Angelo Carere

Coordinatore del Programma PR22-IS

VALUTAZIONE DEL RISCHIO DI TUMORI E DI MALATTIE NEUROLOGICHE IN UNA COORTE DI BENZINAI

Susanna Lagorio (a), Ivano Iavarone (b), Francesco Forestiere (c), Alessandra Sperati (c),
Elisabetta Rapiti (c), Marco Biocca (d), Adriana Pasquini (d), Claudia Galassi (d), Federica Sarti (d)

(a) *Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Dipartimento di Epidemiologia, ASL RME, Roma*

(d) *Centro di Documentazione per la Salute, Agenzia Sanitaria Emilia Romagna, Bologna*

Introduzione

Nella prima metà degli anni '90 abbiamo condotto uno studio epidemiologico sulla mortalità dei gestori degli impianti di distribuzione di carburanti presenti nella regione Lazio nel 1980 (1, 2).

In questa coorte di benzinai, in rapporto al profilo di mortalità della popolazione residente nella regione Lazio, si osservava un deficit di mortalità per tutte le cause (ascrivibile ad una mortalità per cause cardiovascolari e per tumori totali inferiore all'attesa) e nessun eccesso statisticamente significativo di mortalità per neoplasie di particolare interesse data l'esposizione dei benzinai a gas di scarico di motori e a vapori di carburanti (tumore polmonare, leucemie, tumori del rene o tumori cerebrali).

Tuttavia, nell'analisi ristretta ai gestori delle piccole stazioni di servizio (caratterizzate da un più elevato valore del venduto medio annuale per addetto), notavamo un eccesso di mortalità per tumori dell'esofago [4 casi osservati; rapporto standardizzato di mortalità (*Standardized Mortality Ratio*, SMR) = 3,4; Intervallo di Confidenza (IC) 90% = 1,2-7,8] e per neoplasie del sistema nervoso centrale (5 casi osservati; SMR = 2,6; IC 90% = 1,1-5,6).

Per approfondire i risultati di questa indagine abbiamo ritenuto utile replicare lo studio in Emilia Romagna, aggiornare il follow-up dei benzinai della regione Lazio ed effettuare un'analisi combinata della mortalità delle due coorti.

Metodi

Popolazione in studio

L'individuazione delle coorti è stata resa possibile grazie alla disponibilità presso le Regioni Lazio ed Emilia Romagna dei dati relativi ad un censimento delle stazioni di rifornimento, condotto nel 1980. A questa data risultavano presenti 2738 impianti di distribuzione carburanti nel Lazio e 3369 in Emilia Romagna. I dati raccolti includevano dati personali sui gestori indispensabili per effettuare l'accertamento dello stato in vita e dell'eventuale causa di morte, e informazioni sulle caratteristiche delle stazioni di rifornimento utilizzabili per stimare indirettamente il livello di esposizione a vapori di carburante.

In particolare, i dati raccolti comprendevano: nome, data di nascita e anzianità lavorativa al 1980 del gestore, numero di addetti e quantità di carburante venduto nei 4 anni precedenti.

Sono stati considerati eligibili per lo studio solo i gestori chiaramente individuabili come persone fisiche (non le società, che rappresentavano il 7.5% dei record relativi alle stazioni risultanti al censimento del 1980 nelle due regioni in studio) e che erano ancora in vita al 1° gennaio 1981.

La coorte consiste dunque di 6019 benzinai (5021 uomini e 998 donne) la cui distribuzione per sesso ed età all'ingresso nello studio viene riportata nella Tabella 1.

Tabella 1. Distribuzione dei benzinai per sesso ed età all'ingresso nello studio (1° gennaio 1981)

Sesso	Età	Emilia Romagna		Lazio		Totale	
		<i>n.</i>	%	<i>n.</i>	%	<i>n.</i>	%
Uomini	≤ 20	5	0,2	6	0,3	11	0,2
	21-30	177	6,5	186	8,1	363	7,2
	31-40	453	16,6	468	20,5	921	18,3
	41-50	729	26,6	712	31,2	1441	28,7
	51-60	841	30,7	609	26,7	1450	28,9
	60+	531	19,4	304	13,3	835	16,6
	Totale	2736	100	2285	100	5021	100
Donne	≤ 20	1	0,2	1	0,3	2	0,2
	21-30	73	11,4	29	8,1	102	10,2
	31-40	112	17,5	88	24,6	200	20,0
	41-50	181	28,2	97	27,2	278	27,9
	51-60	189	29,5	91	25,5	280	28,1
	60+	85	13,3	51	14,3	136	13,6
	Totale	641	100	357	100	998	100
Totale	≤ 20	6	0,2	7	0,3	13	0,2
	21-30	250	7,4	215	8,1	465	7,7
	31-40	565	16,7	556	21,0	1121	18,6
	41-50	910	26,9	809	30,6	1719	28,6
	51-60	1030	30,5	700	26,5	1730	28,7
	60+	616	18,2	355	13,4	971	16,1
	Totale	3377	100	2642	100	6019	100

Storia lavorativa dei benzinai in studio e delle stazioni di servizio cui erano addetti nel 1980

La distribuzione dei benzinai in studio per anzianità lavorativa all'ingresso nello studio viene riportata nella Tabella 2.

La maggior parte (73%) dei membri della coorte lavoravano nel 1980 come addetti a tempo pieno alla stazione di servizio (Tabella 3). Tuttavia, la proporzione di addetti part-time era più elevata in Emilia Romagna (31%) che nel Lazio (8%).

La Tabella 4 descrive distribuzione delle stazioni di servizio cui erano addetti i 6019 gestori inclusi nello studio di coorte per tipologia (piccole stazioni *vs.* grandi impianti), per numero di addetti e quantità di benzina (super e normale) erogata annualmente.

Le piccole stazioni costituiscono il 57% degli impianti in Emilia Romagna e il 65.5% nel Lazio (Tabella 4). Si può anche notare che le piccole stazioni del Lazio sono caratterizzate da un più elevato quantitativo di carburante erogato per addetto, mentre in Emilia Romagna si osserva il contrario (Tabella 4).

Tabella 2. Distribuzione dei benzinai per anzianità lavorativa all'ingresso nello studio (1° gennaio 1981)

Sesso	Anzianità lavorativa	Emilia Romagna		Lazio		Totale	
		<i>n.</i>	%	<i>n.</i>	%	<i>n.</i>	%
Uomini	0-10	1284	46.93	985	43.11	2269	45.19
	10-20	787	28.76	877	38.38	1664	33.14
	21-30	585	21.38	354	15.49	939	18.70
	30+	80	2.92	69	3.02	149	2.97
	Totale	2736	100	2285	100	5021	100
Donne	0-10	402	62.71	241	67.51	643	64.43
	10-20	146	22.78	85	23.81	231	23.15
	21-30	83	12.95	28	7.84	111	11.12
	30+	10	1.56	3	0.84	13	1.30
	Totale	641	100	357	100	998	100
Totale	0-10	1686	49.93	1226	46.40	2912	48.38
	10-20	933	27.63	962	36.41	1895	31.48
	21-30	668	19.78	382	14.46	1050	17.44
	30+	90	2.67	72	2.73	162	2.69
	Totale	3377	100	2642	100	6019	100

Tabella 3. Distribuzione dei gestori per tipo di rapporto di lavoro al 1980

Sesso	Lavoro	Emilia Romagna		Lazio		Totale	
		<i>n.</i>	%	<i>n.</i>	%	<i>n.</i>	%
Uomini	Full-time	1826	66.7	1896	83.0	3722	74.1
	Part time	865	31.6	148	6.5	1013	20.2
	Missing	45	1.6	241	10.5	286	5.7
	Totale	2736	100	2285	100	5021	100
Donne	Full-time	460	71.8	223	62.5	683	68.4
	Part time	171	26.7	53	14.8	224	22.4
	Missing	10	1.6	81	22.7	91	9.1
	Totale	641	100	357	100	998	100
Totale	Full-time	2286	67.7	2119	80.2	4405	73.2
	Part time	1036	30.7	201	7.6	1237	20.6
	Missing	55	1.6	322	12.2	377	6.3
	Totale	3377	100	2642	100	6019	100

Tabella 4. Principali caratteristiche delle stazioni di rifornimento in cui lavoravano i 6019 soggetti in studio

Tipologia	Emilia Romagna				Lazio				Totale			
	<i>n.</i>	addetti	venduto	venduto/ addetto	<i>n.</i>	addetti	venduto	venduto/ addetto	<i>n.</i>	addetti	venduto	venduto/ addetto
Piccole	1915	1.4	227.1	153.5	1731	1.6	281.5	183.4	3646	1.5	252.9	168.4
Grandi	1460	2.0	393.6	186.5	911	2.6	394.0	157.3	2371	2.3	393.8	174.8
Totale	3377	1.7	299.5	168.0	2642	1.9	320.3	174.3	6019	1.8	308.6	170.9

Addetti = numero equivalente di addetti a tempo pieno (dove addetto full-time = 1 e addetto part-time = 0.5); **Venduto** = Media annuale della benzina (super + normale) erogata sul periodo 1976-79 (litri x 1000); **Venduto/addetto** (venduto per addetto) = Media annuale della benzina (super + normale) erogata sul periodo 1976-79 (litri x 1000) diviso il numero equivalente di addetti a tempo pieno.

Accertamento dello stato in vita e delle cause di morte

I dati del censimento degli impianti di distribuzione carburanti nel 1980 non includevano la residenza anagrafica dei gestori.

Per accertare lo stato in vita dei soggetti in studio abbiamo inizialmente consultato i registri anagrafici dei comuni dove erano situate le stazioni di servizio e successivamente ogni altro comune in cui le persone individuate si fossero eventualmente trasferite entro la fine del periodo in studio (31 dicembre 1994 per la coorte dell'Emilia Romagna e 31 dicembre 1996 per la coorte del Lazio).

Per individuare la residenza dei soggetti che non risultavano presenti nei registri anagrafici dei comuni in cui era situata la stazione di rifornimento di cui erano gestori, sono stati consultati gli archivi delle Camere di Commercio e (limitatamente all'Emilia Romagna) l'archivio regionale degli assistiti dai medici di base.

Alla fine dello studio, 4877 soggetti erano ancora in vita (81%), 944 erano deceduti (16%) e 198 (3%) persone risultavano perse al follow-up (Tabella 5).

Tabella 5. Stato in vita dei benzinai alla fine del follow-up*

Sesso	Stato in vita	Emilia Romagna		Lazio		Totale	
		<i>n.</i>	%	<i>n.</i>	%	<i>n.</i>	%
Uomini	Vivi	2225	81.3	1775	77.7	4000	79.7
	Deceduti	448	16.4	414	18.1	862	17.2
	Persi	63	2.3	96	4.2	159	3.2
	Totale	2736	100	2285	100	5021	100
Donne	Vivi	568	88.6	309	86.6	877	87.9
	Deceduti	53	8.3	29	8.1	82	8.2
	Persi	20	3.1	19	5.3	39	3.9
	Totale	641	100	357	100	998	100
Totale	Vivi	2793	82.7	2084	78.9	4877	81.0
	Deceduti	501	14.8	443	16.8	944	15.7
	Persi	83	2.5	115	4.4	198	3.3
	Totale	3377	100	2642	100	6019	100

* La fine del follow-up è il 31 dicembre 1994 per l'Emilia Romagna e il 31 dicembre 1996 per il Lazio.

Per l'accertamento della causa di morte dei deceduti è stato effettuato un *record-linkage* con la banca-dati nazionale di mortalità dell'ISTAT (3) utilizzando come chiavi di accoppiamento le date di nascita e di morte del soggetto e i codici ISTAT dei comuni di residenza e di morte.

Per quei soggetti per i quali il *record-linkage* aveva fallito (nessuno o troppi record appaiati) sono stati consultati i Registri nominativi regionali delle cause di morte.

Nei pochi casi in cui nessuna delle due procedure risultava applicabile (per compatibilità dell'anno di decesso con la copertura temporale dei tre diversi database) o aveva dato esito positivo, è stata utilizzata la causa di morte risultante al comune in cui il decesso era avvenuto, codificata secondo la IX revisione della ICD (4).

Per 6 soggetti (3 dei quali deceduti all'estero) la causa di morte rimaneva ignota.

Indicatori di esposizione a vapori di carburanti

Non sono purtroppo disponibili serie storiche di misure dell'esposizione a benzene o ad altri composti chimici volatili per i soggetti in studio.

Tuttavia, nel quadro del progetto internazionale di ricerca *Biomonitoring of human population exposed to petroleum fuels with special consideration of the role of benzene as a genotoxic component* coordinato dal nostro Istituto (5), abbiamo condotto due indagini di valutazione dell'esposizione a benzene in un campione di benzinai di Roma, rispettivamente nel 1992 e nel 1994-1995.

Durante la prima indagine (1, 6), condotta su un campione di 111 benzinai di Roma e basata su misure personali ripetute (circa 7.5/soggetto), avevamo stimato un'esposizione media annuale a benzene di 0.55 mg/m³ (DS 2.5). Il contenuto medio di benzene in 34 campioni di carburante raccolti durante l'indagine del 1992, era di 24.5 g/l (2.8% v/v) senza differenze tra benzina alchilata e benzina senza piombo.

Durante la seconda indagine (7, 8), condotta su 12 benzinai con 4 misure ripetute per soggetto, l'esposizione media di gruppo a benzene era 0.32 mg/m³ (DS 0.21) e il contenuto medio di benzene misurato in 93 campioni di carburante era di 11 g/l (sempre senza differenze tra benzina con piombo e senza piombo). Nel corso di questa indagine abbiamo potuto osservare un significativo decremento del contenuto di benzene nella benzina, che passava dal 1.5% (v/v) nel luglio del 1994 al 1.1% nell'aprile 1995. Alla diminuzione del contenuto di benzene nel carburante erogato corrispondeva una diminuzione delle concentrazioni di benzene misurate all'altezza della zona respiratoria degli addetti alle stazioni di servizio (7). Il profilo di esposizione a benzene nel gruppo di gestori in studio era caratterizzato da piccola variabilità interindividuale e ampia variabilità intra-individuale (da giorno a giorno). Circa il 70% della varianza nell'esposizione personale veniva spiegata da un modello di regressione lineare multipla che includeva la quantità di benzene contenuto nella quota giornaliera di carburante erogato, l'eventuale presenza di una pensilina nella stazione, le concentrazioni atmosferiche di benzene e l'eventuale quantità di carburante rifornito alla stazione (7).

Sulla base dei risultati di queste indagini, abbiamo deciso di utilizzare la quantità media annuale di benzina erogata dai gestori delle stazioni di servizio inclusi nella coorte come indicatore di esposizione a vapori di carburante.

La validità di tale indicatore ai fini dell'analisi del rischio di mortalità per intensità stimata di esposizione si basa sull'assunzione che il rango dei soggetti nella classificazione basata sul valore medio annuale calcolato a partire dai venduti sul periodo 1976-1979 si sia mantenuto costante negli anni successivi, il che sembra un'ipotesi piuttosto ragionevole.

Metodi di analisi

Confronto della mortalità della coorte con la popolazione italiana

Ai fini del calcolo degli anni-persona di osservazione, ciascun individuo è stato considerato a partire dal 1° gennaio 1981, fino al momento dell'eventuale decesso o altrimenti fino alla fine dello studio (31 dicembre 1994 per la coorte dell'Emilia Romagna e 31 dicembre 1996 per la coorte del Lazio). I persi al follow-up sono stati considerati vivi alla fine del periodo in studio.

La distribuzione degli anni-persona di osservazione, maturati dai membri della coorte totale, per classi d'età e periodo di calendario viene riportata nella Tabella 6.

Gli SMR sono stati calcolati dividendo il numero di decessi osservati (per una data causa o gruppo di cause di morte) per il numero di decessi attesi.

I decessi attesi, a loro volta, sono stati calcolati moltiplicando i tassi di mortalità specifici per causa, sesso, età (classi quinquennali) e periodo di calendario (1980-1984; 1985-1989; 1990-1994; 1995-1997) nella popolazione italiana per gli anni-persona di osservazione maturati dai membri della coorte in ciascuna delle categorie di stratificazione.

Tabella 6. Distribuzione per età e periodo di calendario degli anni-persona a rischio maturati dai 6019 gestori

Sesso	Età	1981-84	1985-89	1990-94	1995-96	Totale	
		<i>n.</i>	<i>n.</i>	<i>n.</i>	<i>n.</i>	<i>n.</i>	%
Uomini	<30	1083	420	25	0	1528	2.2
	30-40	3112	2680	1427	128	7348	10.6
	40-50	5561	5808	3993	633	15994	23.2
	50-60	5771	7137	6737	1209	20854	30.2
	60-70	3085	5339	6423	1171	16019	23.2
	70+	1101	2126	3387	660	7274	10.5
	Totale	19713	23511	21992	3801	69016	100
Donne	<30	323	162	5	0	490	3.5
	30-40	722	687	429	21	1859	13.1
	40-50	1027	1164	920	124	3235	22.9
	50-60	1199	1465	1285	181	4131	29.2
	60-70	526	998	1375	193	3092	21.8
	70+	166	371	667	141	1346	9.5
	Totale	3964	4848	4680	660	14152	100
Totale	<30	1406	583	30	0	2018	2.4
	30-40	3834	3368	1856	149	9207	11.1
	40-50	6588	6971	4913	756	19228	23.1
	50-60	6971	8602	8022	1390	24985	30.0
	60-70	3612	6337	7798	1364	19111	23.0
	70+	1266	2498	4054	801	8619	10.4
	Totale	23676	28359	26673	4461	83168	100

Analisi della mortalità per intensità stimata di esposizione a vapori di carburante

Abbiamo analizzato il rischio di mortalità per tutte le cause, i tumori maligni, i tumori del sistema genito-urinario, del sistema nervoso e del sistema linfopoietico in funzione di indicatori di intensità di esposizione a vapori di carburanti, mediante modelli di regressione di Poisson.

Questo tipo di analisi prescinde dal fatto che vi siano o meno differenze (eccessi o deficit) di mortalità tra i soggetti in studio rispetto alla popolazione generale.

Il rischio di mortalità per le cause selezionate è stato analizzato in relazione a due indicatori di carico di lavoro:

- la quantità media annuale di benzina venduta per addetto full-time (venduto/addetto);
- le dimensioni della stazione di rifornimento (grandi / piccole).

Rispetto al venduto/addetto, abbiamo contrastato due categorie (alto/basso) con cut-off equivalente alla mediana della distribuzione *overall* (152750 litri di benzina super + normale). Le dimensioni della stazione sono state incluse nel modello per tener conto del fatto che l'attività lavorativa prevalente tra i soggetti in servizio nelle piccole stazioni concerne quasi esclusivamente l'erogazione di carburante, mentre nelle grandi stazioni i benzinai possono svolgere anche altre attività (riparazioni meccaniche, elettriche e di pneumatici).

Poiché le donne rappresentavano una piccola frazione dei soggetti inclusi nello studio, con una percentuale di decessi pari all'8.6% del totale (82 su 994), l'analisi è stata limitata alla sola subcoorte maschile.

Nella definizione del miglior modello predittivo, oltre agli indicatori di esposizione, abbiamo considerato l'opportunità di includere il periodo di calendario (1980-1984, 1985-1989, 1990-1994, 1995-1996), l'età (gruppi quinquennali: 15-85+ anni) e l'anzianità lavorativa (categorie decennali: 10-70+) dei soggetti in studio, scegliendo le variabili che producevano un miglioramento

significativo nella predittività del modello stesso (*Likelihood Ratio Test*, LRT) insieme ad un cambiamento apprezzabile nei coefficienti di regressione. Nel modello definitivo (vedi Tabelle 9-12) è stata ritenuta solo l'età. L'adattabilità ai dati dei modelli di regressione di Poisson è stata verificata attraverso il test Poisson (STATA).

I risultati dell'applicazione dei modelli di regressione di Poisson sono stati espressi in termini di rischio relativo in funzione dei valori delle variabili predittive e relativi intervalli di confidenza al 95% (IC 95%). La relazione che lega il rischio relativo al coefficiente di regressione (β) è $RR = e^{-\beta}$.

Tutte le analisi (SMR e regressioni di Poisson) sono state realizzate con il pacchetto statistico STATA (9).

Risultati

Risultati del confronto della mortalità della coorte con la popolazione italiana (analisi SMR)

Nel confronto tra il profilo di mortalità della coorte dei gestori delle stazioni di servizio dell'Emilia Romagna e del Lazio con l'esperienza della popolazione generale italiana (controllando per sesso, età e periodo di calendario) si osserva tra i benzinai un deficit della mortalità complessiva (Tabella 7a) dovuto ad un numero inferiore all'atteso di morti per malattie cardiovascolari (sia cardiopatie ischemiche che disturbi circolatori dell'encefalo), di morti per malattie dell'apparato respiratorio e di decessi per malattie dell'apparato digerente (cirrosi inclusa). C'è un incremento statisticamente significativo di malattie del neurone motore (sclerosi laterale amiotrofica, in particolare), basato su 5 osservati contro 1.9 attesi.

Tabella 7a. Mortalità per grandi gruppi di cause nella coorte *pooled* (uomini e donne; standard popolazione italiana)

Cause di morte	ICD IX	Osservati	Attesi	SMR	IC	95%
Malattie Infettive	0001-1399	4	6	0.7	0.25	1.79
Tumori maligni	1400-2089	366	404.4	0.9	0.82	1.00
Tumori di natura non specificata	2390-2399	4	4.5	0.9	0.33	2.36
Diabete	2500-2509	19	30.4	0.6	0.40	0.98
Malattie del sangue	2800-2899	5	3.1	1.6	0.08	4.06
Malattie Sistema Nervoso	3200-3599	14	18.1	0.8	0.46	1.31
Malattie dei neuroni motori	3350-3359	5	1.9	2.6	1.10	6.37
Malattie Cardiovascolari	3900-4599	339	447.3	0.8	0.68	0.84
Cardiopatie ischemiche	4100-4149	154	179.2	0.9	0.73	1.01
Disturbi circolatori encefalo	4300-4389	65	119.7	0.5	0.43	0.69
Malattie Apparato Respiratorio	4600-5199	42	75.1	0.6	0.41	0.76
Bronchite, enfisema, asma	4900-4939	19	44.1	0.4	0.27	0.68
Malattie Apparato Digerente	5200-5799	50	82.7	0.6	0.46	0.80
Cirrosi	5710-5719	25	56.1	0.4	0.30	0.66
Malattie Apparato Genito-Urinario	5800-6299	7	14.5	0.5	0.23	1.02
Cause Maldefinite	7800-7998	6	10	0.6	0.27	1.33
Cause Ignoto	7999-7999	6	3.8	1.6	0.71	3.53
Cause Violente	8000-9999	76	58.5	1.3	1.04	1.63
Altre cause	miscellanea*	6	-	-	-	-
Totale	0001-9999	944	1169.7	0.8	0.76	0.86

* Tra i decessi osservati figuravano altre 6 cause di morte oltre a quelle specificate, ciascuna con unico caso, nelle seguenti categorie nosologiche (IX ICD): 2100-2389; 2790-2799; 2900-3199; 7070; 7200; 2554.

La mortalità per tumori maligni totali e per le specifiche neoplasie considerate è analoga all'attesa (Tabella 7b).

Tabella 7b. Mortalità per tumori maligni nella coorte *pooled* (uomini e donne; standard popolazione italiana)

Cause di morte	ICD IX	Osservati	Attesi	SMR	IC	95%
Labbra, cavità orale e faringe	1400-1499	6	12.6	0.5	0.21	1.06
Apparato Digerente	1500-1599	118	137.9	0.9	0.71	1.02
Esofago	1500-1509	10	9.0	1.1	0.60	2.06
Stomaco	1510-1519	37	37.8	1.0	0.71	1.35
Intestino e retto	1520-1548	33	34.0	1.0	0.69	1.37
Fegato e dotti intraepatici	1550-1552	14	27.0	0.5	0.31	0.88
Pancreas	1570-1579	16	16.2	1.0	0.61	1.61
Apparato Respiratorio	1600-1659	127	138.9	0.9	0.77	1.09
Laringe	1610-1619	6	11.6	0.5	0.23	1.15
Trachea, bronchi e polmoni	1620-1629	118	122.8	1.0	0.80	1.15
Melanoma cutaneo	1720-1729	3	2.9	1.0	0.34	3.24
Mammella	1740-1759	3	7.8	0.4	0.12	1.20
Organi Genito-Urinari	1790-1899	54	51.4	1.1	0.80	1.37
Vescica	1880-1889	13	17.3	0.8	0.44	1.30
Rene	1890-1899	9	8.8	1.0	0.53	1.97
Sistema nervoso	1900-1929	14	9.3	1.5	0.89	2.54
Encefalo	1910-1919	12	8.7	1.4	0.79	2.44
Sede maldefinita	1950-1958	4	2.5	1.6	0.61	4.32
Sede non specificata	1990-1999	13	10.8	1.2	0.70	2.07
Sistema linfoemopoietico	2000-2089	21	25.3	0.8	0.54	1.27
Linfomi Hodgkin	2010-2019	2	1.7	1.1	0.29	4.58
Linfomi non-Hodgkin	2000-1; 2020-9	9	8.0	1.1	0.59	2.18
Mielomi	2030-2039	2	4.5	0.4	0.11	1.80
Leucemie	2040-2089	8	11.2	0.7	0.36	1.43
Altri tumori maligni	171; 173; 193-194	3	3.6			
Totale Tumori Maligni	1400-2089	366	404.4	0.9	0.82	1.00

Per confrontare i risultati del presente studio con quelli ottenuti nello studio della coorte dei benzinai della Regione Lazio sul periodo 1981-1982 (2), abbiamo analizzato separatamente la mortalità dei gestori delle grandi e delle piccole stazioni di servizio (Tabelle 8a e 8b).

Ai deficit di mortalità per malattie cardiovascolari, respiratorie e dell'apparato digerente contribuiscono entrambi i gruppi.

I gestori delle grandi stazioni di servizio presentano anche un numero di tumori maligni totali inferiore all'atteso (Tabella 8a).

L'eccesso di mortalità per malattie del motoneurone proviene dalla subcoorte dei gestori delle grandi stazioni di servizio (Tabella 8a).

Il numero di decessi osservati per i tumori analizzati e per neoplasie di particolare interesse (leucemie, tumori del rene, tumori dell'apparato digerente e dell'apparato respiratorio) non si discosta in modo statisticamente significativo dall'atteso, né tra i gestori delle piccole stazioni di servizio, né tra quelli delle stazioni più grandi.

Rispetto ai risultati relativi alla sola coorte dei benzinai del Lazio con follow-up di minore durata (2), si confermano i lievi incrementi di mortalità per tumore dell'esofago, tumori del sistema nervoso centrale e linfomi non-Hodgkin tra i gestori delle piccole stazioni, ma le stime non sono statisticamente significative nella coorte *pooled*.

Nella sola coorte del Lazio con follow-up esteso al 1996 (dati non riportati in Tabella) si osservano invece incrementi statisticamente significativi di tumori dell'intestino e retto (17 casi; SMR = 1.7; IC 95% 1.03-2.67), tumore dell'esofago (6 casi; SMR = 2.2; IC 95% 1.00-4.94), tumori dell'encefalo (6 casi; SMR 2.3; IC 95% 1.04-5.17).

Per quanto riguarda i tumori del rene, mentre nessun caso era stato osservato nel primo follow-up dei benzinai del Lazio (2), rileviamo qui un non significativo incremento di mortalità tra i gestori delle piccole stazioni delle due regioni in studio (9 osservati SMR = 1.6; IC 95% 0.8-2.0).

Tabella 8a. Mortalità per grandi gruppi di cause nella coorte *pooled*, per dimensioni dell'impianto (uomini e donne; standard popolazione italiana)

Cause di morte	ICD IX	Grandi					Piccole				
		O	A	SMR	IC	95%	O	A	SMR	IC	95%
Malattie Infettive	0001-1399	0	2.0				4	3.9	1.0	0.38	2.72
Tumori maligni	1400-2089	106	138.7	0.8	0.63	0.92	260	265.6	1.0	0.87	1.11
Tumori di natura non specificata	2390-2399	3	1.6	1.9	0.62	5.97	1	3.0	0.3	0.05	2.40
Diabete	2500-2509	4	9.4	0.4	0.16	1.13	15	20.9	0.7	0.43	1.19
Malattie del sangue	2800-2899	1	1.0	1.0	0.15	7.44	4	2.1	1.9	0.72	5.09
Malattie Sistema Nervoso	3200-3599	7	5.8	1.2	0.57	2.52	7	12.3	0.6	0.27	1.20
Morbo di Parkinson	3320-3329	1	1.3	0.8	0.11	5.52	0	3.3	0.0		
Malattie dei neuroni motori	3350-3359	4	0.7	5.9	2.21	15.68	1	1.2	0.8	0.12	5.88
Malattie Cardiovascolari	3900-4599	98	138.8	0.7	0.58	0.86	241	308.5	0.8	0.69	0.89
Cardiopatie ischemiche	4100-4149	50	59.2	0.8	0.64	1.11	104	120.0	0.9	0.72	1.05
Disturbi circolatori encefalo	4300-4389	18	35.3	0.5	0.32	0.81	47	84.4	0.6	0.42	0.74
Malattie Apparato Respiratorio	4600-5199	13	22.4	0.6	0.34	1.00	29	52.6	0.6	0.38	0.79
Bronchite, enfisema, asma	4900-4939	6	13.1	0.5	0.21	1.02	13	31.0	0.4	0.24	0.72
Malattie Apparato Digerente	5200-5799	13	28.8	0.5	0.26	0.78	37	53.9	0.7	0.50	0.95
Cirrosi	5710-5719	5	20.4	0.2	0.10	0.59	20	35.7	0.6	0.36	0.87
Malattie Apparato Genito-Urinario	5800-6299	1	4.4	0.2	0.03	1.62	6	10.1	0.6	0.27	1.33
Cause Maldefinite	7800-7998	1	2.8	0.4	0.05	2.55	5	7.2	0.7	0.29	1.66
Cause Ignoto	7999-7999	2	1.4	1.5	0.37	5.85	4	2.4	1.7	0.62	4.41
Cause Violente	8000-9999	33	21.8	1.5	1.08	2.13	43	36.7	1.2	0.87	1.58
Altre cause	miscellanea*	0	3.3				6				
Totale	0001-9999	282	383.0	0.7	0.66	0.83	662	786.6	0.8	0.78	0.91

* Tra i decessi osservati figuravano altre 6 cause di morte oltre a quelle specificate, ciascuna con unico caso, nelle seguenti categorie nosologiche (IX ICD): 2100-2389; 2790-2799; 2900-3199; 7070; 7200; 2554

O: casi osservati; A: casi attesi

Tabella 8b. Mortalità per tumori maligni nella coorte *pooled*, per dimensioni dell'impianto (uomini e donne; standard popolazione italiana)

Cause di morte	ICD IX	Grandi					Piccole				
		O	A	SMR	IC	95%	O	A	SMR	IC	95%
Labbra, cavità orale e faringe	1400-1499	2	4.7	0.4	0.11	1.70	4	7.9	0.5	0.19	1.35
Apparato digerente	1500-1599	29	46.6	0.6	0.43	0.90	89	91.3	1.0	0.79	1.20
Esofago	1500-1509	1	3.3	0.3	0.04	2.19	9	5.8	1.6	0.81	3.00
Stomaco	1510-1519	10	12.6	0.8	0.43	1.48	27	25.3	1.1	0.73	1.56
Intestino e retto	1520-1548	9	11.3	0.8	0.41	1.53	24	22.7	1.1	0.71	1.58
Fegato e dotti intraepatici	1550-1552	5	9.3	0.5	0.22	1.29	9	17.7	0.5	0.27	0.98
Pancreas	1570-1579	4	5.6	0.7	0.27	1.91	12	10.6	1.1	0.64	1.99
Apparato respiratorio	1600-1659	38	49.5	0.8	0.56	1.06	89	89.5	1.0	0.81	1.22
Laringe	1610-1619	0	4.2				6	7.4	0.8	0.36	1.80
Trachea, bronchi e polmoni	1620-1629	37	43.7	0.8	0.61	1.17	81	79.1	1.0	0.82	1.27
Melanoma cutaneo	1720-1729	1	1.1	0.9	0.13	6.66	2	1.8	1.1	0.28	4.43
Mammella	1740-1759	3	2.2	1.3	0.43	4.17	0	5.6		.	.
Organi Genito-Urinari	1790-1899	14	16.2	0.9	0.51	1.46	40	35.2	1.1	0.83	1.55
Prostata	1850-1859	9	6	1.5	0.78	2.89	18	14	1.3	0.81	2.04
Vescica	1880-1889	5	5.6	0.9	0.37	2.15	8	11.7	0.7	0.34	1.37
Rene	1890-1899	0	3.1				9	5.7	1.6	0.82	3.03
Sistema nervoso	1900-1929	4	3.5	1.2	0.44	3.09	10	5.9	1.7	0.92	3.18
Encefalo	1910-1919	3	3.2	0.9	0.30	2.88	9	5.4	1.7	0.86	3.18
Sede maldefinita	1950-1958	1	0.8	1.2	0.17	8.75	3	1.7	1.8	0.59	5.63
Sede non specificata	1990-1999	6	3.7	1.6	0.72	3.58	7	7.1	1.0	0.47	2.07
Sistema linfoemopoietico	2000-2089	8	8.7	0.9	0.46	1.83	13	16.6	0.8	0.45	1.35
Non-Hodgkin	2000-8; 2020-9	1	2.8	0.4	0.05	2.53	8	5.1	1.6	0.78	3.12
Hodgkin	2010-2019	1	0.7	1.5	0.22	10.94	1	1.1	0.9	0.13	6.48
Mielomi	2030-2039	2	1.5	1.3	0.34	5.39	0	3		.	.
Leucemie	2040-2089	4	3.8	1.1	0.40	2.80	4	7.4	0.5	0.20	1.44
Altri tumori maligni	171; 173; 194	0	0.8				3	1.5			
Totale Tumori Maligni	1400-2089	106	138.7	0.8	0.63	0.92	260	265.6	1	0.87	1.11

O: casi osservati; A: casi attesi

Risultati dell'analisi della mortalità in relazione a indicatori di carico di lavoro (analisi di Poisson - confronto interno alla coorte)

Nel confronto interno alla coorte per tipologia della stazione (Tabella 9), i gestori degli impianti di piccole dimensioni mostrano un rischio di mortalità per tutte le cause più elevato dei gestori degli impianti più grandi, mentre non si rilevano differenze nella mortalità per tumori maligni totali, tumori del polmone, tumori dell'apparato genito-urinario, tumori del sistema linfoemopoietico o tumori del sistema nervoso.

Tabella 9. Rischio di mortalità in funzione delle dimensioni della stazione di servizio (modelli di regressione di Poisson, stime corrette per età)

Causa di morte	Grandi stazioni		Piccole stazioni				
	Oss	RR	Oss	RR	IC	95%	p
Tutte le cause	242	1	478	1.17	1.01	1.36	0.034
Tumori maligni	96	1	212	1.23	0.97	1.55	0.095
Tumori polmonari	36	1	75	1.17	0.79	1.74	0.433
Tumori apparato genito-urinario	14	1	35	1.16	0.62	2.17	0.636
Tumori sistema linfoemopoietico	8	1	12	0.75	0.30	1.84	0.525
Tumori sistema nervoso	4	1	9	1.35	0.41	4.43	0.626

Oss = numero di decessi inclusi nel modello; **RR** = Rischio Relativo; **ES** = Errore Standard del rischio relativo; **p** = livello di significatività al 95% (statistica χ^2)

Nel confronto interno alla coorte in funzione del carburante erogato annualmente (Tabella 10), non si rilevano differenze nella mortalità per alcuno dei gruppi di cause considerate.

Tabella 10. Rischio di mortalità per tutte le cause in funzione del venduto medio annuale di benzina per addetto (modelli di regressione di Poisson, stime corrette per età)

Causa di morte	≤ 152750 litri		> 152750 litri				
	Oss	RR	Oss	RR	IC	95%	p
Tutte le cause	346	1	318	0.97	0.84	1.11	0.630
Tumori maligni	143	1	141	0.98	0.78	1.23	0.847
Tumori polmonari	54	1	47	0.85	0.57	1.25	0.403
Tumori apparato genito-urinario	25	1	21	1.00	0.55	1.79	0.991
Tumori sistema linfoemopoietico	10	1	9	0.95	0.38	2.36	0.915
Tumori sistema nervoso	6	1	6	0.98	0.31	3.08	0.978

Venduto per addetto = cut-off al 50° percentile della distribuzione overall; **Oss** = numero di decessi inclusi nel modello; **RR** = Rischio Relativo; **ES** = Errore Standard del rischio relativo; **p** = livello di significatività al 95% (statistica χ^2)

Discussione e conclusioni

Il possibile rischio cancerogeno associato all'esposizione a basse dosi di derivati del petrolio e, in particolare, a vapori di benzina contenenti benzene è un argomento rilevante da un punto di vista di sanità pubblica (4).

Indagini di valutazione dell'esposizione a benzene tra i benzinai condotte in diversi Paesi europei dal 1980 alla metà degli anni '90 hanno misurato concentrazioni in zona respiratoria generalmente inferiori ai 3 mg/m³ ovvero <1 ppm (10) (*Time Weighted Average*, TWA).

In una serie di indagini da noi condotte, pur a questi bassi livelli di esposizione, abbiamo osservato incrementi di alcuni indicatori di danno genotossico (11-13). Non è però completamente chiaro se tali incrementi si traducano in danni sanitari evidenziabili clinicamente o rilevabili attraverso le analisi dei rischi di mortalità per causa.

In un primo studio della mortalità dei gestori delle stazioni di servizio della regione Lazio (2) avevamo osservato sull'insieme della coorte (2665 persone, seguite dal 1981 al 1992) meno decessi totali e meno tumori maligni rispetto alla popolazione generale del Lazio. Non si

registravano incrementi della mortalità per leucemie, una neoplasia d'interesse *a priori* per la sua associazione con l'esposizione a benzene e a benzina. Non osservavamo nessun caso di tumore del rene. Tuttavia, in un'analisi ristretta ai gestori delle piccole stazioni, caratterizzate da maggiori quantità relative di carburante venduto per addetto, rilevavamo lievi incrementi della mortalità per tumori dell'esofago, tumori del sistema nervoso centrale e linfomi non-Hodgkin.

Per approfondire i risultati di questa indagine, abbiamo ritenuto utile replicare lo studio in Emilia Romagna, aggiornare il follow-up dei benzinai del Lazio ed effettuare un'analisi combinata della mortalità delle due coorti.

Nell'analisi SMR qui condotta si osservano ancora lievi incrementi di mortalità per tumore dell'esofago, tumori del sistema nervoso centrale e linfomi non-Hodgkin tra i gestori delle piccole stazioni, ma le stime non sono statisticamente significative sull'insieme delle due coorti.

Per quanto riguarda i tumori del rene, mentre nessun caso era stato osservato nel primo follow-up dei benzinai del Lazio (2), qui abbiamo osservato un non significativo incremento di mortalità tra i gestori delle piccole stazioni delle due regioni (9 osservati; SMR = 1.6; IC 95% 0.8-2.0).

Tra i gestori delle piccole stazioni abbiamo documentato un incremento della mortalità per tutte le cause nel confronto con la mortalità dei gestori delle stazioni più grandi, ma non differenze nel rischio di mortalità per tutti i tumori maligni, le neoplasie del polmone, dell'apparato genito-urinario, del sistema linfoemopoietico e del sistema nervoso.

Era del tutto negativa anche l'analisi del rischio di mortalità per tutti i gruppi di cause sopra menzionate in funzione del venduto medio annuale di benzina (che abbiamo considerato un *proxy* dell'intensità di esposizione a vapori di carburante).

A causa del piccolo numero di decessi osservati, non era possibile estendere questo tipo di analisi ad altre categorie nosologiche per le quali avevamo osservato incrementi – per la maggior parte non statisticamente significativi – nell'analisi SMR *overall* o stratificata per dimensione della stazione di servizio (ad esempio le malattie del motoneurone, i tumori dell'encefalo, i tumori del rene, i linfomi non-Hodgkin).

Tra i principali limiti di questo studio dobbiamo menzionare la mancanza d'informazioni sulla durata d'impiego complessiva dei soggetti in studio (avevamo la sola anzianità lavorativa al 1980). Quest'ultima informazione ci avrebbe permesso di calcolare almeno un indicatore cumulativo di esposizione a vapori di carburante. Abbiamo tentato di recuperare questo dato attraverso la consultazione delle Camere di Commercio, ma le informazioni disponibili sulla data di cessazione si sono dimostrate poco accurate.

In secondo luogo, nonostante l'estensione del periodo di follow-up, la durata media d'osservazione non è ancora soddisfacente per molte malattie a lunga latenza e gli anni-persona per molte cause d'interesse sono ancora insufficienti a garantire un'adeguata potenza statistica.

A ciò si potrà ovviare aggiornando in futuro il follow-up delle due coorti regionali.

Bibliografia

1. Lagorio S, Forastiere F, Iavarone I, Vanacore N, Fuselli S, Carere A. Exposure assessment in a historical cohort of filling station attendants. *Int J Epidemiol* 1993; 22 (6) (suppl.2): s51-s56.
2. Lagorio S, Forastiere F, Iavarone I, Rapiti E, Vanacore N, Perucci CA, Carere A. Mortality of filling station attendants. *Scand J Work Environ Health* 1994; 20: 331-338.
3. Lagorio S, Forastiere F, Michelozzi P, Perucci CA, Altavista P, Costa G, Vigotti MA. Accertamento delle cause di morte in studi di follow-up: confronto di procedure utilizzabili in Italia. *Epidemiol Prev* 1987; 31: 57-61.

4. Istituto Nazionale di Statistica (ISTAT). *Classificazioni delle malattie, traumatismi e cause di morte*. 9^a revisione 1975. vol. 1 e 2. Roma: ISTAT; 1979. (Metodi e Norme, Serie C, n. 10).
5. Carere A, Crebelli R, Zijno A, Leopardi P, Marcon F, Andreoli C, Fuselli S, Iavarone I, Lagorio S, Turrio Baldassarri L, Antoccia A, Cimini D, Tanzarella C, Degrassi F, Fiore M, Palitti F, Sgura A, Forastiere F, Rapiti E, Biocca M, Pasquini A. Assessment of benzene exposure, early genetic effects, and cancer mortality in Italian filling station attendants. In: Carere A, Crebelli R (Ed.). *Biomonitoring of human populations exposed to petroleum fuels with special consideration of the role of benzene as a genotoxic component. Report of the EC Environmental programme. Project EV5V-CT92-0211*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1997. (Serie Relazioni 97/4). p. 6-40.
6. Lagorio S, Fuselli S, Iavarone I, Vanacore N, Carere A. Esposizione a benzene tra gli addetti alle stazioni di rifornimento e composizione della benzina. *Med Lav* 1994; 85: 412-421.
7. Lagorio S, Iavarone I, Iacovella N, Proietto AR, Fuselli S, Turrio Baldassarri L, Carere A. Variability of benzene exposure among filling station attendants. *Occup Hyg* 1997; 4 (1): 15-30.
8. Lagorio S, Crebelli R, Ricciarello R, Conti L, Iavarone I, Zona A, Ghittori S, Carere A. Methodological issues in biomonitoring of low level exposure to benzene. *Occup Med* 1998; 48 (8): 497-504.
9. StataCorp. *Stata Statistical Software. Release 6.0*. College Station, TX: Stata Corporation, 1999.
10. Lynge E, Andersen A, Nilsson R, Barlow L, Pukkala E, Nordlinder R, Boffetta P, Grandjean P, Heikkila P, Hörte L-G, Jakobsson R, IUndberg I, Moen B, Partanen T, Riise T. Risk of cancer and exposure to gasoline vapors. *Am J Epidemiol* 1997; 145:449-459.
11. Lagorio S, Tagesson C, Forastiere F, Iavarone I, Axelson O, Carere A. Exposure to benzene and urinary concentrations of 8-hydroxydeoxyguanosine, a biological marker of oxidative damage to DNA. *Occup Environ Med* 1994; 51: 739-743.
12. Carere A, Antoccia A, Crebelli R, Degrassi F, Isacchi G, Iavarone I, Lagorio S, Leopardi P, Marcon F, Palitti F, Tanzarella C, Zijno A. Genetic effects of petroleum fuels: cytogenetic monitoring of gasoline station attendants. *Mut Res* 1995; 332: 17-26.
13. Carere A, Antoccia A, Cimini D, Crebelli R, Degrassi F, Leopardi P, Marcon F, Sgura A, Tanzarella C, Zijno A. Genetic effects of petroleum fuels. II. Analysis of chromosome loss and hyperploidy in peripheral lymphocytes of gasoline station attendants by fluorescence in situ hybridization techniques. *Environ Molecular Mutagenesis* 1998; 32: 130-138.

STUDIO DEGLI EFFETTI DELL'INQUINAMENTO ATMOSFERICO SULLA FUNZIONALITÀ CARDIACA E RESPIRATORIA IN INDIVIDUI SUSCETTIBILI

Susanna Lagorio (a), Francesco Forastiere (b), Riccardo Pistelli (c), Ivano Iavarone (d), Giorgio Cattani (d), Giordano Stacchini (d), Giovanni Ziemacki (d), Achille Marconi (d), Paola Michelozzi (b), Valeria Fano (b), Alessia Trivini (b), Raffaele Antonelli Incalzi (c), Salvatore Basso (c), Raffaella Tiziana Benedetto (c), Anna Maria Della Corte (c), Leonello Fuso (c), Carmela Maiolo (c), Sandra Sammarro (c), Maria Serra (c), Salvatore Spadaro (c), Lorenzo Maria Tramaglino (c), Bart Ostro (e)

(a) *Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Epidemiologia, ASL RME, Roma*

(c) *Dipartimento di Pneumologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*

(d) *Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(e) *California Environmental Protection Agency, Berkeley, CA, USA*

Introduzione

Nei grandi centri urbani di molti paesi industrializzati di quasi tutti i continenti, in modo ripetuto e consistente, è stata osservata un'associazione tra fluttuazioni giornaliere della mortalità per cause cardiorespiratorie e concentrazioni atmosferiche di materiale particolato, misurato come materiale particolato di granulometria inferiore ai 10 μm (PM_{10}) (1) o ai 2.5 μm ($\text{PM}_{2.5}$) (2).

Questi studi costituiscono solo parte dell'evidenza scientifica a favore di eccessi di rischio per la salute legati all'esposizione a concentrazioni di particolato atmosferico anche al di sotto dei 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ di PM_{10} . Altri elementi che contribuiscono all'evidenza sono, ad esempio, i risultati di quattro studi prospettici americani (3-6) e le serie temporali relative ai ricoveri ospedalieri per malattie respiratorie e cardiovascolari (7-8).

Gli Stati Uniti hanno adottato standard di qualità dell'aria più restrittivi che in passato (9) e l'Organizzazione Mondiale della Sanità nella sua revisione delle linee guida per la qualità dell'aria in Europa non propone neppure più delle concentrazioni accettabili di materiale particolato in atmosfera (10).

Tuttavia, il significato delle relazioni osservate nell'ambito delle analisi di serie temporali, presenta ancora alcuni problemi interpretativi (11-12).

Non è ancora ben chiaro, ad esempio, quali siano i gruppi più suscettibili a tale effetto "letale" dell'inquinamento, né quali fattori di rischio (a livello di popolazione e a livello individuale) modifichino la relazione tra inquinamento e mortalità.

Da questo punto di vista, è stata evidenziata l'importanza di pregresse sfavorevoli condizioni di salute (13), in particolare per i portatori di broncopneumopatie croniche (14-16), coronaropatie, malattie ischemiche del miocardio (15) e asma bronchiale (15). Il sesso, l'etnia e lo stato socioeconomico non sembrano, invece, forti modificatori dell'effetto del materiale particolato atmosferico sulla mortalità giornaliera (17).

Non sono chiari, inoltre, i meccanismi d'azione attraverso cui l'esposizione acuta a livelli crescenti di materiale particolato atmosferico determina, in individui già affetti da forme più o

meno gravi di patologia respiratoria o cardiaca, una caduta fatale dei meccanismi fisiologici di compensazione.

Per quanto riguarda il ruolo dell'inquinamento atmosferico sull'esacerbazione del decorso di varie malattie dell'apparato respiratorio (anche di tipo infettivo) e sulla precipitazione di attacchi d'asma, è probabile che l'effetto sia mediato da meccanismi multipli, di tipo indiretto e diretto (18-19). L'esposizione ad inquinanti atmosferici potrebbe modulare gli effetti dell'esposizione ad allergeni aerodispersi o ad agenti biologici patogeni. Vi sono evidenze empiriche e supporto sperimentale, inoltre, per effetti dannosi sulle cellule epiteliali della mucosa respiratoria (aumentata permeabilità e riduzione dell'attività mucociliare), per danni di tipo ossidativo e per effetti tossici secondari mediati da citochine pro-infiammatorie. Per una rassegna dei meccanismi ambientali di esacerbazione della BroncoPneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO) si rimanda al lavoro di McNee e Donaldson (20).

Nello sviluppo di danni cellulari di tipo ossidativo e nell'insorgere di sintesi biochimiche di mediatori chimici pro-infiammatori, potrebbero aver un ruolo i metalli di transizione quali vanadio, rame, ferro, platino e manganese (21) e/o le particelle ultrafini (19, 22). Le particelle ultrafini di biossido di titanio o di *carbon black* spesso hanno mostrato effetti biologici più intensi di masse equivalenti di particelle di diametro maggiore (21). In un *panel* di asmatici, il numero giornaliero di particelle ultrafini prediceva decrementi nel Picco Espiratorio di Flusso (PEF) in modo più efficace della concentrazione di PM₁₀ (23).

Nel loro insieme, gli studi tossicologici di inalazione di particolato concentrato in modelli sperimentali di malattie respiratorie (quali i ratti bronchitici e con vasculite cardiopolmonare da monocrotalina) e di patologia ipertensiva (ratti con ipertensione indotta o spontanea) hanno prodotto risultati in qualche modo discordanti; è possibile che ciò dipenda dalle complesse interazioni tra sistema cardiaco e respiratorio nell'esacerbare le risposte all'esposizione a particolato aerodisperso (24).

L'eccesso del rischio di mortalità per cause cardiovascolari in relazione all'esposizione a particolato atmosferico è più difficile da spiegare in termini di possibili meccanismi d'azione di quanto non sia l'analogo eccesso per cause di morte respiratorie. Allo stesso tempo, data l'alta prevalenza di patologie cardiovascolari nei paesi industrializzati, in termini assoluti il maggior numero di decessi o di ricoveri ospedalieri attribuibili all'esposizione si conta proprio tra queste cause (25-26).

In uno studio *panel* la saturazione in ossigeno dell'emoglobina non risultava associata ai livelli giornalieri di PM₁₀ e, dunque, non sembrerebbero essere in gioco fenomeni di ipossia (27).

D'altra parte in diversi studi di serie temporali di mortalità e di ricoveri per cause cardiovascolari (28-33), le fluttuazioni giornaliere nelle concentrazioni di CO sono risultati predittori importanti e indipendenti dei tassi di mortalità e di ospedalizzazione anche a livelli di esposizione compatibili con gli standard di qualità dell'aria in vigore.

McGrath (34) ha suggerito che in pazienti con preesistenti patologie cardiovascolari, nei quali si osserva tipicamente una netta diminuzione della concentrazione di mioglobina nel miocardio (una proteina che ha il compito di facilitare il trasporto intracellulare di ossigeno nei miociti cardiaci e che, come l'emoglobina, si lega al CO formando carbossimioglobina), anche livelli relativamente modesti CO nell'aria inspirata potrebbero provocare fenomeni di ipossia locale e spiegare così le associazioni osservate con i tassi di ricovero o di mortalità per cause cardiovascolari.

Seaton *et al.* nel 1995 (35) hanno posto l'accento sulle particelle ultrafini, di diametro aerodinamico inferiore al micrometro, che numericamente – non in peso – costituiscono una frazione importante del materiale particolare urbano e *indoor*. Tali particelle, anche a concentrazioni di materiale particolare totale o di PM₁₀ nell'ordine delle decine o centinaia di

$\mu\text{g}/\text{m}^3$, sarebbero in grado di provocare fenomeni di infiammazione alveolare che, a loro volta, indurrebbero modificazioni acute della coagulabilità del sangue e rilascio di mediatori in grado di indurre esacerbazioni di patologia respiratoria in soggetti suscettibili.

Sono state osservate viscosità plasmatiche al di sopra dei livelli normali in un gruppo di partecipanti allo studio MONICA di Augsburg (Germania) durante un episodio di elevato inquinamento atmosferico (valori medi di SO_2 e PST = $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e $98 \mu\text{g}/\text{m}^3$, rispettivamente) rispetto al periodo precedente e posteriore all'episodio (36).

Un'altra ipotesi attualmente in corso di studio riguarda la possibilità che gli effetti cardiopolmonari dell'esposizione a particolato aerodisperso (inclusa la mortalità per cause cardiache e respiratorie) siano mediati dal sistema nervoso autonomo. Alcune alterazioni della frequenza e della variabilità del battito cardiaco, della pressione sanguigna e della viscosità ematica sono associate ad incrementi misurabili del rischio di morte per arresto cardiaco. Le numerose citochine e i radicali ossidrilici liberi di origine macrofagica liberati nel corso dei processi infiammatori a livello polmonare potrebbero spiegare, con l'innesco di fenomeni biologici a cascata, gli effetti drammatici di esposizioni relativamente modeste a particolato aerodisperso.

Stone e Godleski (37) hanno suggerito che alla base dell'associazione tra esposizione a particolato e mortalità per cause cardiache vi sia una combinazione di meccanismi di tipo infiammatorio (a livello polmonare e sistemico) e di alterazioni dell'equilibrio tra sistema simpatico e parasimpatico nella regolazione del battito cardiaco da parte del sistema nervoso autonomo. Questa ipotesi prevede la possibilità di alterazioni antitetiche del ritmo cardiaco (aumento o diminuzione della fisiologica variabilità del battito, tachiaritmie o bradicardie), a seconda del prevalere di una delle vie patogenetiche rispetto alle altre. Tutte le alterazioni suggerite come eventi patogenetici intermedi sono fattori prognostici negativi per la sopravvivenza nei cardiopatici e negli anziani.

L'evidenza sperimentale che sostiene tale ipotesi (38-40) ha trovato riscontro nei risultati di alcuni recenti studi epidemiologici.

Un aumento della frequenza cardiaca associato ai livelli di particolato atmosferico è stato osservato in due studi panel (27, 41) e in una nuova analisi della coorte MONICA di Augsburg (42). È anche stata osservata un'associazione tra diminuzione della variabilità del battito cardiaco e livelli ambientali di PM_{10} (41) o di $\text{PM}_{2.5}$ (43-44). In un follow-up di tre anni su portatori di defibrillatore cardiaco, Peters *et al.* (45) hanno osservato un incremento dell'incidenza di aritmie gravi nei giorni a più elevato inquinamento atmosferico in termini di concentrazioni atmosferiche di NO_2 , CO e $\text{PM}_{2.5}$. Infine, un recente studio *case-crossover* su residenti nell'area metropolitana di Boston colpiti da infarto del miocardio nel 1995-96, ha suggerito che elevate concentrazioni di particelle fini ($\text{PM}_{2.5}$) possano temporaneamente innalzare il rischio di infarto entro poche ore o un giorno dopo l'esposizione (46).

Noi abbiamo realizzato uno studio epidemiologico di tipo *panel*, finalizzato a valutare l'eventuale associazione tra intensità di esposizione a materiale particolato atmosferico (PM_{10} e $\text{PM}_{2.5}$) e diversi tipi di alterazioni a livello degli apparati cardiaco e respiratorio (funzionalità respiratoria, saturazione di ossigeno dell'emoglobina, frequenza e variabilità del battito cardiaco) in persone affette da BPCO, patologia ischemica del miocardio (Infarto Miocardico Acuto, IMA) e asma bronchiale.

Metodi

Popolazione in studio

I partecipanti ai tre studi sono stati selezionati tra i pazienti ambulatoriali dei dipartimenti di Pneumologia e Cardiologia dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma, inclusi in programmi di follow-up di routine.

Il monitoraggio ha interessato 29 soggetti, non fumatori, residenti a Roma, rispondenti ad un certo numero di criteri clinici di eleggibilità, specifici per ciascuna categoria nosologica.

Dei 29 soggetti, 11 erano affetti da BPCO (7 uomini e 4 donne), 7 avevano avuto un infarto del miocardio (6 uomini e 1 donna) e 11 erano asmatici (6 uomini e 5 donne).

Per il *panel* dei BPCO erano eleggibili soggetti tra 50 e 80 anni di età, con un indice di Tiffenau (FEV_1/FVC) $<60\%$, pressione parziale di ossigeno (PaO_2) nel sangue arterioso di 60-70 mmHg, valori normali di carbossiemoglobina (COHb), equilibrio acido-base normale, senza necessità di ossigenoterapia o di presidi ventilatori artificiali e assenza di elettrostimolatori cardiaci o concomitanti malattie ischemiche di cuore, aritmie cardiache, diabete o morbo di Parkinson. Era ammesso l'uso occasionale di stimolanti β -adrenergici.

Per il *panel* degli IMA erano eleggibili soggetti tra 40 e 64 anni, con angina stabile o pregresso infarto del miocardio (risalente ad almeno un anno prima dell'ingresso nello studio), che non facessero uso di calcio-antagonisti, senza impianto di elettrostimolatori cardiaci, senza concomitanti BPCO, fibrillazione atriale, diabete mellito, morbo di Parkinson, alcolismo, uso di psicofarmaci.

Erano eleggibili per il *panel* sull'asma, soggetti di età compresa tra 18 e 64 anni, positivi al test di reattività bronchiale con soluzione salina ipertonica, con malattia in stadio *mild intermittent* (47), in terapia solo con farmaci β -mimetici al bisogno.

Valutazione dell'esposizione ad inquinanti atmosferici

Il $PM_{2.5}$ non viene ancora misurato nelle stazioni italiane di monitoraggio della qualità dell'aria. Pertanto, le concentrazioni ambientali di materiale particolato utilizzate in questo studio sono state rilevate *ad hoc*, mediante campionatori dicotomi Andersen / GMW's $PM_{10/2.5}$, posizionati presso l'Istituto Superiore di Sanità e il parco di Villa Ada.

Durante ciascuna campagna mensile di monitoraggio (24 maggio-25 giugno 1999; 22 novembre-22 dicembre 1999) sono stati effettuati prelievi quotidiani di 24 ore. Durante la campagna estiva, l'orario di campionamento andava dalle 10 del mattino alle 10 del giorno successivo. Nella campagna invernale, invece, l'orario di campionamento andava dalle ore 15 alle 15 giorno successivo.

Le polveri depositate sui due filtri sequenziali dei rilevatori sono stati analizzate gravimetricamente per la determinazione della concentrazione media giornaliera di $PM_{2.5}$ (frazione *fine*) e di $PM_{10-2.5}$ (frazione *coarse*). Le concentrazioni di PM_{10} sono state calcolate come somma delle frazioni *fine* e *coarse* campionate sequenzialmente.

Ai fini dell'analisi statistica, è stata utilizzata la media delle concentrazioni di $PM_{10-2.5}$ e di $PM_{2.5}$ rilevate (o calcolate nel caso del PM_{10}) in ciascun giorno di monitoraggio nelle due postazioni. La serie è praticamente completa, con due soli dati mancanti (21 e 22 novembre 1999).

Nei campioni di $PM_{10-2.5}$ e di $PM_{2.5}$, è stato determinato il contenuto dei seguenti metalli: cadmio (Cd), cromo (Cr), ferro (Fe), nichel (Ni), piombo (Pb), platino (Pt), vanadio (V), e zinco (Zn).

Le analisi dei metalli sono state effettuate mediante spettrometria dopo mineralizzazione dei campioni con 1 ml di acqua regia ($HNO_3 - HCl$ / 1:3) mediante forno a microonde con inserti di

quarzo. La particolare tecnica analitica adottata per ciascuno dei metalli determinati viene presentata nella Tabella 1.

Tabella 1. Tecnica analitica utilizzata per la determinazione dei diversi metalli nei campioni di materiale particellare

Elemento	Tecnica analitica	Note
Cadmio	ETAAS	Modificante: $Mg(NO_3)_2$ e $NH_4H_2PO_4$
Cromo	ETAAS	
Ferro	FAAS	Modificante: $Mg(NO_3)_2$ e $NH_4H_2PO_4$ Standard interno: Ir. Correzione interferenze ossidi di HF
Piombo	ETAAS	
Platino	ICPMS	
Nichel	ETAAS	
Vanadio	ETAAS	
Zinco	ICPAES	

ETAAS = spettrometria ad assorbimento atomico con elettroatomizzazione; **FAAS** = spettrometria ad assorbimento atomico con atomizzazione a fiamma aria – acetilene; **ICPMS** = spettrometria ad emissione atomica con rivelatore di massa; **ICPAES** = spettrometria ottica ad emissione atomica a plasma.

Ai fini dell'analisi statistica, sono state utilizzate le concentrazioni dei metalli in studio, ottenute rapportando la quantità di analita al volume d'aria prelevato durante il campionamento del materiale particellare (frazione *fine* e frazione *coarse*) in un dato giorno.

L'Assessorato all'Ambiente della Regione Lazio ci ha fornito le concentrazioni medie giornaliere di monossido di carbonio (CO), biossido di azoto (NO₂) e ozono (O₃) registrate dalle stazioni di monitoraggio dell'inquinamento atmosferico di Roma.

Nell'analisi statistica è stata utilizzata la media delle concentrazioni giornaliere di CO e NO₂ registrate dalle centraline di Magna Grecia, Villa Ada, Preneste, Fermi e Libia e la media delle concentrazioni giornaliere di O₃ registrate dalle centraline di Villa Ada e Preneste.

La serie è completa per quanto riguarda le concentrazioni medie giornaliere di NO₂, mentre per CO e O₃ mancano i dati del 6 dicembre 1999.

La stazione di monitoraggio climatico del Collegio Romano (Ufficio Centrale di Ecologia Agricola, UCEA) ha fornito i valori giornalieri di temperatura e pressione atmosferica per l'intero periodo di studio (manca un dato relativo al 21 novembre 1999).

A scopo di validazione dell'uso dei livelli ambientali di materiale particellare per la stima dell'esposizione personale, sono state misurate le concentrazioni *indoor* di PM_{2.5} nelle abitazioni di tre partecipanti allo studio. La doppia serie di dati è completa per quanto concerne la *survey* estiva dal 28 maggio 1999 al 25 giugno 1999 e, per la *survey* invernale dal 23 novembre 1999 al 22 dicembre 1999. I campionamenti dell'aria *indoor*, della durata di 24 ore, sono stati effettuati mediante *Personal Exposure Monitors* (PEM - SKC Inc.). Anche nei campioni di PM_{2.5} *indoor* è stato determinato il contenuto di Cd, Cr, Fe, Ni, Pb, Pt, V e Zn. Ai fini dell'analisi statistica sono state utilizzate le medie delle concentrazioni giornaliere di PM_{2.5} misurate nelle case dei 3 partecipanti all'indagine e le medie delle concentrazioni dei singoli metalli calcolate a partire dalle quantità rilevate nei singoli campioni di particolato *fine indoor*.

Indagini cliniche

Durante ciascuna campagna di monitoraggio, i partecipanti ai tre *panel* sono stati visitati ad intervalli di tre giorni da un *team* di medici al proprio domicilio (*panel* di BPCO e IMA) o presso l'ambulatorio di pneumologia dell'Università Cattolica di Roma (*panel* di asmatici).

In totale, sono state effettuate 176 visite domiciliari per i soggetti inclusi nel *panel* BPCO (in media 16 per soggetto), 175 per i partecipanti al *panel* IMA (in media 25 a persona) e 108 visite ambulatoriali per i casi appartenenti al *panel* degli asmatici (10 per soggetto in media).

I casi di BPCO e IMA sono stati ripetutamente sottoposti alle seguenti indagini cliniche:

- misura di diversi indici di funzionalità respiratoria (FVC¹, FEV₁² e FEF₂₅₋₇₅³) mediante spirometria (spirometro portatile, Biomedin);
- misura della pressione sanguigna sistolica e diastolica;
- misura delle concentrazioni di CO nell'esperto con analizzatore portatile Bedfont (UK);
- misura della saturazione arteriosa di ossigeno (HbO₂) e misura della frequenza cardiaca mediante pulsossimetria notturna (12 ore) (Nonin, USA);
- registrazione Holter di 24 h dell'elettrocardiogramma (ECG).

Le analisi cliniche sostenute dal *panel* degli asmatici consistevano in:

- spirometria (spirometro Stead-Wells, Biomedin), analizzate in termini di FVC, FEV₁, FEV₁/FVC⁴ e FEF₂₅₋₇₅;
- misure della concentrazione di monossido d'azoto (NO) nell'aria espirata, impiegato come indicatore di infiammazione bronchiale. Per la misura del NO è stato utilizzato l'analizzatore della Sievers, modello 280 (Sievers Instruments, USA).

Analisi statistiche

Le correlazioni tra concentrazioni giornaliere dei vari inquinanti in studio, come pure quelle tra PM_{2.5} *indoor* e *outdoor*, sono state valutate mediante test non parametrici sulle variabili in scala originale (coefficienti di correlazione di Spearman).

I confronti tra le composizioni proporzionali in metalli delle frazioni *fine* e *coarse* del particolato *outdoor* e tra PM 2.5 *indoor* e *outdoor*, sono state realizzate mediante test per ranghi di Kruskal Wallis.

Le relazioni tra concentrazioni *outdoor* di inquinanti atmosferici (PM₁₀, PM_{2.5}, PM_{10-2.5}, NO₂, CO e O₃) e le diverse variabili di effetto (sia con i valori in scala originale, sia trasformandoli opportunamente per ottemperare al requisito di normalità della distribuzione) sono state analizzate mediante modelli di regressione *cross-sectional* ad effetti fissi per serie temporali.

I risultati presentati nelle Tabelle A1-A9 dell'Allegato A sono relativi alle analisi condotte con i valori delle variabili cliniche in scala originale, per semplificarne l'interpretazione; risultati sostanzialmente analoghi sono stati ottenuti applicando le opportune trasformazioni di scala.

Tutte le analisi sono state condotte controllando per condizioni meteorologiche (pressione atmosferica e temperatura), campagna di monitoraggio e week-end.

L'adattamento di ogni singolo modello ai dati è stata valutata con riferimento a diversi rapporti temporali tra esposizione ed effetti clinici (stesso giorno; precedenti 24 h; due giorni prima, tre giorni prima).

Per le analisi sono stati utilizzati i software statistici STATA (48) e SPSS (49).

¹ FVC = capacità vitale forzata

² FEV₁ = volume espiratorio forzato in 1 secondo

³ FEF₂₅₋₇₅ = flusso massimo midespiratorio

⁴ FEV₁/FVC = rapporto tra volume espiratorio forzato in 1 secondo e capacità vitale forzata (Indice di Tiffeneau)

Risultati

Concentrazioni ambientali di inquinanti

La distribuzione delle concentrazioni ambientali degli inquinanti atmosferici e dei valori di temperatura e pressione atmosferica rilevati nel corso delle due campagne di monitoraggio viene presentata nella Tabella 2.

Tabella 2. Concentrazioni di materiale particellare e di inquinanti gassosi, temperatura e pressione atmosferica durante i periodi in studio (estate e inverno 1999)

Variabile (unità di misura)	Estate		Inverno		Totale	
	N.	Media (DS)	N.	Media (DS)	N.	Media (DS)
PM _{2.5} (µg/m ³)	33	18.19 (4.94)	30	36.74 (24.06)	63	27.03 (19.25)
PM _{10-2.5} (µg/m ³)	33	18.56 (7.32)	30	12.29 (5.35)	63	15.58 (7.14)
PM ₁₀ (µg/m ³)	33	36.76 (10.68)	30	49.03 (28.14)	63	42.60 (21.62)
NO ₂ (µg/m ³)	32	76.14 (13.59)	35	65.46 (13.30)	67	70.56 (14.38)
CO (mg/m ³)	32	2.11 (0.33)	34	12.33 (4.85)	66	7.38 (6.21)
O ₃ (µg/m ³)	32	70.90 (12.54)	34	15.99 (8.07)	66	42.61 (29.55)
T (°C)	29	24.02 (1.77)	31	9.51 (2.20)	60	16.53 (7.58)
P atm (mm Hg)	29	761.85 (2.64)	31	763.23 (6.96)	60	762.56 (5.33)

Estate = dal 24-5-1999 al 25-6-1999 (h 10.00-10.00); **Inverno** = dal 22-11-1999 al 22-12-1999 (h.15.00-15.00); **PM_{2.5}**= materiale particellare di granulometria inferiore ai 2.5 µm (medie delle concentrazioni giornaliere rilevate presso l'ISS e Villa Ada); **PM_{10-2.5}** = materiale particellare di granulometria compresa tra 2.5 e 10 µm (medie delle concentrazioni giornaliere rilevate presso l'ISS e Villa Ada); **NO₂** = Biossido di azoto (medie delle concentrazioni giornaliere rilevate presso 5 stazioni di monitoraggio delle qualità dell'aria di Roma); **CO** = Monossido di carbonio (medie delle concentrazioni giornaliere rilevate presso 5 stazioni di monitoraggio delle qualità dell'aria di Roma); **O₃** = Ozono (medie delle concentrazioni giornaliere rilevate presso 2 stazioni extraurbane di monitoraggio delle qualità dell'aria di Roma); **T** = temperatura (medie giornaliere rilevate presso la stazione di monitoraggio climatico del Collegio Romano, UCEA); **P atm** = pressione atmosferica (medie giornaliere rilevate presso la stazione di monitoraggio climatico del Collegio Romano, UCEA)

L'andamento delle concentrazioni giornaliere di PM_{2.5}, PM_{10-2.5} e PM₁₀ durante i periodi in studio viene illustrato nella Figura B1 (Allegato B) e quello di NO₂, CO e O₃ rispettivamente nelle Figure B2, B3 e B4 (Allegato B). Le Figure B5 e B6 descrivono l'andamento dei valori giornalieri di temperatura e pressione atmosferica (Allegato B).

I livelli medi giornalieri di PM₁₀ e PM_{2.5} durante le campagne di monitoraggio del 1999 erano rispettivamente di 42.6 µg/m³ (DS = 21.6) e 27.0 µg/m³ (DS = 19.3), con valori sensibilmente più elevati durante la serie invernale rispetto a quella estiva (vedi Tabella 2). La variabilità giornaliera delle concentrazioni di materiale particellare era sufficientemente elevata per garantire un'adeguata informatività dello studio (Tabella 2 e Figura B1).

La concentrazione di NO₂ risultava, come media su due periodi in studio, pari a 70.6 µg/m³ (DS = 14.4), senza differenze di rilievo tra *survey* estiva e *survey* invernale (Tabella 2 e Figura B2).

La concentrazione di CO (Tabella 2 e Figura B3) risultava, come media su due periodi in studio, pari a 7.4 mg/m³ (DS = 6.2), notevolmente più elevata in inverno (media 12.3 mg/m³ DS = 4.9) che in estate (media 2.1 mg/m³ DS = 0.3).

Come atteso, le concentrazioni di O₃ (Tabella 2 e Figura B4) erano sensibilmente più elevate nella campagna estiva (media 70.9 µg/m³, DS = 12.5) rispetto a quella invernale (media 16.0 µg/m³, DS = 8.1).

La Tabella 3 mostra i risultati dell'analisi di correlazione (test non parametrico) tra i diversi inquinanti in studio, la temperatura e la pressione atmosferica.

Tabella 3. Correlazione tra concentrazioni ambientali di PM_{10-2.5}, PM_{2.5}, NO₂, CO, O₃, temperatura e pressione atmosferica rilevate durante il periodo in studio (estate e inverno 1999)

	PM _{2.5}	PM _{10-2.5}	NO ₂	CO	O ₃	T	P atm
PM_{2.5}	1	0.341	0.426	0.668	-0.514	-0.304	0.665
p-value	-	0.003	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000
N.	63	63	62	61	61	59	59
PM_{10-2.5}		1	0.505	-0.093	0.305	0.569	0.262
p-value		-	0.000	0.239	0.008	0.000	0.022
N.		63	62	61	61	59	59
NO₂			1	0.049	0.174	0.315	0.450
p-value			-	0.348	0.081	0.007	0.000
N.			67	66	66	60	60
CO				1	-0.869	-0.729	0.422
p-value				-	0.000	0.000	0.000
N.				66	66	59	59
O₃					1	0.789	-0.274
p-value					-	0.000	0.018
N.					66	59	59
T						1	-0.220
p-value						-	0.046
N.						60	60
P atm							1
p-value							-
N.							60

PM_{2.5} = materiale particellare di granulometria inferiore ai 2.5 µm (medie delle concentrazioni giornaliere rilevate presso l'ISS e Villa Ada); PM_{10-2.5} = materiale particellare di granulometria compresa tra 2.5 e 10 µm (medie delle concentrazioni giornaliere rilevate presso l'ISS e Villa Ada); NO₂ = Biossido di azoto (medie delle concentrazioni giornaliere rilevate presso 5 stazioni di monitoraggio delle qualità dell'aria di Roma); CO = Monossido di carbonio (medie delle concentrazioni giornaliere rilevate presso 5 stazioni di monitoraggio delle qualità dell'aria di Roma); O₃ = Ozono (medie delle concentrazioni giornaliere rilevate presso 2 stazioni extraurbane di monitoraggio delle qualità dell'aria di Roma); T = temperatura (medie giornaliere rilevate presso la stazione di monitoraggio climatico del Collegio Romano, UCEA); P atm = pressione atmosferica (medie giornaliere rilevate presso la stazione di monitoraggio climatico del Collegio Romano, UCEA); N. = N. campioni

Le concentrazioni ambientali di PM_{2.5} e della frazione *coarse* (Tabella 3, Figura B1) risultavano poco correlate ($\rho = 0.341$; $p = 0.003$).

Il livello medio giornaliero del particolato *fine* era positivamente correlato alle concentrazioni di CO e NO₂ e ai valori di pressione atmosferica, e inversamente correlato alle concentrazioni di O₃ e alla temperatura (Tabella 3).

Il livello medio giornaliero del particolato *coarse* era positivamente correlato alle concentrazioni di NO₂ e alla temperatura, poco correlato (direttamente) alle concentrazioni di O₃ e non correlato alle concentrazioni di CO (Tabella 3).

Le concentrazioni di CO e di O₃ presentavano una forte correlazione negativa (Tabella 3).

Confronto tra le concentrazioni di PM_{2.5} *indoor* e *outdoor*

I risultati dello studio di validazione nel quale, in concomitanza con il monitoraggio ambientale, sono state condotte misurazioni dei livelli *indoor* di PM_{2.5} nelle abitazioni di tre partecipanti allo studio, vengono riportati nella Tabella 4.

Tabella 4. Correlazione tra concentrazioni *indoor* e *outdoor* di PM_{2.5} (µg/m³)

Periodo	N.	PM _{2.5} <i>indoor</i>	PM _{2.5} <i>outdoor</i>	ρ di Spearman (p-value)
		Media (DS)	Media (DS)	
Estate	29 e 29	24.90 (7.72)	17.74 (4.94)	0.578 (p = 0.01)
Inverno	30 e 30	27.04 (12.22)	36.74 (24.06)	0.911 (p<0.001)
Totale	59 e 59	25.99 (10.23)	27.40 (19.83)	0.802 (p<0.001)

Estate = dal 28-5-1999 al 25-6-1999 (h 10.00-10.00); **Inverno** = dal 23-11-1999 al 22-12-1999 (h.15.00-15.00); **PM_{2.5} *indoor*** = media delle concentrazioni giornaliere rilevate nelle abitazioni di 3 partecipanti allo studio; **PM_{2.5} *outdoor*** = media delle concentrazioni giornaliere rilevate presso l'ISS e Villa Ada.

L'analisi di riproducibilità ha mostrato una buona correlazione tra i livelli *indoor* e *outdoor* di PM_{2.5}, più pronunciata in inverno che in estate e con un inversione del rapporto tra le concentrazioni *indoor/outdoor* nelle due stagioni (Figura B7).

Contenuto in metalli del particolato *outdoor* e *indoor*

La Tabella 5 descrive le concentrazioni degli otto metalli considerati (Cd, Cr, Fe, Ni, Pb, Pt, V e Zn), calcolate a partire dalle quantità rilevate nei campioni di materiale particolato (frazioni *fine* e *coarse* del particolato *outdoor* e PM_{2.5} *indoor*) raccolti durante le due campagne di monitoraggio del 1999.

Tabella 5. Concentrazione di alcuni metalli calcolate a partire dalle quantità misurate nei campioni di PM_{2.5} *outdoor*, di PM_{10-2.5} *outdoor* e di PM_{2.5} *indoor* (survey estiva e invernale cumulate).

Variabile	PM _{2.5} <i>outdoor</i>			PM _{10-2.5} <i>outdoor</i>			PM _{2.5} <i>indoor</i>		
	N.	Media	DS	N.	Media	DS	N.	Media	DS
Cadmio (ng/m ³)	60	0.46	0.40	60	0.09	0.11	61	0.51	0.37
Cromo (ng/m ³)	60	1.86	1.75	60	2.43	1.54	61	2.54	1.72
Ferro (ng/m ³)	60	282.95	166.55	60	635.21	423.59	61	291.42	158.75
Nichel (ng/m ³)	60	4.84	6.53	60	3.62	3.89	61	5.89	5.09
Piombo (ng/m ³)	60	30.57	19.03	60	8.28	5.14	61	27.26	13.57
Platino (pg/m ³)	60	4.99	8.61	60	3.07	3.55	59	2.83	4.89
Vanadio (ng/m ³)	60	1.76	1.37	60	0.93	0.61	61	1.67	1.20
Zinco (ng/m ³)	60	45.82	33.13	57	27.35	16.69	61	59.57	35.41

ng = nanogrammi; pg = picogrammi.

Nella Tabella 6 viene illustrata la composizione proporzionale in metalli del PM_{2.5} *outdoor*, del PM_{10-2.5} *outdoor* e del PM_{2.5} *indoor*, calcolata come media dei rapporti tra concentrazione giornaliera di metalli in un dato campione di particolato e concentrazione dello stesso campione di particolato.

Tabella 6. Composizione proporzionale in metalli delle frazioni *fine* e *coarse* del particolato *outdoor* e del PM_{2.5} *indoor* (survey estiva e invernale cumulate)

Variabile	N.	PM _{2.5} <i>outdoor</i>	PM _{10-2.5} <i>outdoor</i>	PM _{2.5} <i>indoor</i>	Rapporto PM _{2.5} <i>outdoor</i> / PM _{10-2.5} <i>outdoor</i>	Rapporto PM _{2.5} <i>indoor</i> / PM _{2.5} <i>outdoor</i>
Cadmio	60	0.0000202	0.0000061	0.0000223	3.3 (p<0.001)	1.1 (p=0.306)
Cromo	60	0.0000753	0.0001897	0.0001027	0.4 (p<0.001)	1.3 (p=0.002)
Ferro	60	0.0133782	0.0412228	0.0114216	0.3 (p<0.001)	0.9 (p=0.701)
Nichel	60	0.0002078	0.0002237	0.0002420	0.9 (p=0.017)	1.2 (p=0.029)
Piombo	60	0.0012747	0.0006199	0.0010254	2.1 (p<0.001)	0.8 (p=0.077)
Platino	60	0.0000002	0.0000002	0.0000001	0.9 (p=0.678)	0.6 (p=0.014)
Vanadio	60	0.0000883	0.0000604	0.0000726	1.5 (p=0.149)	0.9 (p=0.697)
Zinco	57	0.0018292	0.0020295	0.0024738	0.9 (p=0.612)	1.4 (p=0.001)

Composizione proporzionale in metalli = media dei rapporti tra concentrazione giornaliera di metalli in un dato campione di particolato e concentrazione dello stesso campione di particolato); **p** = significatività della differenza di rango della composizione proporzionale in metalli valutata mediante test di Kruskal Wallis.

Le Figure B8-B15 dell'Allegato B descrivono l'andamento delle concentrazioni medie giornaliere dei singoli elementi calcolate a partire dalle quantità rilevate nel PM_{2.5} *outdoor* e *indoor* durante lo studio.

Per quanto concerne il particolato *outdoor*, la frazione *fine* presenta quantità relative di Cd e Pb significativamente superiori e quantità di Cr, Fe e Ni significativamente inferiori a quelle rilevate nella frazione *coarse* (Tabella 6). Per gli altri metalli in studio (Pt, V e Zn) non si osservano, invece, differenze rilevanti tra le due frazioni granulometriche di particolato *outdoor* (Tabella 6).

Il confronto tra composizione proporzionale in metalli del PM_{2.5} *indoor* e *outdoor* rivela differenze per alcuni degli elementi in studio. In particolare, nel PM_{2.5} *indoor* le quantità relative di Cr, Ni e Zn sono significativamente superiori e la quantità di Pt è significativamente inferiore rispetto al PM_{2.5} *outdoor* (Tabella 6). Le frazioni *fine* del particolato *indoor* e *outdoor* presentano, invece, simili quantità relative di Cd, Fe, Pb e V (Tabella 6).

Caratteristiche individuali e distribuzione dei parametri clinici per gruppo

Le caratteristiche individuali dei pazienti all'ingresso nello studio e le distribuzioni di gruppo dei parametri clinici rilevati vengono descritte nella Tabella 7.

Durante le due *survey*, estiva e invernale, del 1999 sono state effettuate in totale 449 spirometrie (sui 29 soggetti inclusi nei *panel* BPCO, IMA e Asmatici); 174 saturometrie dell'emoglobina (nei 18 soggetti dei *panel* BPCO e IMA); 129 determinazioni della concentrazione di CO nell'espriato dell'emoglobina (nei 18 soggetti dei *panel* BPCO e IMA); 107 analisi del livello di NO nell'espriato (tra gli 11 partecipanti al *panel* asmatici) e 79 monitoraggi Holter di 24 ore dell'ECG (nei 18 soggetti dei *panel* BPCO e IMA).

Dall'esame della tabella 5 si osserva che, come prevedibile, i casi di BPCO differiscono dai soggetti inclusi nei *panel* IMA e Asmatici in termini di funzionalità respiratoria, come indicato dai più bassi valori degli indicatori FVC, FEV₁ e FEF₂₅₋₇₅.

Dai dati preliminari del monitoraggio Holter dell'ECG sull'insieme dei soggetti afferenti a ciascun *panel*, si nota che i casi con pregressa ischemia acuta del miocardio (IMA) come gruppo (tabella 5), rispetto ai casi di BPCO, presentano intervalli NN più lunghi (indice di bradicardia) e una più pronunciata variabilità del battito cardiaco (come indicato dalla più elevata deviazione standard dell'intervallo tra due battiti consecutivi – DSNN).

Tabella 7. Distribuzione delle caratteristiche individuali dei partecipanti allo studio e delle medie di gruppo dei parametri clinici monitorati

Variabile	BPCO		IMA		Asma	
	Oss	Media (DS)	Oss	Media (DS)	Oss	Media (DS)
Età (anni)	11	66.7 (9.1)	7	63.6 (9.9)	11	41.1 (14.2)
Peso (kg)	11	71.1 (13.7)	7	72.5 (11.7)	11	64.4 (13.2)
Altezza (cm)	11	165.0 (10.9)	7	166.1 (7.4)	11	163.6 (10.1)
Pressione arteriosa						
Press sistolica (mmHg)	176	131.7 (16.8)	174	126.2 (15.9)	-	-
Press diastolica (mmHg)	176	78.1 (9.0)	173	75.0 (8.0)	-	-
Pulsossimetria						
Saturazione media HbO ₂ (%)	90	92.6 (3.8)	84	95.1 (1.5)	-	-
Coefficiente variazione HbO ₂	90	0.03 (0.02)	84	0.02 (0.02)	-	-
Saturazione min HbO ₂ (%)	90	80.2 (7.3)	84	85.4 (6.4)	-	-
Saturazione max HbO ₂ (%)	90	97.7 (1.0)	84	98.7 (0.5)	-	-
FC (battiti/min)	90	69.7 (11.3)	84	56.7 (6.4)	-	-
DS FC (battiti/min)	90	7.7 (5.1)	84	5.1 (3.5)	-	-
Holter ECG 24 h						
NN (msec)	36	750.1 (91.6)	42	927.8 (96.3)	-	-
DS NN (msec)	36	117.8 (20.6)	43	125.0 (34.5)	-	-
PNN50 (%)	36	21.8 (22.7)	43	9.2 (8.7)	-	-
Spirometria						
FVC (% del predetto)	171	62.6 (10.0)	170	80.8 (8.9)	108	115.1 (11.9)
FEV ₁ (% del predetto)	171	45.3 (9.8)	170	84.3 (9.7)	108	95.4 (16.4)
FEV ₁ /FVC (%)	-	-	-	-	108	69.8 (7.0)
FEF ₂₅₋₇₅ (% del predetto)	124	22.5 (8.3)	85	73.1 (16.5)	108	52.6 (19.1)
Analisi dell'aria espirata						
CO nell'espirato (ppb)	64	5.5 (2.0)	65	5.0 (2.7)	-	-
NO nell'espirato (ppb)	-	-	-	-	107	50.3 (33.9)

Oss = numero di osservazioni; **HbO₂** = saturazione emoglobinica di ossigeno (%); **FVC** = capacità vitale forzata; **FEV₁** = volume espiratorio forzato in 1 secondo; **FEF₂₅₋₇₅** = flusso massimo midespiratorio; **FEV₁/FVC** = rapporto tra volume espiratorio forzato in 1 secondo e capacità vitale forzata (Indice di Tiffeneau); **FC** = frequenza cardiaca; **DS FC** = deviazione standard della frequenza cardiaca; **Holter ECG 24 h** = registrazione Holter dell'elettrocardiogramma su 24 ore; **NN** = intervallo tra due complessi QRS adiacenti risultanti dalle depolarizzazioni del seno nodo atriale; **DS NN** = deviazione standard dell'intervallo NN; **PNN50 (%)** = percentuale di battiti consecutivi con variazioni dell'intervallo >50 millisecc (%); **CO** = monossido di carbonio; **NO** = monossido d'azoto

Relazione tra esposizione ed effetti clinici

Inquinamento atmosferico giornaliero e funzionalità respiratoria

Tra i soggetti con BPCO si osserva che all'aumento nelle concentrazioni ambientali di PM_{2.5} corrisponde un peggioramento della funzionalità respiratoria durante le successive 24-48 ore (Tabella A1 nell'Allegato A). In particolare, per un incremento di 10 µg/m³ nel livello atmosferico di PM_{2.5} si osserva un decremento – espresso come percentuale del predetto – dell'1% per la FVC, dello 0.7-0.8% per il FEV₁ e dello 0.7% il FEF₂₅₋₇₅.

Si osservano, inoltre, nei pazienti BPCO riduzioni del FEV₁ e del FEF₂₅₋₇₅ associate all'incremento (10 µg/m³) delle concentrazioni di NO₂ nelle precedenti 24 ore (-1% e -0.9%,

rispettivamente) e riduzioni della FVC (-0.3%) all'aumentare delle concentrazioni di CO (1 mg/m^3) nelle precedenti 24 ore (Tabella 7).

Tra i partecipanti al *panel* IMA non viene rilevata alcuna associazione tra la funzionalità respiratoria e le concentrazioni ambientali degli inquinanti in studio (Tabella A2).

Nel gruppo dei soggetti asmatici, la concentrazione di NO nell'espirsto risulta influenzata dai livelli atmosferici di NO₂, con un *lag* di 48-72 ore (Tabella A3).

Per quanto riguarda la funzionalità respiratoria nei pazienti asmatici, nell'analisi combinata dei dati raccolti durante le due *survey* si osserva una riduzione dell'indice di Tiffeneau (FEV₁/FVC) associato all'incremento di PM_{10-2.5} nelle precedenti 24-48 ore, mentre le concentrazioni atmosferiche di NO₂, CO e O₃ non sembrano influenzare i parametri di funzionalità respiratoria.

Contenuto in metalli del particolato e funzionalità respiratoria

Nelle Tabelle A4-A6 vengono presentati i risultati dell'analisi esplorativa delle variazioni dei parametri di funzionalità respiratoria nei tre *panel* (BPCO, IMA e Asmatici) in relazione al variare delle concentrazioni atmosferiche di 8 metalli, calcolate a partire dalle quantità determinate nel PM_{2.5}.

Nel *panel* dei BPCO (Tabella A4) rileviamo decrementi della FVC e del FEV₁ in corrispondenza di incrementi delle concentrazioni di Cr nelle 24-48 ore precedenti la spirometria; anche le concentrazioni di Fe, Pb e Zn sembrano avere un più modesto effetto negativo sugli indici di funzionalità respiratoria dei casi di BPCO (Tabella A4).

Nel *panel* degli IMA, in analogia a quanto osservato nelle analisi relative al particolato, non si osserva alcuna variazione nei parametri di funzionalità respiratoria associata alla variazione nelle concentrazioni atmosferiche dei metalli in studio (Tabella A5).

Nel *panel* degli Asmatici (Tabella A6) osserviamo decrementi della FVC in relazione ad incrementi delle concentrazioni di Cr a *lag* 1 e di Fe a *lag* 2, e una diminuzione del FEF₂₅₋₇₅ associata all'aumento dei livelli atmosferici di Zn a *lag* 1. L'incremento delle concentrazioni di Pt sembra associato tra gli asmatici a miglioramenti nel FEV₁ e nel FEF₂₅₋₇₅ a *lag* 2.

Inquinamento atmosferico giornaliero e ossimetria

I valori di saturazione media e minima di ossigeno dell'emoglobina del sangue arterioso (HbO₂, %) non risultano influenzati dai livelli di materiale particellare atmosferico né tra i componenti del *panel* BPCO né tra quelli del *panel* IMA (dati non riportati).

Si osserva però una diminuzione nella saturazione massima della emoglobina (HbO₂) tra i casi di BPCO in relazione alle concentrazioni di PM_{2.5} (-0.31%) e di CO (-0.09%) registrate in concomitanza all'esecuzione del test (Tabella A7).

Inquinamento atmosferico giornaliero e frequenza cardiaca

Tra i partecipanti al *panel* BPCO, abbiamo rilevato un incremento di circa 3 battiti/minuto nella frequenza cardiaca associato ad un aumento di $10 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ nei livelli di PM_{2.5} misurati lo stesso giorno (Tabella A8). Questi stessi pazienti mostravano anche un incremento di circa 19 millisecondi nella durata media dell'intervallo NN in relazione ad aumenti di $10 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ del livello di PM_{2.5} nelle 48-72 ore precedenti all'esame Holter.

Tra i pazienti con pregresso IMA, non abbiamo rilevato alcuna associazione tra frequenza cardiaca rilevata durante la pulsossimetria notturna e livelli ambientali di materiale particellare (Tabella A9).

Per quanto riguarda i risultati del monitoraggio Holter nel *panel* IMA (Tabella A9), si osserva un aumento (1-2%) nel numero di battiti consecutivi con variazioni dell'intervallo tra due complessi QRS adiacenti superiori a 50 millisecondi (PNN50%) associato ad incrementi di $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ nei livelli di $\text{PM}_{2.5}$ relativi alle precedenti 24-72 ore. Quest'ultimo risultato si interpreta come un incremento della variabilità del battito cardiaco. Si osserva anche una diminuzione del PNN50, interpretabile come una diminuzione della variabilità del battito, in funzione di incrementi nelle concentrazioni ambientali di $\text{PM}_{10-2.5}$ nelle precedenti 24 ore.

Discussione e conclusioni

Nel *panel* dei bronchitici cronici abbiamo rilevato una netta influenza negativa delle concentrazioni giornaliere del materiale particolare (in particolare del $\text{PM}_{2.5}$) e di alcuni inquinanti gassosi (NO_2 e CO) sui parametri di funzionalità respiratoria.

La concentrazione di diversi metalli contenuti nella frazione *fine* del particolato atmosferico, in particolare Cr, Fe, Pb e Zn, si associa nei BPCO a significativi decrementi degli indici di funzionalità respiratoria, a suggerire un loro ruolo nelle caratteristiche biologicamente efficaci del particolato inalabile.

Nell'ambito dell'Harvard Six Cities Studies è stata analizzata la relazione tra mortalità giornaliera e concentrazioni di $\text{PM}_{2.5}$ attribuibile a diverse sorgenti (50), sulla base del contenuto di particolari elementi: silice (Si) come indicatore della componente originata da fenomeni di erosione della crosta terrestre, piombo (Pb) come indicatore del contributo di sorgenti mobili (autoveicoli) e selenio (Se) come *tracer* di processi di combustione del carbone. In questo studio sono state anche condotte analisi dell'impatto delle variazioni di concentrazione di singoli metalli sulla mortalità giornaliera e si osservava un significativo incremento nella mortalità totale in relazione all'incremento delle concentrazioni di Pb e nichel (Ni), mentre l'effetto del ferro e del vanadio – osservato nei modelli ad un unico inquinante – scompariva controllando per l'effetto di Pb e Ni (50).

Tra i partecipanti al *panel* IMA, invece, non viene rilevata alcuna associazione tra funzionalità respiratoria e concentrazioni ambientali degli inquinanti in studio.

Questo contrasto di risultati è di particolare interesse perché sembra indicare che la suscettibilità individuale agli effetti delle concentrazioni ambientali di inquinanti sui parametri respiratori varia in funzione di preesistenti alterazioni della funzionalità respiratoria.

Per quanto riguarda gli effetti dell'inquinamento da materiale particolare sulla saturazione di ossigeno e sulla frequenza e la variabilità del battito cardiaco, i risultati preliminari dei *panel* BPCO e IMA qui presentati, sembrano coerenti con quelli di analoghi studi recentemente pubblicati (26, 40-43).

Per quanto concerne il *panel* degli asmatici, i risultati di questo studio suggeriscono un ruolo del $\text{PM}_{10-2.5}$ nell'indurre un peggioramento dei parametri di funzionalità respiratoria.

È anche d'interesse l'osservazione che l'esposizione a livelli crescenti di NO_2 induce negli asmatici fenomeni di infiammazione, come testimoniato dall'incremento nei livelli di NO nell'espirato a distanza di 48 ore circa, e non solo sintomi e parametri oggettivi di ostruzione bronchiale.

Contrariamente alle attese, nel nostro *panel* di asmatici non abbiamo osservato associazioni tra la funzionalità respiratoria e le concentrazioni ambientali giornaliere di O_3 , neppure restringendo l'analisi alla sola *survey* estiva.

Bibliografia

1. Thurston DA. Critical review of PM₁₀-mortality time-series studies. *J Expo Analysis Environ Epidemiol* 1996; 6 (1): 3-21.
2. Schwartz J, Dockery DW, Neas LM. Is daily mortality associated specifically with fine particles? *J Air & Waste Manage Assoc* 1996; 46: 927-939.
3. Dockery DW, Pope CA III, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BG, Speizer FE. An association between air pollution and mortality in six US cities. *N Engl J Med* 1993; 329: 1753-1759.
4. Pope CA III, Thun MJ, Namboodiri MM, Dockery DW, Evans JS, Speizer FE, Heath CW. Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of US adults. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 669-674.
5. Abbey DE, Nishino N, McDonnell WF, Burchette RJ, Knutsen SF, Beeson WL, Yang JX. Long-term inhalable particles and other air pollutants related to mortality in nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 373-382.
6. Pope CA III, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002; 287 (9): 1132-1141.
7. Wilson R., Spengler D. *Particles in our air: concentrations and health effects*. Boston: Harvard University Press, 1996.
8. Holgate S, Samet J, Koren H, Maynard R. *Air pollution and health*. San Diego / London: Academic Press, 1999.
9. U.S. Environmental Protection Agency. National ambient air quality standards for particulate matter. *Federal Register* 1997, 62 (38).
10. World Health Organization (WHO). *Update and revision of WHO air quality guidelines for Europe*. Geneva: WHO, 1997.
11. Lagorio S. Problemi interpretativi delle analisi di serie temporali su inquinamento atmosferico e salute. Parte I: le stime di esposizione. *Epidemiol Prev* 2001; 25: 181-190.
12. Lagorio S. Problemi interpretativi delle analisi di serie temporali su inquinamento atmosferico e salute. Parte II: significato delle variabili di outcome, forma delle relazioni, modificatori d'effetto e meccanismi d'azione. *Epidemiol Prev* 2001; 25: 256-265.
13. Forastiere F, D'Ippoliti D, Pistelli R. Airborne particles are associated with increased mortality and hospital admissions for heart and lung diseases. *Eur Respir Mon* 2002; 20: 1-15.
14. Dockery DW, Pope CA III. Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu Rev Public Health* 1994; 15: 107-132.
15. Utell M, Samet J. Airborne particles and respiratory disease: clinical and pathogenetic considerations. In: *Particles in our air: concentrations and health effects*. R. Wilson & J.D. Spengler (Eds). Boston: Harvard University Press, 1996, pp. 169-188.
16. Sunyer J, Schwartz J, Tobias A, Macfarlane D, Garcia J, Antò JM. Patients with chronic obstructive pulmonary disease are at increased risk of death associated with urban particle air pollution: a case-crossover analysis. *Am J Epidemiol* 2000; 151 (1): 50-56.
17. Zanobetti A, Schwartz J. Race, gender and social status as modifiers of the effect of PM₁₀ on mortality. *J Occup Environ Med* 2000; 2 (5): 469-474.
18. Rusznak C, Devalia JL, Wang J, Davies RJ. Pollution-induced airway disease and the putative underlying mechanisms. *Clin Rev Allergy Immunol* 1997; 15: 205-217.

19. Oberdörster G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particulate. *Int Arch Occup Environ Health* 2001; 74: 1-8.
20. MacNee W, Donaldson K. Exacerbations of COPD – environmental mechanisms. *Chest* 2000; 117: 390S-397S.
21. Lighty JS, Veranth JM, Sarofim AF. Combustion aerosols: factors governing their size and composition and implications to human health. *J Air & Waste Manage Assoc* 2000; 50: 1565-1618.
22. Donaldson K, Li XY, MacNee W. Ultrafine (nanometre) particle mediated lung injury. *J Aerosol Sci* 1998; 29 (5/6): 553-560.
23. Peters A, Wichmann HE, Tuch T, Heinrich J, Heyder J. Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Resp Crit Care Med* 1997; 155: 1376-1383.
24. Costa DL. Particulate matter and cardiopulmonary health: a perspective. *Inhal Toxicol* 2000; 12 (Suppl. 3): 35-44.
25. Künzli N, Kaiser R, Medina S, Studnicka M, Chanel O, Filliger P, Herry M, Horak FJr, Puybonnieux-Textier V, Quénel P, Schneider J, Seethaler R, Vergnaud J-C, Sommer H. Public-health impact of *outdoor* and traffic-related air pollution: a European assessment. *Lancet* 2000; 356: 795-801.
26. Galassi C, Ostro B, Forastiere F, Cattani S, Martuzzi M, Bertollini R. Exposure to PM₁₀ in the eight major Italian cities and quantification of the health effects. Poster presented at the ISEE 2000 Meeting, Buffalo, NY, USA, August 19-22, 2000 (www.who.it/docs/Ehi/pm10.pdf).
27. Pope CA III, Dockery DW, Kanner RE, Villegas GM, Schwartz J. Oxygen saturation, pulse rate, and particulate air pollution. A daily time-series panel study. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 365-372.
28. Hoek G, Brunekreef, Verhoeff A, van Wijnen J, Fisher P. Daily mortality and air pollution in the Netherlands. *J Air Waste Manage Assoc* 2000; 50: 1380-1389.
29. Burnett RT, Dales RE, Brook JR, Raizenne ME, Krewski D. Association between ambient carbon monoxide levels and hospitalizations for congestive heart failure in the elderly in 10 Canadian cities. *Epidemiology* 1997; 8: 162-167.
30. Burnett RT, Brook JR, Yung WT, Dales RE, Krewski D. Association between ozone and hospitalization for respiratory disease in 16 Canadian cities. *Environ Res* 1997; 72: 24-31.
31. Burnett RT, Cakmak S, Brook JR. The effect of urban ambient air pollution mix on daily mortality rates in 11 Canadian cities. *Canadian J Public Health* 1998; 89 (3): 152-156.
32. Zmirou D, Schwartz J, Saez M, Zanobetti A, Wojtyniak B, Touloumi G, Spix C, Ponce de Leon A, Le Moullec Y, Bacharova L, Schouten J, Ponka A, Katsouyanni K. Time-series analysis of air pollution and cause-specific mortality. *Epidemiology* 1998; 9: 495-503.
33. Katsouyanni K, Touloumi G, Samoli E, Gryparis A, LeTertre A, Monopolis Y, Rossi G, Zmirou D, Ballester F, Boumghar A, Anderson HR, Wojtyniak B, Paldy A, Braunstein R, Pekkanen J, Schindler C, Schwartz J. Confounding and effect modification in the short-term effects of ambient particles on total mortality: results from 29 European cities within the APHEA2 project. *Epidemiology* 2001; 12 (5): 521-531.
34. McGrath JJ. Biological plausibility for carbon monoxide as a copollutant in PM epidemiologic studies. *Inhal Toxicol* 2000; 12 (Suppl. 4): 91-107.
35. Seaton A, McNeen W, Donaldson K, Godden D. Particulate air pollution and acute health effect. *Lancet* 1995; 345: 176-178.
36. Peters A, Döring A, Wichmann H-E, Koenig W. Increased plasma viscosity during an air pollution episode: a link to mortality? *Lancet* 1997; 349: 1582-1587.

37. Stone PH, Godleski JJ. First step toward understanding the pathophysiologic link between air pollution and cardiac mortality. *Am Heart J* 1999; 138 (5): 804-807.
38. Godleski JJ. *Mechanisms of morbidity and mortality from exposure to ambient air particles in canine*. Cambridge, MA: Health Effect Institute, 1999.
39. Watkinson WP, Campen MJ, Costa DL. Arrhythmia induction after exposure to residual oil fly ash particules in the pulmonary hypertensive rat. *Fund Tox Sci* 1998; 41: 209-216.
40. Lovett EG, Clare RW, Verier RL *et al*. Rat cardiovascular disfunction prior to death during particle exposure to concentrated ambient air particle [abstract]. *Toxicol Sci* 1999; 48: A297.
41. Pope CA III, Verrier RL, Lovett EG, Larson AC, Raizenne ME, Kanner RE, Schwartz J, Villegas GM, Gold DR, Dockery DW. Heart rate variability associated with particulate air pollution. *Am Heart J* 1999; 138: 890-899.
42. Peters A, Perz S, Döring A, Stieber J, Koenig W, Wichmann H-E. Increases in heart rate during an air pollution episode. *Am J Epidemiol* 1999; 150: 1094-1098.
43. Liao, D., Creason, J., Shy, C., Williams, R., Watts, R. & Zweidinger R. Daily variation of particulate air pollution and poor cardiac autonomic control in the elderly. *Environ Health Perspect* 1999, 107: 521-525.
44. Gold DR, Litonjua A, Schwartz J, Lovett E, Larson A, Nearing B, Allen G, Verrier M, Cherry R, Verrier R. Ambient pollution and heart rate variability. *Circulation* 2000; 101: 1267-1273.
45. Peters A, Liu E, Verrier L, Schwartz J, Gold DR, Mittleman M, Baliff J, Oh JA, Allen G, Monahan K, Dockery DW. Air pollution and incidence of cardiac arrhythmia. *Epidemiology* 2000; 11: 11-17.
46. Peters A, Dockery DW, Muller JE, Mittleman MA. Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103: 2810-2815.
47. NIH/NIH. *Guidelines for the diagnosis and management of asthma*. NIH Publication N° 97-4051, 1997.
48. StataCorp. *Stata Statistical Software. Release 6.0*. College Station, TX: Stata Corporation, 1999.
49. SPSS Release 10. Spss Inc., Chichago, Illinois (USA), 2001.
50. Laden F, Neas LM, Dockery DW, Schwartz J. Association of fine particulate mater from different sources with daily mortality in six U.S. cities. *Environ Health Perspect* 2000; 108 (10): 941-947.

Allegato A
Variazioni della funzionalità respiratoria e cardiaca
nei tre *panel* di soggetti sensibili

Tabella A1. Panel/BPCO: variazioni della funzionalità respiratoria per incremento unitario nelle concentrazioni di inquinanti atmosferici, corrette per condizioni meteorologiche, serie di monitoraggio e week-end (11 soggetti, circa 165 osservazioni)

Inquinante	PM _{2.5}			PM _{10-2.5}			PM ₁₀			NO ₂			CO			O ₃		
Incremento	10 µg/m ³			10 µg/m ³			10 µg/m ³			10 µg/m ³			1 mg/m ³			10 µg/m ³		
Variable	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p
FVC (%)																		
Precedenti:																		
24 h	-1.05	0.37	0.005	-1.43	1.01	0.161	-0.84	0.30	0.006	-0.85	0.47	0.069	-0.33	0.16	0.042	-0.12	0.59	0.836
24-48 h	-0.93	0.35	0.008	-1.20	1.13	0.293	-0.79	0.30	0.010	-0.23	0.47	0.617	-0.22	0.18	0.203	0.42	0.53	0.432
48-72 h	-0.66	0.37	0.077	-0.13	1.06	0.902	-0.51	0.32	0.117	0.15	0.47	0.746	0.28	0.16	0.085	-0.25	0.64	0.694
FEV₁ (%)																		
Precedenti:																		
24 h	-0.68	0.29	0.018	-0.44	0.79	0.573	-0.50	0.24	0.035	-0.96	0.35	0.007	-0.14	0.12	0.247	-0.09	0.45	0.845
24-48 h	-0.79	0.27	0.003	-0.27	0.88	0.756	-0.62	0.23	0.009	-0.71	0.35	0.045	-0.22	0.13	0.101	0.62	0.40	0.125
48-72 h	-0.55	0.29	0.062	0.54	0.84	0.521	-0.36	0.25	0.158	0.25	0.36	0.492	0.14	0.13	0.279	0.49	0.49	0.316
FEF₂₅₋₇₅ (%)																		
Precedenti:																		
24 h	-0.73	0.34	0.033	-0.35	0.85	0.680	-0.51	0.27	0.064	-0.87	0.37	0.022	0.08	0.14	0.575	-0.46	0.46	0.318
24-48 h	-0.59	0.32	0.066	-0.003	0.98	0.998	-0.45	0.28	0.106	-0.58	0.39	0.137	-0.13	0.15	0.390	0.19	0.43	0.664
48-72 h	-0.57	0.34	0.096	0.28	0.94	0.767	-0.41	0.30	0.174	0.04	0.39	0.915	0.04	0.14	0.781	1.09	0.52	0.038

β = coefficiente di regressione

ES (β) = errore standard di β

FVC = capacità vitale forzata

FEV₁ = volume espiratorio forzato in 1 secondo

FEF₂₅₋₇₅ = flusso massimo midespiratorio

Tabella A2. Panel/IMA: Variazioni della funzionalità respiratoria per incremento unitario nelle concentrazioni di inquinanti atmosferici, corrette per condizioni meteorologiche, serie di monitoraggio e week-end (7 soggetti, circa 170 osservazioni)

Inquinante	PM _{2.5}			PM _{10-2.5}			PM ₁₀			NO ₂			CO			O ₃		
Incremento	10 µg/m ³			10 µg/m ³			10 µg/m ³			10 µg/m ³			1 mg/m ³			10 µg/m ³		
Variable	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p
FVC (%)																		
Precedenti:																		
24 h	-0.08	0.26	0.754	-0.33	0.60	0.584	-0.09	0.21	0.660	-0.002	0.27	0.994	0.10	0.336	0.34	0.33	0.303	
24-48 h	0.10	0.22	0.661	-0.59	0.63	0.347	0.02	0.19	0.923	-0.09	0.29	0.749	0.08	0.378	-0.14	0.30	0.635	
48-72 h	0.25	0.24	0.305	0.97	0.66	0.144	0.30	0.21	0.167	0.42	0.28	0.142	0.18	0.11	0.109	-0.41	0.40	0.311
FEV₁ (%)																		
Precedenti:																		
24 h	-0.01	0.30	0.970	0.15	0.69	0.823	0.01	0.24	0.963	-0.36	0.31	0.242	0.10	0.377	0.69	0.37	0.067	
24-48 h	0.00	0.25	0.994	-0.42	0.72	0.560	-0.04	0.22	0.865	-0.12	0.34	0.733	-0.03	0.770	0.42	0.34	0.219	
48-72 h	-0.12	0.28	0.667	0.18	0.77	0.815	-0.08	0.25	0.761	0.12	0.33	0.726	0.08	0.533	0.03	0.46	0.953	
FEF₂₅₋₇₅ (%)																		
Precedenti:																		
24 h	-0.30	0.81	0.713	-0.45	2.01	0.822	-0.24	0.65	0.712	-0.66	0.84	0.432	-0.01	0.975	0.55	1.23	0.659	
24-48 h	-0.02	0.71	0.975	-0.37	2.12	0.860	-0.05	0.63	0.936	-0.37	0.97	0.707	0.07	0.805	0.42	0.99	0.675	
48-72 h	0.76	0.80	0.342	0.01	2.10	0.996	0.57	0.69	0.410	-0.72	0.97	0.458	0.38	0.36	0.81	1.30	0.536	

β = coefficiente di regressione

ES (β) = errore standard di β

FVC = capacità vitale forzata

FEV₁ = volume espiratorio forzato in 1 secondo

FEF₂₅₋₇₅ = flusso massimo midespiratorio

Tabella A3. Panel Asmatici: variazioni della funzionalità respiratoria per incremento unitario nelle concentrazioni di inquinanti atmosferici, corrette per condizioni meteorologiche, serie di monitoraggio e week-end (11 soggetti, circa 100 osservazioni)

Inquinante	PM _{2.5} 10 µg/m ³			PM _{10-2.5} 10 µg/m ³			PM ₁₀ 10 µg/m ³			NO ₂ 10 µg/m ³			CO 1 mg/m ³			O ₃ 10 µg/m ³		
Variable	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p
FVC (%)																		
Precedenti:																		
24 h	-0.31	0.22	0.174	0.73	0.62	0.245	-0.15	0.19	0.431	-0.50	0.32	0.122	-0.10	0.12	0.369	0.25	0.36	0.482
24-48 h	-0.19	0.24	0.442	-0.36	0.80	0.651	-0.16	0.21	0.431	-0.24	0.34	0.489	-0.05	0.11	0.633	0.50	0.31	0.116
48-72 h	-0.02	0.23	0.918	1.09	0.74	0.144	0.07	0.21	0.756	0.21	0.32	0.517	-0.04	0.13	0.746	0.14	0.42	0.732
FEV₁ (%)																		
Precedenti:																		
24 h	-0.51	0.31	0.105	-0.01	0.87	0.992	-0.36	0.26	0.172	-0.82	0.43	0.059	-0.20	0.16	0.194	0.31	0.49	0.525
24-48 h	-0.39	0.32	0.221	-2.02	1.05	0.057	-0.44	0.28	0.118	-0.71	0.46	0.124	-0.09	0.15	0.544	0.24	0.43	0.573
48-72 h	0.04	0.32	0.910	1.68	1.02	0.104	0.16	0.29	0.580	0.32	0.43	0.461	-0.08	0.18	0.671	0.76	0.57	0.183
FEV₁/FVC (%)																		
Precedenti:																		
24 h	-0.20	0.16	0.197	-0.48	0.43	0.266	-0.19	0.13	0.153	-0.30	0.22	0.166	-0.09	0.08	0.271	0.13	0.25	0.599
24-48 h	-0.20	0.16	0.213	-1.37	0.50	0.008	-0.24	0.13	0.077	-0.35	0.23	0.137	-0.04	0.08	0.611	-0.12	0.22	0.572
48-72 h	0.04	0.16	0.791	0.65	0.51	0.208	0.09	0.14	0.555	0.17	0.22	0.439	-0.002	0.09	0.978	0.45	0.28	0.111
FEF₂₅₋₇₅ (%)																		
Precedenti:																		
24 h	-0.85	0.46	0.067	0.12	1.29	0.926	-0.59	0.39	0.131	-1.13	0.65	0.083	-0.35	0.23	0.140	0.66	0.74	0.375
24-48 h	-0.59	0.46	0.208	-2.30	1.53	0.138	-0.60	0.40	0.138	-0.93	0.69	0.178	-0.12	0.23	0.597	0.43	0.65	0.511
48-72 h	0.31	0.48	0.522	3.27	1.53	0.035	0.51	0.43	0.244	0.57	0.65	0.383	-0.03	0.26	0.916	1.32	0.84	0.119
NO espirato (ppb)																		
Precedenti:																		
24 h	0.07	1.17	0.949	-0.47	3.21	0.885	0.01	0.98	0.993	0.07	1.59	0.964	-0.56	0.57	0.322	-1.48	1.82	0.418
24-48 h	-0.74	1.25	0.556	-2.32	4.16	0.579	-0.72	1.08	0.511	2.29	1.67	0.175	-0.73	0.55	0.184	0.67	1.60	0.679
48-72 h	-0.53	1.28	0.680	-6.75	4.14	0.107	-0.96	1.16	0.412	3.58	1.54	0.022	-0.63	0.64	0.330	1.44	2.12	0.497

β = coefficiente di regressione; **ES (β)** = errore standard di β; **FVC** = capacità vitale forzata; **FEV₁** = volume espiratorio forzato in 1 secondo; **FEF₂₅₋₇₅** = flusso massimo midespiratorio; **FEV₁/FVC** = rapporto tra volume espiratorio forzato in 1 secondo e capacità vitale forzata (Indice di Tiffeneau); **NO** = monossido d'azoto nell'espirato (indicatore di infiammazione); **ppb** = parti per miliardo.

Tabella A4. Pane/BPCO: Variazioni della funzionalità respiratoria per incremento unitario nelle concentrazioni di alcuni metalli calcolate a partire dalle quantità rilevate nei campioni di PM2.5 corrette per condizioni meteorologiche, serie di monitoraggio e week-end (11 soggetti, circa 165 osservazioni)

Metallo	Cd			Cr			Fe			Pb			Pt			Ni			V			Zn		
Incremento	ng/m ³			ng/m ³			ng/m ³			ng/m ³			pg/m ³			ng/m ³			ng/m ³			ng/m ³		
Variable	β	ES	p	β	ES	p	β	ES	p	β	ES	p	β	ES	p	β	ES	p	β	ES	p	β	ES	p
FVC (%)																								
Precedenti:																								
24h	-1.46	1.66	0.379	-0.89	0.41	0.033	-0.01	0.005	0.018	-0.07	0.03	0.027	-0.11	0.06	0.092	-0.14	0.10	0.150	-0.25	0.66	0.701	-0.06	0.02	0.013
24-48 h	3.07	1.56	0.051	-0.65	0.39	0.100	-0.01	0.005	0.127	-0.03	0.03	0.445	0.01	0.09	0.877	-0.08	0.09	0.377	-0.44	0.68	0.522	-0.04	0.02	0.037
48-72h	2.02	1.53	0.187	-0.29	0.44	0.513	-0.003	0.004	0.467	0.02	0.04	0.588	0.16	0.06	0.010	-0.06	0.08	0.507	-0.38	0.54	0.478	-0.03	0.02	0.249
FEV₁ (%)																								
Precedenti:																								
24h	-0.73	1.28	0.567	-0.65	0.32	0.043	-0.01	0.004	0.011	-0.06	0.02	0.015	-0.09	0.05	0.056	-0.11	0.08	0.135	0.38	0.51	0.461	-0.04	0.02	0.012
24-48 h	0.59	1.22	0.628	-0.70	0.30	0.021	-0.01	0.004	0.073	-0.05	0.03	0.089	0.02	0.07	0.820	-0.01	0.07	0.833	0.17	0.52	0.742	-0.04	0.02	0.009
48-72h	1.80	1.20	0.137	-0.13	0.35	0.704	0.001	0.003	0.822	0.03	0.03	0.375	0.14	0.05	0.006	-0.01	0.07	0.933	0.06	0.42	0.888	-0.02	0.02	0.313
FEF₂₅₋₇₅ (%)																								
Precedenti:																								
24h	0.76	1.40	0.588	-0.72	0.40	0.075	-0.01	0.004	0.071	-0.05	0.03	0.094	-0.04	0.06	0.534	-0.11	0.09	0.238	0.38	0.56	0.502	-0.04	0.02	0.044
24-48 h	-1.51	1.28	0.241	-0.66	0.36	0.073	-0.01	0.004	0.107	-0.04	0.03	0.148	0.07	0.07	0.333	0.03	0.08	0.710	0.02	0.57	0.973	-0.03	0.02	0.088
48-72h	1.44	1.21	0.240	-0.26	0.39	0.505	-0.001	0.004	0.870	-0.01	0.03	0.706	0.04	0.05	0.425	0.02	0.08	0.773	0.01	0.47	0.981	-0.03	0.02	0.139

β = coefficiente di regressione

ES (β) = errore standard di β

FVC = capacità vitale forzata

FEV₁ = volume espiratorio forzato in 1 secondo

FEF₂₅₋₇₅ = flusso massimo midespiratorio

Tabella A5. Panel/IMA: variazioni della funzionalità respiratoria per incremento unitario nelle concentrazioni di alcuni metalli calcolate a partire dalle quantità rilevate nei campioni di PM_{2.5} corrette per condizioni meteorologiche, serie di monitoraggio e week-end (7 soggetti, circa 170 osservazioni)

Metallo	Cd			Cr			Fe			Pb			Pt			Ni			V			Zn		
Incremento	ng/m ³			ng/m ³			ng/m ³			ng/m ³			pg/m ³			ng/m ³			ng/m ³			ng/m ³		
Variable	β	ES	p	β	ES	p	β	ES	p	β	ES	p	β	ES	p	β	ES	p	β	ES	p	β	ES	p
FVC (%)																								
Precedenti:																								
24h	1.24	0.97	0.204	-0.17	0.32	0.607	-0.002	0.003	0.534	0.01	0.02	0.441	0.07	0.03	0.048	-0.03	0.04	0.484	-0.09	0.38	0.822	0.004	0.02	0.772
24-48 h	1.44	0.98	0.145	0.15	0.23	0.528	-0.0001	0.003	0.970	0.02	0.02	0.200	0.004	0.04	0.921	-0.005	0.05	0.918	-0.05	0.36	0.895	0.001	0.01	0.933
48-72h	0.94	0.89	0.291	0.09	0.25	0.728	0.003	0.002	0.206	0.03	0.02	0.218	0.01	0.04	0.742	-0.01	0.07	0.837	0.34	0.28	0.235	0.01	0.01	0.674
FEV₁ (%)																								
Precedenti:																								
24h	0.78	1.12	0.488	-0.11	0.37	0.760	-0.01	0.003	0.082	0.00	0.02	0.851	0.04	0.04	0.356	0.01	0.05	0.911	0.83	0.43	0.055	-0.01	0.02	0.772
24-48 h	1.39	1.13	0.221	0.16	0.27	0.558	0.0001	0.003	0.982	0.02	0.02	0.456	-0.01	0.05	0.859	0.01	0.05	0.924	-0.07	0.42	0.874	0.001	0.01	0.973
48-72h	1.67	1.02	0.104	-0.08	0.29	0.788	0.003	0.003	0.328	0.02	0.03	0.482	0.04	0.04	0.375	-0.08	0.08	0.329	-0.19	0.33	0.572	0.001	0.01	0.943
FEF₂₅₋₇₅ (%)																								
Precedenti:																								
24h	0.61	3.19	0.849	0.88	1.00	0.381	0.001	0.01	0.932	-0.03	0.06	0.684	0.05	0.12	0.681	0.05	0.18	0.763	0.27	1.35	0.840	0.05	0.05	0.333
24-48 h	1.88	3.46	0.588	0.29	0.75	0.699	0.01	0.01	0.123	0.04	0.06	0.535	-0.02	0.13	0.902	-0.04	0.17	0.834	-0.81	1.33	0.543	0.01	0.04	0.816
48-72h	4.70	2.86	0.104	0.42	0.81	0.601	0.02	0.01	0.061	0.09	0.07	0.239	0.15	0.13	0.248	0.04	0.21	0.866	0.76	1.02	0.457	0.04	0.04	0.283

Tabella A6. Panel Asmatici: variazioni della funzionalità respiratoria per incremento unitario nelle concentrazioni di alcuni metalli presenti nel PM_{2.5}, corrette per condizioni meteorologiche, serie di monitoraggio e week-end (11 soggetti, circa 100 osservazioni)

Metallo	Cd			Cr			Fe			Pb			Pt			Ni			V			Zn		
	ng/m ³			ng/m ³			ng/m ³			ng/m ³			pg/m ³			ng/m ³			ng/m ³			ng/m ³		
Variable	β	ES	p	β	ES	p	β	ES	p	β	ES	p	β	ES	p	β	ES	p	β	ES	p	β	ES	p
FVC (%)																								
Precedenti:																								
24h	-0.43	1.19	0.716	-0.54	0.24	0.026	-0.005	0.003	0.137	-0.03	0.02	0.242	-0.09	0.05	0.108	0.004	0.06	0.942	0.52	0.43	0.223	-0.03	0.01	0.057
24-48 h	0.65	1.30	0.621	-0.23	0.28	0.429	-0.01	0.003	0.023	-0.03	0.02	0.285	0.09	0.06	0.124	-0.03	0.05	0.506	0.46	0.45	0.316	-0.01	0.01	0.516
48-72h	0.27	0.90	0.765	0.04	0.25	0.878	-0.0002	0.003	0.934	0.004	0.02	0.884	0.01	0.08	0.941	-0.01	0.05	0.747	0.06	0.31	0.842	-0.004	0.01	0.754
FEV₁ (%)																								
Precedenti:																								
24h	0.18	1.68	0.915	-0.51	0.34	0.130	-0.01	0.004	0.116	-0.02	0.03	0.608	-0.07	0.08	0.354	0.06	0.08	0.443	0.11	0.60	0.861	-0.03	0.02	0.153
24-48 h	0.35	1.75	0.843	-0.08	0.38	0.833	-0.01	0.005	0.097	-0.02	0.03	0.577	0.17	0.08	0.033	-0.08	0.06	0.197	0.35	0.61	0.568	-0.01	0.02	0.688
48-72h	0.37	1.23	0.762	0.24	0.35	0.491	-0.002	0.004	0.576	0.01	0.03	0.673	0.01	0.10	0.954	-0.05	0.06	0.404	0.04	0.43	0.918	0.004	0.02	0.811
FEV₁/FVC (%)																								
Precedenti:																								
24h	0.22	0.85	0.792	-0.09	0.17	0.593	-0.002	0.002	0.294	0.001	0.02	0.924	0.01	0.04	0.876	0.03	0.04	0.489	-0.20	0.30	0.507	-0.01	0.01	0.590
24-48 h	-0.11	0.85	0.902	0.06	0.19	0.737	-0.001	0.002	0.651	0.003	0.02	0.859	0.06	0.04	0.117	-0.05	0.03	0.081	0.05	0.30	0.878	-0.001	0.01	0.932
48-72h	0.15	0.61	0.814	0.12	0.17	0.501	-0.001	0.002	0.656	0.01	0.02	0.563	0.01	0.05	0.842	-0.03	0.03	0.422	0.03	0.21	0.898	0.004	0.01	0.618
FEF₂₅₋₇₅ (%)																								
Precedenti:																								
24h	1.23	2.50	0.622	-0.77	0.50	0.129	-0.01	0.01	0.237	-0.03	0.05	0.507	-0.06	0.11	0.575	0.22	0.12	0.071	0.16	0.90	0.862	-0.06	0.03	0.049
24-48 h	1.10	2.53	0.664	0.20	0.55	0.720	-0.01	0.01	0.371	-0.01	0.05	0.849	0.31	0.11	0.005	-0.04	0.09	0.673	0.47	0.88	0.596	-0.01	0.03	0.772
48-72h	1.22	1.87	0.515	0.65	0.53	0.222	-0.004	0.01	0.473	0.03	0.05	0.532	-0.001	0.16	0.995	-0.07	0.10	0.442	0.04	0.65	0.954	0.01	0.03	0.641

β = coefficiente di regressione; **ES** (β) = errore standard di β ; **FVC** = capacità vitale forzata; **FEV₁** = volume espiratorio forzato in 1 secondo; **FEF₂₅₋₇₅** = flusso massimo midespiratorio; **FEV₁/FVC** = rapporto tra volume espiratorio forzato in 1 secondo e capacità vitale forzata (Indice di Tiffeneau); **NO** = monossido d'azoto nell'espirato (indicatore di infiammazione); **ppb** = parti per miliardo.

Tabella A7. Panel/BPCO e IMA: variazioni della saturazione di ossigeno massima dell'emoglobina (Max HbO₂ %) per incremento unitario nelle concentrazioni di materiale particolare (10 µg/m³) e di CO (1 mg/m³), corrette per condizioni meteorologiche, serie di monitoraggio e week-end

Inquinante	PM _{2.5} 10 µg/m ³			PM _{10-2.5} 10 µg/m ³			PM ₁₀ 10 µg/m ³			CO 1 mg/m ³		
Max HbO ₂ (%)	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p
a. Panel BPCO												
Stesso giorno	-0.31	0.09	0.001	-0.26	0.23	0.261	-0.23	0.07	0.003	-0.09	0.04	0.017
Precedenti:												
24h	-0.08	0.08	0.315	-0.18	0.25	0.481	-0.07	0.07	0.298	-0.03	0.03	0.376
24-48h	-0.03	0.08	0.692	0.16	0.24	0.505	-0.01	0.07	0.880	0.01	0.04	0.821
48-72h	0.0002	0.09	0.999	0.20	0.24	0.421	0.02	0.08	0.796	-0.01	0.03	0.873
b. Panel IMA												
Stesso giorno	-0.05	0.04	0.233	0.02	0.10	0.816	-0.03	0.03	0.387	0.01	0.03	0.686
Precedenti:												
24h	0.08	0.04	0.046	0.06	0.09	0.540	0.06	0.03	0.068	0.02	0.01	0.155
24-48h	0.05	0.03	0.124	0.04	0.09	0.680	0.04	0.03	0.157	0.02	0.01	0.225
48-72h	0.03	0.04	0.477	-0.02	0.10	0.870	0.02	0.03	0.577	-0.001	0.02	0.951

β = coefficiente di regressione
ES (β) = errore standard di β.

Tabella A8. Panel BPCO (11 pazienti): variazioni della frequenza e della variabilità del battito cardiaco per incremento unitario nelle concentrazioni di particolato ($10 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e di CO ($1 \text{ mg}/\text{m}^3$) corrette per condizioni meteorologiche, serie di monitoraggio e week-end

Inquinante	PM _{2.5}			PM _{10-2.5}			PM ₁₀			CO		
Incremento	10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$			10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$			10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$			1 mg/m^3		
Variable	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p
PULSOSSIMETRIA												
FC (battiti/min)												
Stesso giorno	2.89	0.86	0.001	1.03	2.17	0.636	1.96	0.70	0.007	0.61	0.36	0.095
Precedenti:												
24h	0.65	0.77	0.402	1.77	2.33	0.451	0.59	0.64	0.362	-0.09	0.32	0.772
24-48h	-0.16	0.75	0.832	0.60	2.27	0.791	-0.07	0.64	0.915	-0.21	0.38	0.575
48-72h	0.30	0.85	0.721	2.61	2.31	0.263	0.50	0.74	0.502	-0.09	0.32	0.770
HOLTER ECG 24 H												
Media NN (ms)												
Stesso giorno	-3.39	10.04	0.739	-3.53	28.46	0.903	-2.63	8.33	0.755	-4.67	3.52	0.198
Precedenti:												
24h	-3.94	8.67	0.655	-11.77	35.59	0.745	-3.65	7.69	0.640	-1.75	3.83	0.654
24-48h	13.01	7.23	0.089	60.26	31.20	0.069	12.96	6.33	0.055	6.16	3.49	0.092
48-72h	19.25	8.25	0.033	77.05	43.14	0.093	19.36	7.44	0.019	1.13	3.06	0.717
PNN50 (%)												
Stesso giorno	1.09	2.31	0.643	8.32	6.29	0.200	1.46	1.89	0.449	0.16	0.82	0.850
Precedenti:												
24h	0.03	2.03	0.988	8.41	8.09	0.312	0.42	1.80	0.818	0.16	0.87	0.853
24-48h	-0.09	1.83	0.960	-3.05	7.97	0.706	-0.20	1.64	0.903	-0.36	0.82	0.662
48-72h	-0.56	2.24	0.808	-4.02	11.08	0.721	-0.62	2.08	0.769	-1.18	0.66	0.090

FC = frequenza cardiaca; **Holter ECG 24 h** = registrazione Holter dell'elettrocardiogramma su 24 ore; **NN** = intervallo tra due complessi QRS adiacenti risultanti dalle depolarizzazioni del seno nodo; **PNN50 (%)** = percentuale di battiti consecutivi con variazioni dell'intervallo >50 msec (%).

Tabella A9. Panel IMA (11 pazienti): variazioni della frequenza e della variabilità del battito cardiaco per incremento unitario nelle concentrazioni di particolato ($10 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e di CO ($1 \text{ mg}/\text{m}^3$) corrette per condizioni meteorologiche, serie di monitoraggio e week-end

Inquinante	PM _{2.5}			PM _{10-2.5}			PM ₁₀			CO		
Incremento	10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$			10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$			10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$			1 mg/m^3		
Variabile	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p	β	ES (β)	p
PULSOSSIMETRIA												
FC (battiti/min)												
Stesso giorno	-0.15	0.32	0.638	-0.12	0.73	0.873	-0.11	0.25	0.668	-0.14	0.22	0.542
Precedenti:												
24h	-0.14	0.29	0.622	-0.56	0.69	0.421	-0.16	0.24	0.500	-0.10	0.09	0.262
24-48h	-0.25	0.22	0.264	-0.57	0.68	0.401	-0.22	0.18	0.239	-0.10	0.10	0.308
48-72h	-0.23	0.26	0.390	-0.04	0.70	0.959	-0.17	0.23	0.451	-0.05	0.12	0.681
HOLTER ECG 24 H												
Media NN (ms)												
Stesso giorno	-13.01	8.43	0.133	-36.95	23.98	0.134	-12.54	7.03	0.085	-7.35	6.66	0.279
Precedenti:												
24h	4.15	9.15	0.653	21.41	21.52	0.328	5.56	7.62	0.471	1.51	2.57	0.562
24-48h	3.21	5.92	0.592	14.10	17.61	0.430	3.42	4.99	0.499	1.24	2.52	0.627
48-72h	2.03	7.15	0.779	40.92	28.73	0.166	3.67	6.51	0.578	3.73	3.02	0.227
PNN50 (%)												
Stesso giorno	-1.07	0.95	0.270	-3.40	2.68	0.214	-1.07	0.80	0.191	-0.06	0.75	0.933
Precedenti:												
24h	0.93	1.00	0.362	-4.70	2.27	0.047	0.07	0.85	0.935	0.21	0.22	0.361
24-48h	1.31	0.63	0.048	-1.72	2.01	0.399	0.80	0.55	0.161	0.62	0.26	0.022
48-72h	1.75	0.78	0.033	-2.90	3.52	0.417	1.33	0.74	0.082	0.61	0.31	0.057

FC = frequenza cardiaca; **Holter ECG 24 h** = registrazione Holter dell'elettrocardiogramma su 24 ore; **NN** = intervallo tra due complessi QRS adiacenti risultanti dalle depolarizzazioni del seno nodo; **PNN50 (%)** = percentuale di battiti consecutivi con variazioni dell'intervallo >50 msec (%).

Allegato B
Andamenti temporali delle concentrazioni ambientali inquinanti
durante le due serie di monitoraggio

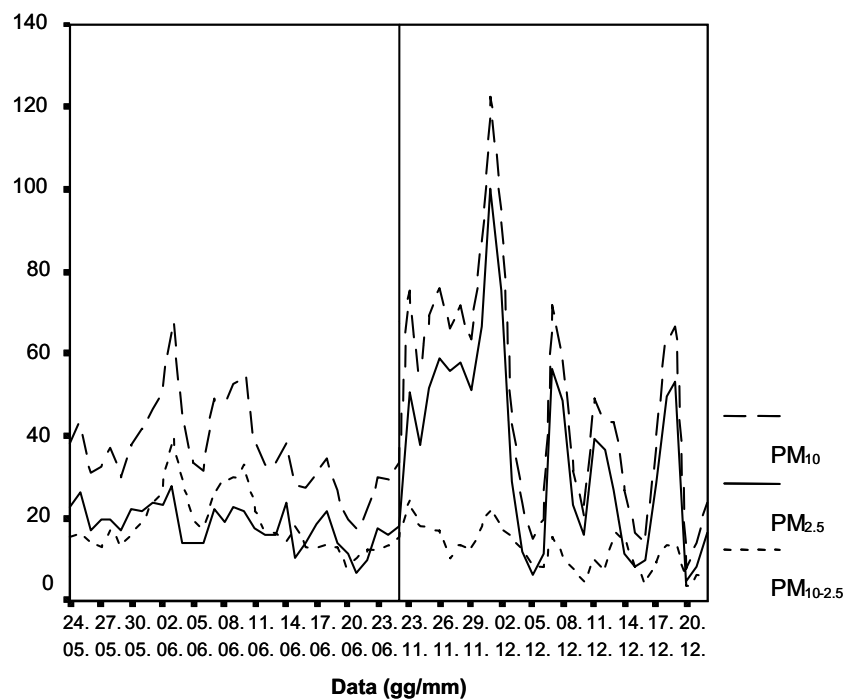


Figura B1. Andamento temporale delle concentrazioni ambientali di PM_{10} , $PM_{2.5}$ e frazione *coarse* ($\mu g/m^3$) durante le due serie di monitoraggio (estate e inverno 1999; medie giornaliere delle concentrazioni rilevate presso i siti dell'ISS e di Villa Ada)

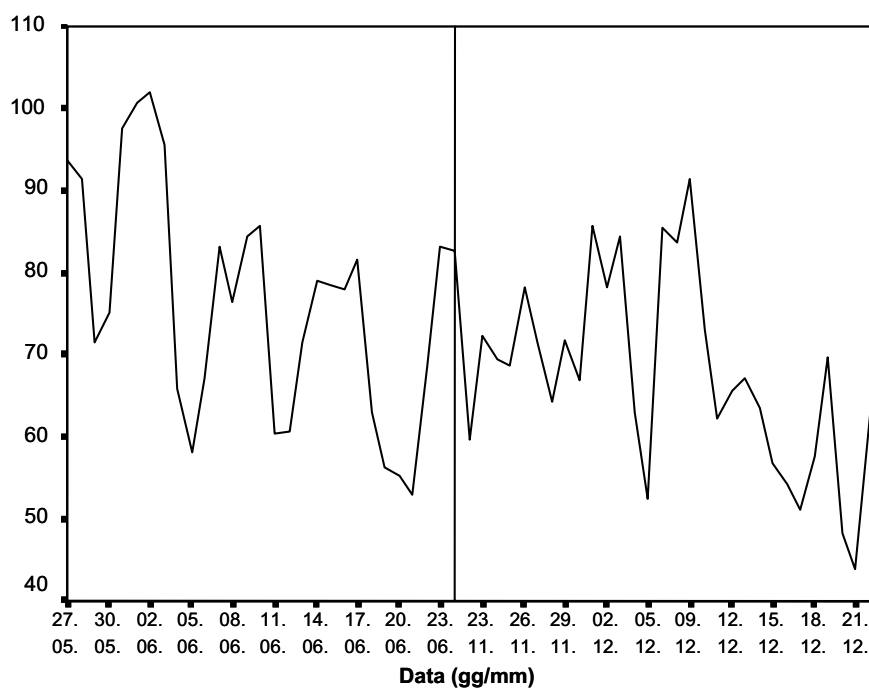


Figura B2. Andamento temporale delle concentrazioni ambientali di NO_2 ($\mu g/m^3$) durante le due serie di monitoraggio (estate e inverno 1999; medie giornaliere delle concentrazioni rilevate presso le stazioni di Magna Grecia, Villa Ada, Preneste, Fermi e Libia)

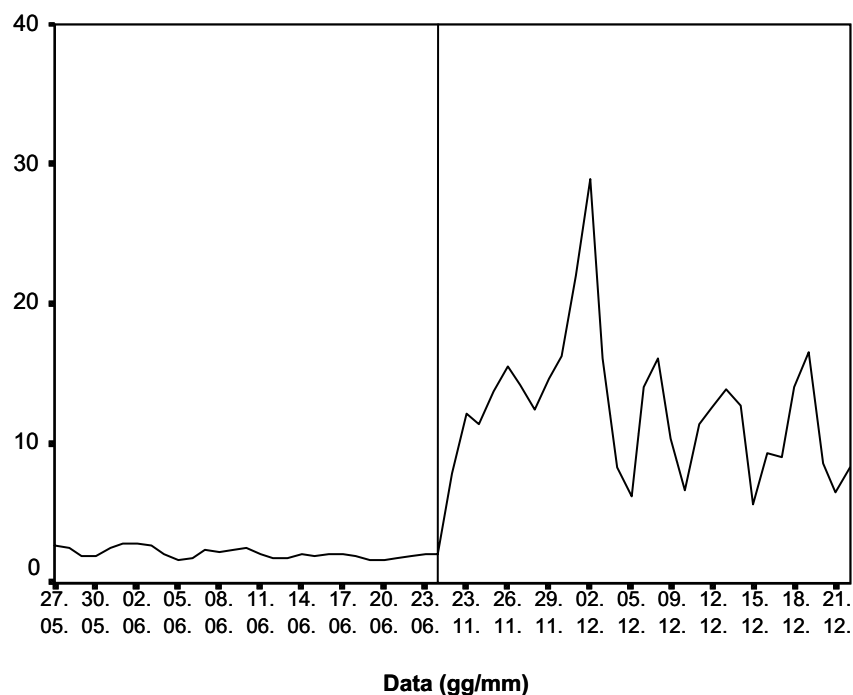


Figura 3B. Andamento temporale delle concentrazioni ambientali di CO (mg/m^3) durante le due serie di monitoraggio (estate e inverno 1999; medie giornaliere delle concentrazioni rilevate presso le stazioni di Magna Grecia, Villa Ada, Preneste, Fermi e Libia)

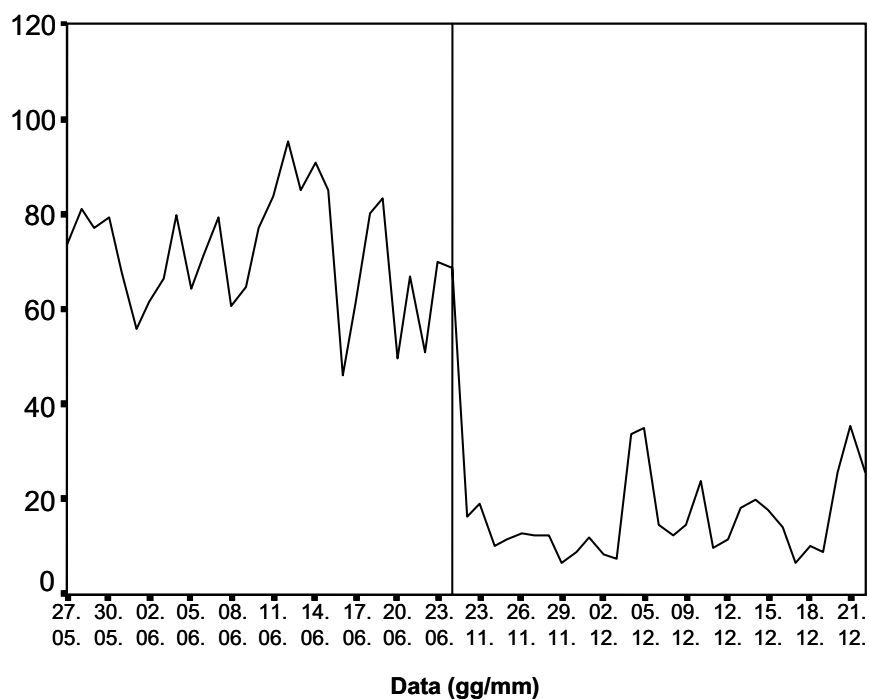


Figura B4. Andamento temporale delle concentrazioni ambientali di O₃ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) durante le due serie di monitoraggio (estate e inverno 1999; medie giornaliere delle concentrazioni rilevate presso le stazioni di Villa Ada e Preneste)

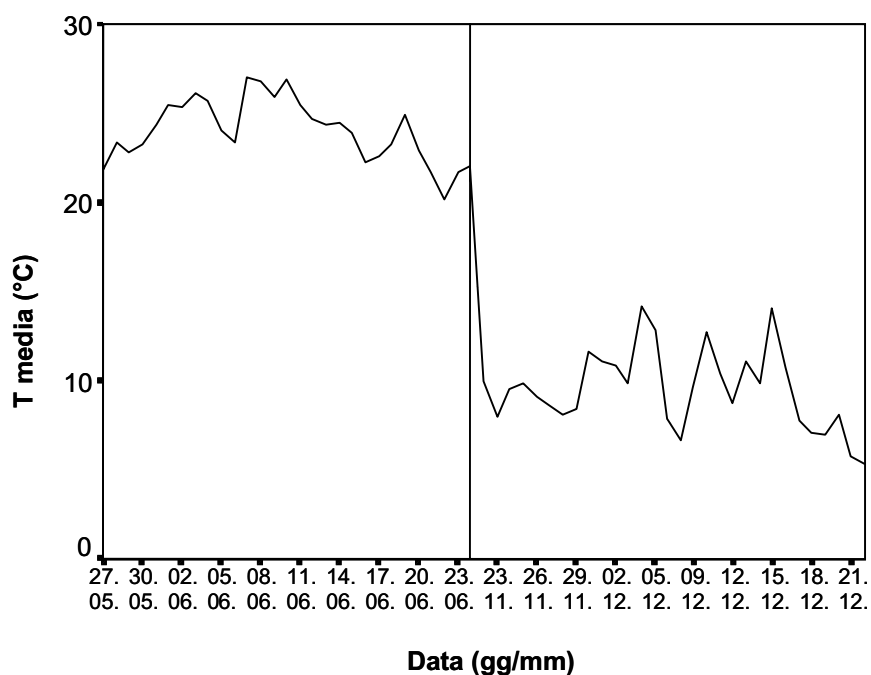


Figura B5. Andamento temporale dei valori di temperatura (°C) durante le due serie di monitoraggio (estate e inverno 1999)

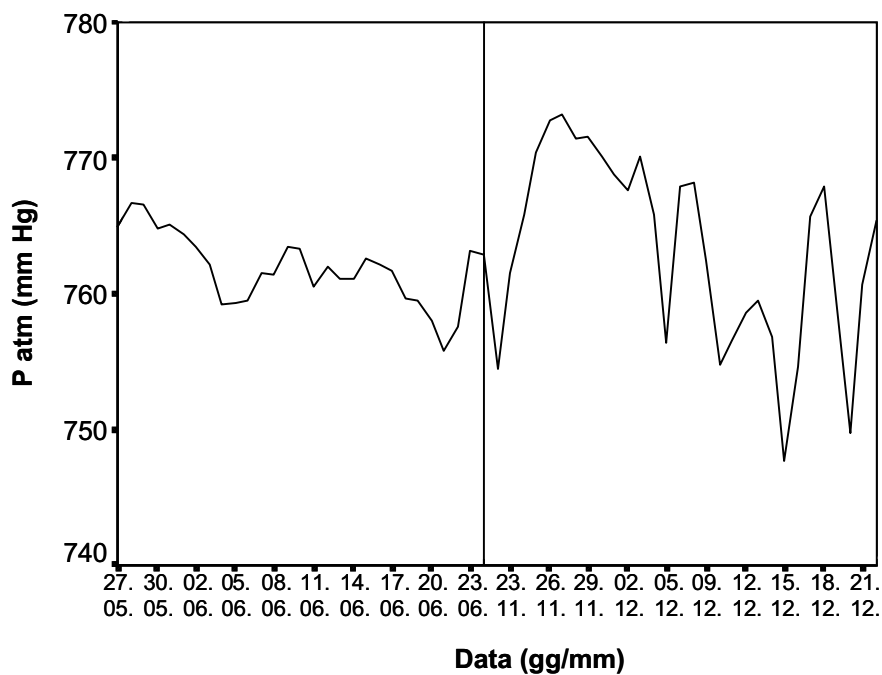


Figura B6. Andamento temporale dei valori di pressione atmosferica (mm Hg) durante le due serie di monitoraggio (estate e inverno 1999)

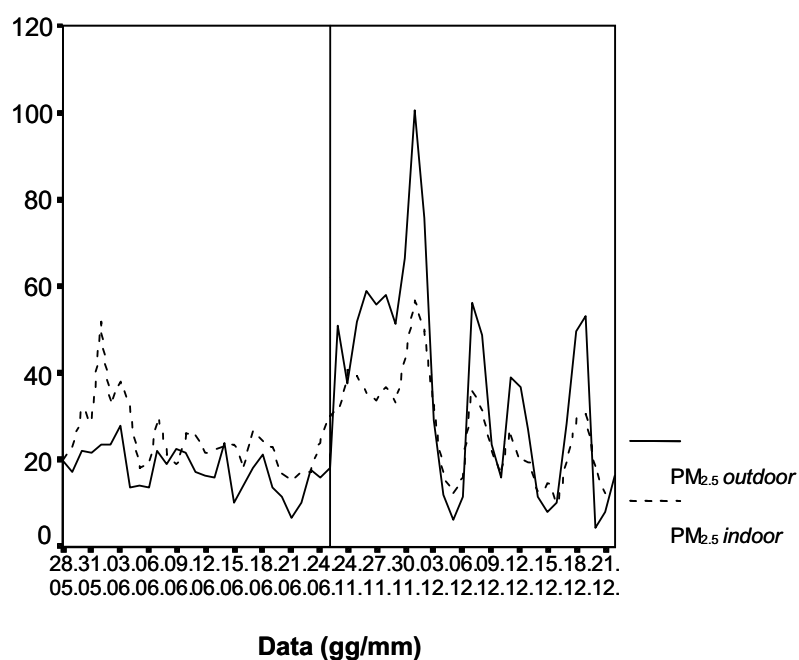


Figura B7. Andamento temporale delle concentrazioni PM 2.5 (mg/m^3) *outdoor* e *indoor* durante le due serie di monitoraggio (estate ed inverno 1999; medie giornaliere delle concentrazioni rilevate presso i siti dell'ISS e di Villa Ada e medie giornaliere delle concentrazioni rilevate all'interno delle abitazioni di 3 partecipanti allo studio)

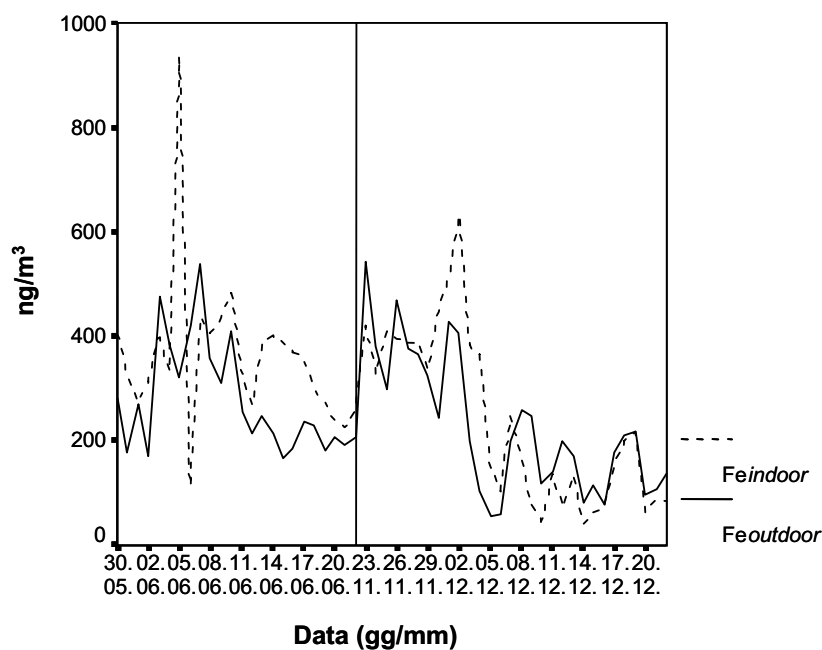


Figura B8. Andamento temporale delle concentrazioni di ferro (ng/m^3) determinate nei campioni di PM_{2.5} *outdoor* e *indoor* durante le due serie di monitoraggio (estate ed inverno 1999)

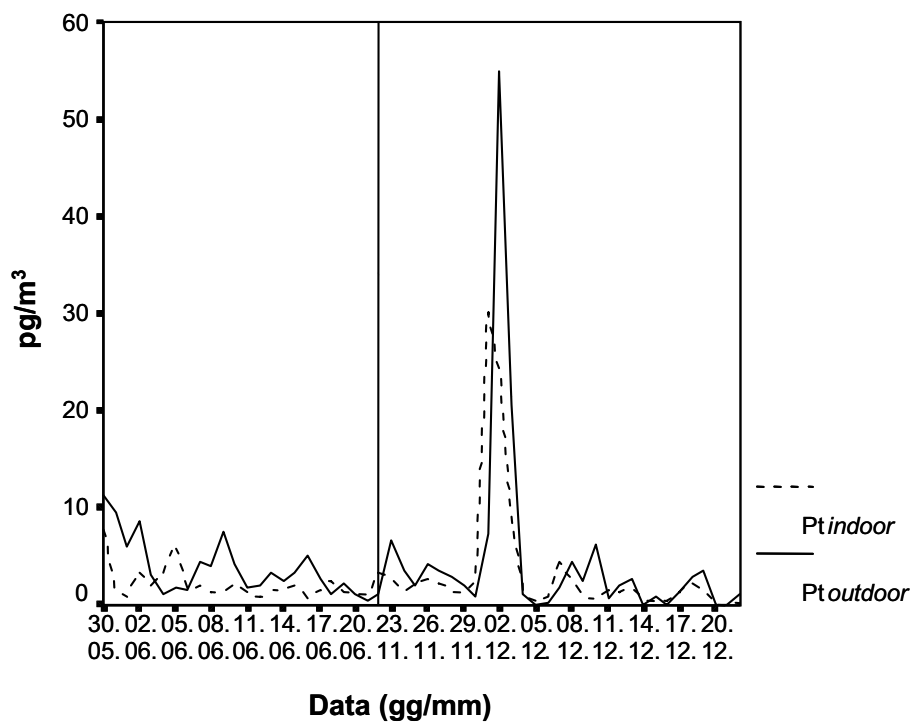


Figura B9. Andamento temporale delle concentrazioni di platino (pg/m^3) determinate nei campioni di $\text{PM}_{2.5}$ outdoor e indoor durante le due serie di monitoraggio (estate ed inverno 1999)

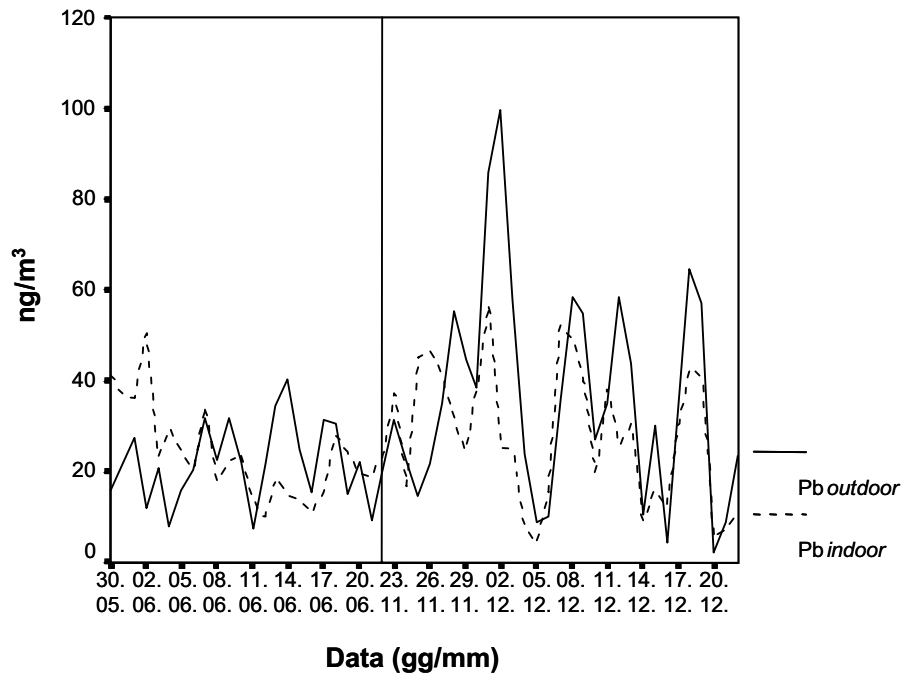


Figura B10. Andamento temporale delle concentrazioni di piombo (ng/m^3) determinate nei campioni di $\text{PM}_{2.5}$ outdoor e indoor durante le due serie di monitoraggio (estate ed inverno 1999)

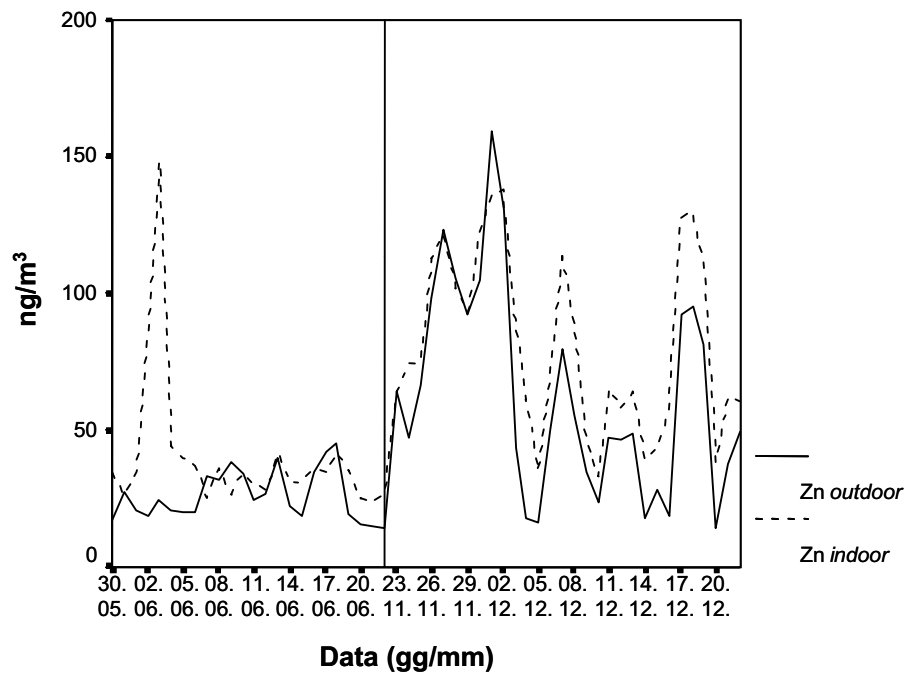


Figura B11. Andamento temporale delle concentrazioni di zinco (ng/m^3) determinate nei campioni di $\text{PM}_{2.5}$ outdoor e indoor durante le due serie di monitoraggio (estate ed inverno 1999)

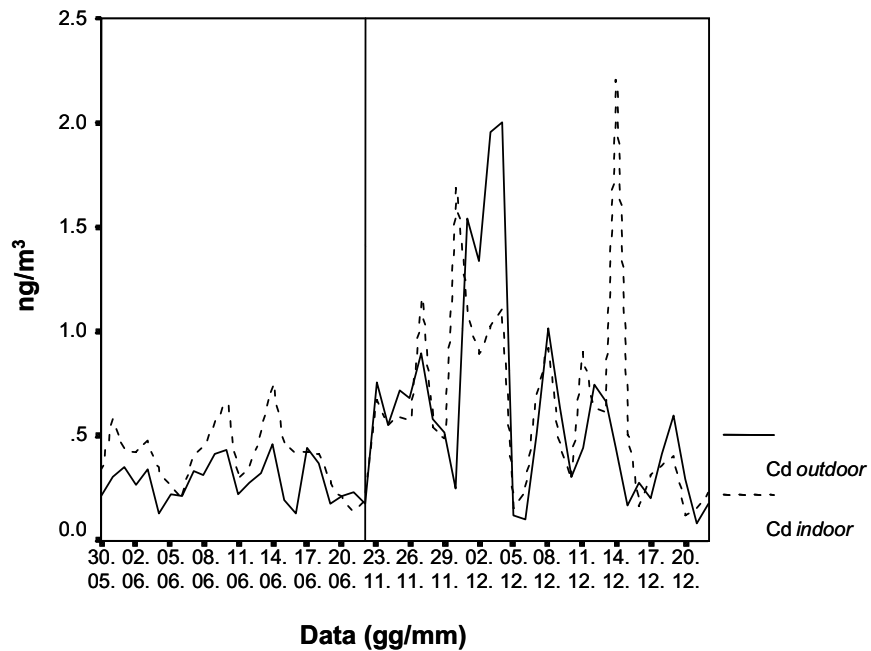


Figura B12. Andamento temporale delle concentrazioni di cadmio (ng/m^3) determinate nei campioni di $\text{PM}_{2.5}$ outdoor e indoor durante le due serie di monitoraggio (estate ed inverno 1999)

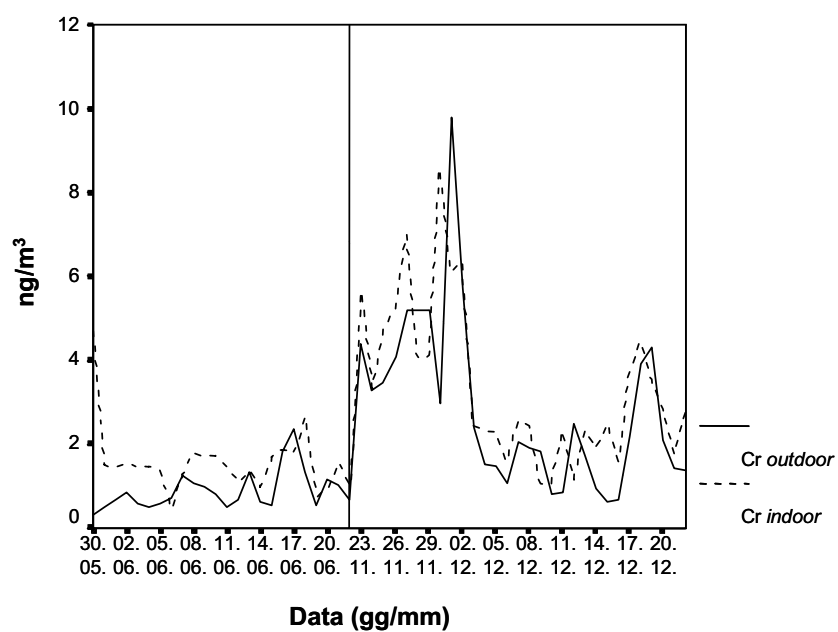


Figura B13. Andamento temporale delle concentrazioni di cromo (ng/m³) determinate nei campioni di PM_{2.5} outdoor e indoor durante le due serie di monitoraggio (estate ed inverno 1999)

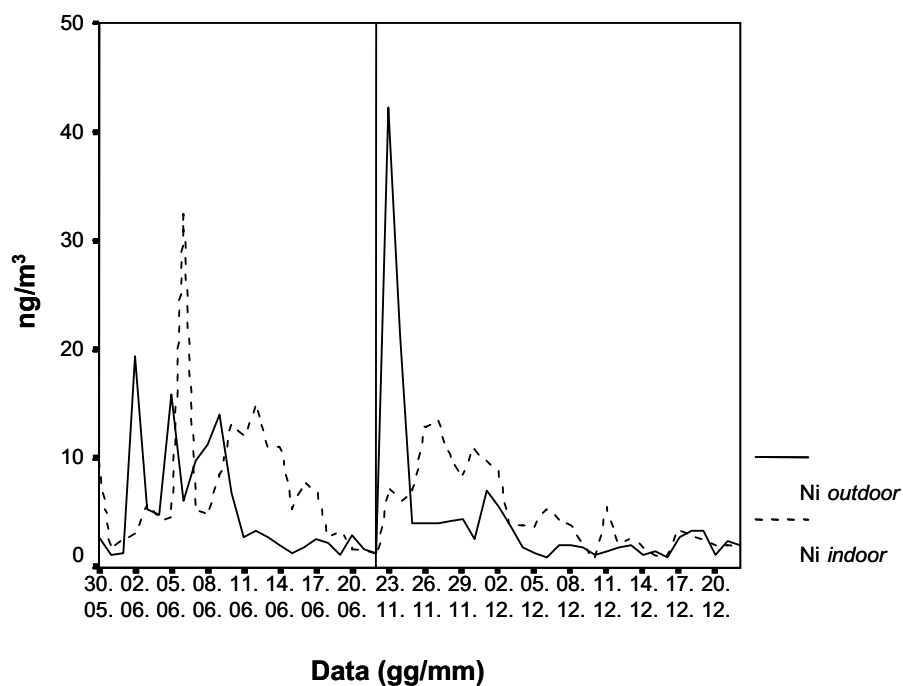


Figura B14. Andamento temporale delle concentrazioni di nichel (ng/m³) determinate nei campioni di PM_{2.5} outdoor e indoor durante le due serie di monitoraggio (estate ed inverno 1999)

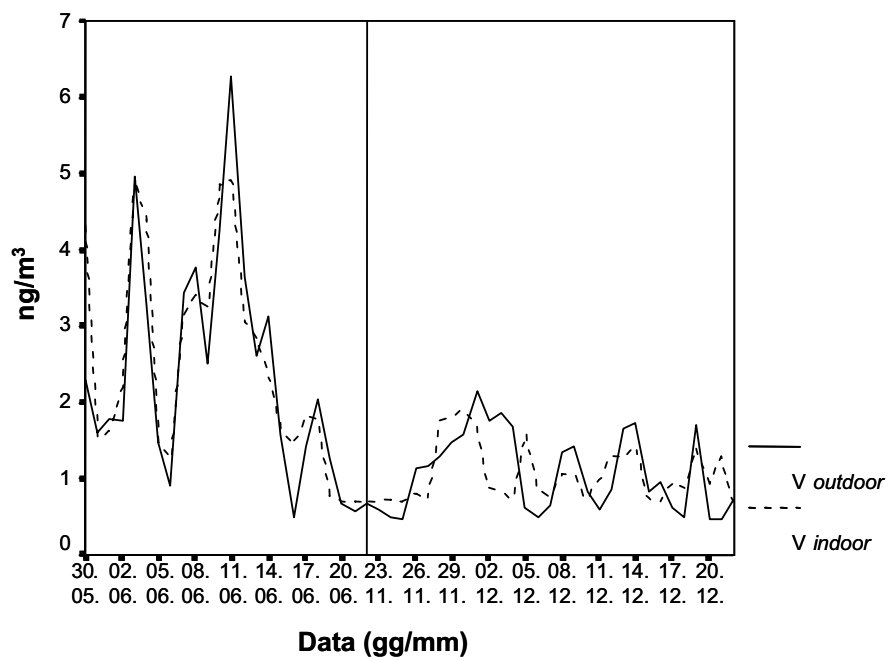


Figura B15. Andamento temporale delle concentrazioni di vanadio (ng/m³) determinate nei campioni di PM_{2.5} outdoor e indoor durante le due serie di monitoraggio (estate ed inverno 1999)

MONITORAGGIO BIOLOGICO DELL'ESPOSIZIONE AD INQUINANTI ATMOSFERICI NEI VIGILI URBANI DEL COMUNE DI ROMA

Riccardo Crebelli (a), Andrea Zijno (a), Paola Leopardi (a), Francesca Marcon (a), Luigi Conti (a), Cristina Andreoli (a), Sabrina Rossi (a), Angelo Carere (a), Stefania Caiola (b), Francesco Tomei (c), Agnese Martini (c), Laura Marcellini (c), Alessandra Verdina (d), Rossella Galati (d), Sergio Ghittori (e), Marcello Imbriani (e)

(a) *Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Laboratorio di Biochimica Clinica, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Istituto di Medicina del Lavoro, Università "La Sapienza", Roma,*

(d) *Laboratorio di Biochimica, Istituto Regina Elena, Roma*

(e) *Fondazione Salvatore Maugeri, Pavia*

Introduzione

L'inquinamento atmosferico costituisce uno dei principali problemi sanitari nelle aree urbane. Il massivo impiego di combustibili fossili per l'autotrazione, il riscaldamento domestico e la produzione di energia comporta l'immissione nell'atmosfera di numerose sostanze con dimostrata attività mutagenica e cancerogena, quali il benzene, l'1,3-butadiene, il benzo(a)pirene, in aggiunta ai tradizionali inquinanti gassosi e le polveri. Ciò ha portato in primo piano l'attenzione sui rischi di effetti irreversibili (danni genetici, tumori) nelle popolazioni urbane, a fianco delle patologie a carico degli apparati respiratorio e cardiocircolare (1). Al momento attuale le conoscenze e le evidenze scientifiche necessarie per formulare delle stime attendibili sul rischio di effetti irreversibili correlato alla esposizione ad inquinanti atmosferici sono carenti. La complessità e molteplicità degli agenti coinvolti, variabile in funzione delle condizioni ambientali, il possibile intervento di fenomeni di sinergismo, le difficoltà nella estrapolazione degli effetti alle basse dosi, sono alcuni dei fattori che ostacolano la valutazione della dimensione di tale rischio e l'identificazione dei fattori che ne sono responsabili.

In questo progetto, per valutare il significato della esposizione ad inquinanti atmosferici in relazione al rischio di effetti genotossici, è stato condotto uno studio di biomonitoraggio sui vigili urbani del Comune di Roma. Questi lavoratori costituiscono una popolazione modello per valutare le conseguenze della esposizione ad inquinanti atmosferici nell'ambiente urbano, mostrando un profilo di esposizione simile a quello di altri lavoratori *outdoor* (giornalai, ambulanti, ecc), e più in generale della popolazione urbana che trascorre parte della giornata all'esterno per spostamenti o altre attività. Lo studio ha riguardato l'analisi di biomarcatori di esposizione, suscettibilità individuale ed effetti genetici precoci. Questi ultimi sono particolarmente informativi nel caso di esposizioni ambientali complesse, come quella relativa agli inquinanti atmosferici, in quanto forniscono una stima integrata dell'effetto indotto da molteplici agenti, tenendo conto dei possibili fattori di variabilità individuale nella risposta all'esposizione agli xenobiotici (capacità riparativa, fenotipo metabolico, ecc.). Tra i biomarcatori di effetto, particolare rilievo è stato dato nell'indagine all'analisi dei marcatori di danni genotossici (alterazioni cromosomiche, danni al DNA), che segnalano l'induzione di effetti biologici precoci potenzialmente associati ad un aumentato rischio di patologie irreversibili (2).

Disegno sperimentale

Per realizzare l'indagine sono stati arruolati, in collaborazione con il Comando di Polizia Municipale della città di Roma, 206 vigili urbani (152 uomini e 54 donne) addetti al controllo della viabilità in zone a medio-alto traffico veicolare o a mansioni amministrative. In particolare sono stati individuati tre gruppi:

- *Gruppo A*
viabilisti del centro storico (I Circoscrizione, 72 soggetti);
- *Gruppo B*
viabilisti di zone semiperiferiche ad alto traffico (VIII Circoscrizione, Casilina, e XX Circoscrizione, Cassia Flaminia, 71 soggetti);
- *Gruppo C*
addetti ad attività di tipo amministrativo svolte prevalentemente *indoor*, con funzione di controlli, in forza al Comando e a vari Gruppi Circoscrizionali (63 soggetti).

Rapporto tra sessi, età anagrafica e anzianità lavorativa sono risultati confrontabili nei tre sottogruppi. Le caratteristiche demografiche della popolazione arruolata nell'indagine sono mostrate nella Tabella 1. Tutti i soggetti hanno firmato un documento di consenso informato prima di partecipare allo studio. Tutto il materiale potenzialmente sensibile (campioni biologici, schede anamnestiche, dosimetri personali) sono stati codificati e inviati in ISS in forma rigorosamente anonima.

Tabella 1. Monitoraggio biologico dei vigili urbani del Comune di Roma: caratteristiche demografiche della popolazione arruolata nell'indagine

Gruppo	n.	sex (m/f)	età (m±DS)	anzianità lavorativa (m±DS)
A – Viabilisti, I Gruppo Circoscrizionale	72	53/19	41.8±7.7	12.4±6.7
B – Viabilisti, VIII e XX Gruppo Circoscrizionale	71	54/17	41.0±7.3	12.0±6.7
C - Amministrativi	63	45/18	43.3±5.5	11.7±6.6
Totale	206	152/54	42.0±7.0	12.1±6.6

Su tutti i soggetti sono stati effettuati a cura del Comune di Roma gli accertamenti sanitari di base e gli esami ematochimici routinari. Nell'ambito di questo progetto sono state invece eseguite le seguenti ulteriori indagini:

- dosimetria personale della esposizione a benzene e alchil derivati;
- monitoraggio biologico della esposizione a benzene (acido trans-trans-muconico e fenilmercapturico urinari, benzene ematico) e idrocarburi policiclici aromatici (1-idrossipirene urinario);
- analisi di marcatori di effetti biologici precoci (alterazioni citogenetiche e danni al DNA) nelle cellule del sangue;
- determinazione del genotipo metabolico per alcuni enzimi coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici o nel metabolismo dei folati, corredata dalle pertinenti analisi biochimiche (omocisteina, vitamina B12 e acido folico plasmatici);
- determinazione di anticorpi anti-benzo(a)pirene-DNA addotto nel siero;

- analisi di un pannello di ormoni indicatori di stress cronico: DeidroEpiAndrosterone Solfato (DEAS), prolattina, cortisolo, testosterone plasmatici.

Per comodità di lettura i dettagli sperimentali e i risultati relativi alle singole indagini sono presentati separatamente nei paragrafi seguenti.

Biomarcatori di esposizione

Dosimetria personale della esposizione a benzene e alchil derivati

Per valutare l'intensità della esposizione occupazionale a benzene e altri composti aromatici, sono state effettuate su tutti i vigili misure di esposizione personale durante il turno lavorativo antimeridiano (7.00-14.00) utilizzando campionatori a diffusione radiale Radiello® (Fondazione S. Maugeri, Pavia) equipaggiati con fiala di carbone attivo. Ogni soggetto ha contribuito con una singola misura. Al fine di ottenere una adeguata rappresentatività a livello di gruppo (A, B, o C), le misure di esposizione sono state condotte secondo un calendario *ad hoc*, con l'analisi di piccoli gruppi di costituzione omogenea (in linea di massima un soggetto per ciascuno dei sottogruppi A, B, e C) per quattro giorni a settimana (dal lunedì al giovedì). In tal modo il monitoraggio dell'esposizione si è diluito lungo un arco di tempo relativamente esteso (dicembre 1998-giugno 1999), coprendo differenti situazioni ambientali e meteorologiche, minimizzando il peso di eventuali situazioni ambientali particolari.

La distribuzione dei valori di esposizione esterna a benzene (7 h TWA, *Time Weighted Average*), misurati nel corso dello studio nei vigili viabilisti (gruppi A e B) e nei soggetti con mansioni amministrative (gruppo C), è mostrata nella Figura 1.

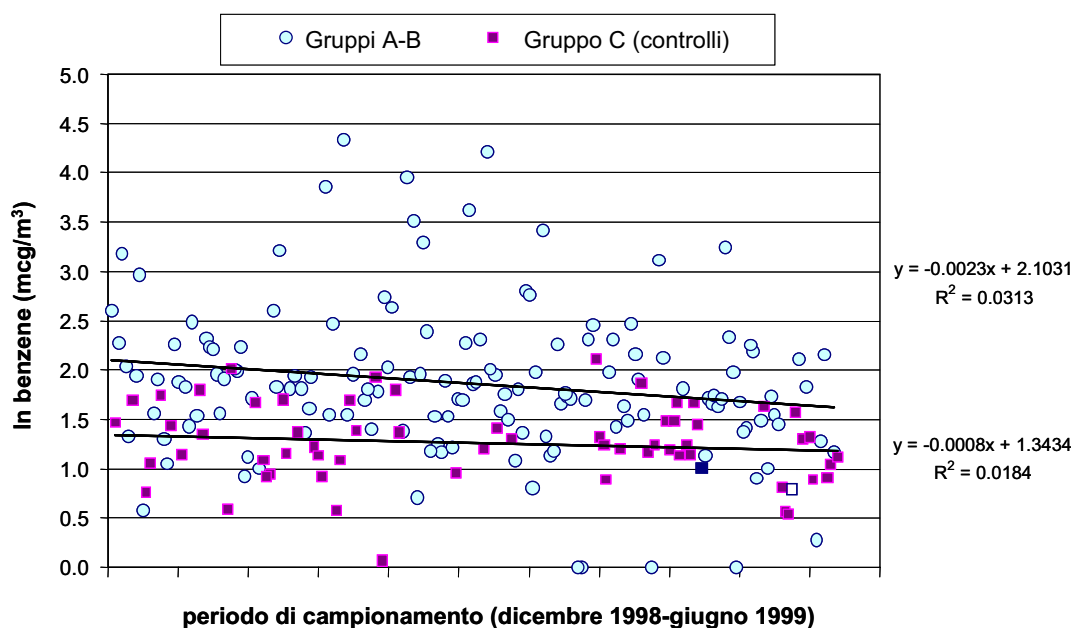


Figura 1. Distribuzione dei valori di esposizione personale a benzene in vigili addetti al controllo del traffico e in vigili con mansioni di ufficio (ogni valore corrisponde ad una misura spot effettuata su un diverso soggetto nel corso del periodo dicembre 1998-giugno 1999)

Le linee di tendenza mostrano una leggera tendenza verso valori più bassi, coerente con la variazione stagionale dei livelli di idrocarburi aromatici nell'aria urbana registrata dalle centraline del PMP di Roma. Si può ritenere che, per il numero elevato di soggetti studiati, l'indagine fornisca una stima realistica, anche se approssimativa, del livello medio di esposizione a benzene dell'intera popolazione dei vigili urbani attraverso l'integrazione di molteplici misure che riflettono, oltre a variazioni ambientali, anche la variabilità dei *pattern* di esposizione personale.

La parallela determinazione quantitativa di toluene, etilbenzene, m-, p-, e o-xilene, ha mostrato una stretta correlazione tra le concentrazioni di benzene e dei suoi derivati alchilati, con valori di $r > 0.7$ in tutti i casi. L'esistenza di una correlazione tra i livelli ambientali di benzene e dei suoi derivati alchilati è peraltro ben nota, e rispecchia la comune origine da attività antropiche.

L'aggregazione dei dati per sottogruppo (Tabella 2 e Figura 2) mostra una netta differenza tra i valori medi di esposizione a benzene e derivati alchilici tra lavoratori con mansioni prevalentemente amministrative svolte *indoor* (gruppo C) e i viabilisti di entrambi i gruppi (A e B) ($p < 0.0001$ per tutti gli inquinanti considerati). L'intervallo di valori di esposizione personale a benzene nei viabilisti e negli amministrativi è risultato solo parzialmente sovrapponibile: 42 misure su 143 effettuate sui viabilisti sono infatti risultate superiori al valore più alto misurato negli amministrativi ($8.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Complessivamente i livelli di esposizione esterna a benzene non appaiono significativamente influenzati dall'abitudine al fumo, né tra i viabilisti (gruppi A e B), né tra gli amministrativi (gruppo C).

Tabella 2. Esposizione a benzene e alchil benzeni nei vigili urbani del Comune di Roma ($\mu\text{g}/\text{m}^3$ media su 7 ore)

Inquinante	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C
Benzene			
mediana	5,6	6,9	3,4
min-max	1,3-37,6	2,0-76,7	1,1-8,3
75° percentile	7,9	10,1	4,4
90° percentile	11,0	24,9	5,7
Toluene			
mediana	24,0	22,2	11,5
min-max	4,7-189,6	5,0-255,6	1,2-41,8
75° percentile	38,3	35,7	15,9
90° percentile	52,9	70,7	22,7
Etilbenzene			
mediana	4,5	5,2	2,5
min-max	0,4-34,6	1,2-75,3	0,5-10,8
75° percentile	7,4	7,1	3,4
90° percentile	10,5	19,0	4,6
m,p-xilene			
mediana	17,0	20,2	9,0
min-max	1,1-144,4	3,0-263,7	1,2-37,2
75° percentile	24,9	28,7	12,4
90° percentile	37,6	63,7	18,1
o-xilene			
mediana	6,9	8,7	3,8
min-max	1,1-56,2	0,6-110,9	0,8-12,8
75° percentile	10,4	11,7	5,2
90° percentile	15,5	25,3	7,3

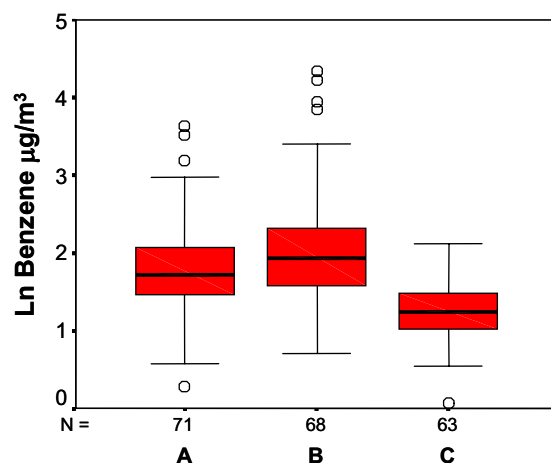


Figura 2. Distribuzione dei valori logaritmici di esposizione a benzene nei tre gruppi di vigili urbani. Ogni scatola rappresenta l'intervallo interquartile tra il 25° e il 75° percentile e la linea orizzontale interna il valore mediano. Le linee verticali rappresentano l'intervallo dei valori che cadono entro 1,5 volte la lunghezza della scatola. I cerchi rappresentano gli *outlier* con valori superiori od inferiori ad 1,5 volte l'intervallo della scatola

La disaggregazione dei dati in base alla specifica attività svolta durante il turno lavorativo non ha indicato differenze sistematiche tra viabilisti con diverse mansioni. È interessante sottolineare tuttavia che i due valori massimi misurati riguardano soggetti in servizio di autopattuglia (Figura 3): ciò suggerisce che nell'ambiente confinato dell'autovettura possano, in determinate condizioni, realizzarsi concentrazioni di benzene relativamente elevate.

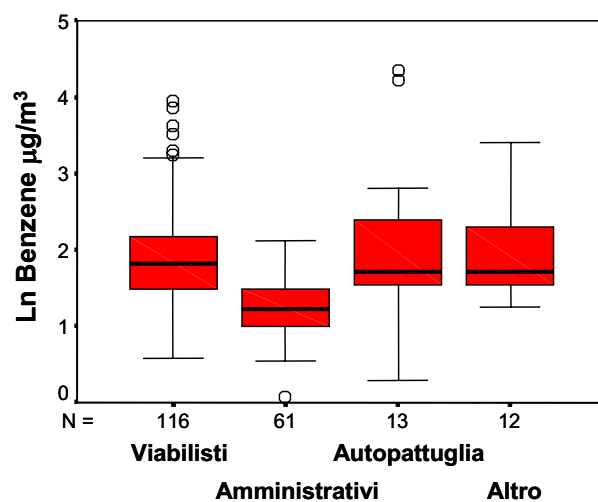


Figura 3. Distribuzione dei valori logaritmici di esposizione a benzene in vigili urbani con differenti mansioni

Nel corso dello studio è stata anche valutata la relazione tra l'intensità dell'esposizione personale a benzene nei vigili e il livello di inquinamento ambientale da questo cancerogeno. A

tal fine sono stati utilizzati i dati (medie orarie) delle centraline di monitoraggio di Viale Libia, Via Tiburtina, Piazza Magna Grecia e Villa Ada relativi ai turni di lavoro in cui è stato effettuato il monitoraggio personale. Le quattro centraline hanno fornito dati altamente intercorrelati ($r > 0.5$), rappresentativi dell'andamento complessivo del livello di inquinamento nell'intera area urbana. La concentrazione media di benzene misurata nel corso dell'indagine è risultata confrontabile al livello medio di esposizione dei viabilisti, e significativamente più alta di quella misurata per in lavoratori *indoor*: 13.1 ± 3.9 , 9.3 ± 11.0 , e $3.8 \pm 1.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$, rispettivamente. Il confronto tra le misure di esposizione personale dei viabilisti e i livelli ambientali di benzene misurati contemporaneamente ha però mostrato una correlazione solo marginale (Figura 4): in particolare, i valori *outlier* di esposizione personale non sono risultati associati a episodi di elevato inquinamento ambientale, suggerendo il contributo di sorgenti puntiformi o di fenomeni di inquinamento localizzato.

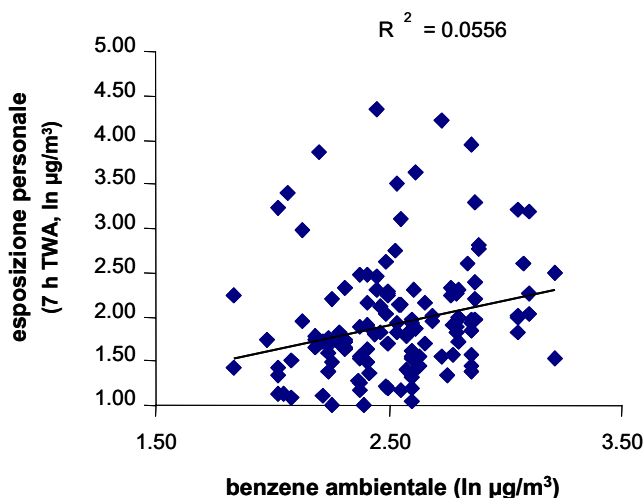


Figura 4. Correlazione tra misure di esposizione personale a benzene e livelli ambientali di benzene misurati durante il turno lavorativo (media di quattro centraline)

Biomarcatori di esposizione a benzene e idrocarburi policiclici aromatici

Parallelamente alla determinazione della esposizione esterna attraverso il campionamento passivo dell'aria nella zona inalatoria, per tutti i soggetti studiati sono stati effettuati prelievi di sangue e urina ad inizio e fine turno per l'analisi di alcuni biomarcatori specifici per la esposizione al benzene, in grado di indicare il livello di dose interna per questo cancerogeno. In particolare sono stati analizzati tre marcatori complementari dal punto di vista metabolico e farmacocinetico, cioè il benzene ematico, che rispecchia la quota non metabolizzata in equilibrio con la concentrazione alveolare, e due metaboliti urinari, l'acido *trans*-muconico (*Trans-Muconic acid*, TMA) ed S-fenil mercapturico (*S-PhenylMercapturic acid*, S-PMA) che rappresentano rispettivamente un catabolita e un prodotto specifico di reazione del benzene, in grado di accumularsi durante il periodo di esposizione. Le relative analisi di laboratorio sono state effettuate presso la Fondazione Salvatore Maugeri di Pavia, secondo metodiche pubblicate precedentemente (3-5). In aggiunta ai biomarcatori di esposizione a benzene, su un sotto gruppo di soggetti non fumatori (66 viabilisti e 33 amministrativi) è stata misurata l'escrezione urinaria

di 1-pirenolo, un prodotto di idrossilazione enzimatica del pirene ritenuto un affidabile indicatore della esposizione a Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA). Le analisi sono state effettuate dall'Università di Padova (S. Pavanello, Cattedra di Medicina del Lavoro) secondo la metodica di HPLC in fluorescenza (6).

I risultati dell'analisi dei tre biomarcatori ad inizio e fine turno sono riassunti nella Tabella 3. I dati non mostrano differenze significative tra i tre gruppi di esposizione per i tre marcatori analizzati. Si osserva in generale un incremento nei valori dall'inizio alla fine del turno lavorativo, senza apparente relazione con il gruppo di appartenenza né con i valori di esposizione esterna al benzene misurati con i dosimetri personali. Ciò suggerisce che altri fattori, diversi dalla esposizione al traffico autoveicolare, hanno un peso prevalente nel modulare i livelli dei biomarcatori studiati. Tra questi, il fumo di tabacco sembra avere un ruolo importante, almeno per quanto riguarda l'acido *trans*-muconico e fenil mercapturico urinari. I valori di questi biomarcatori sono infatti risultati significativamente più elevati nei fumatori rispetto ai non fumatori ($p=0.05$ e $p=0.01$ per acido *trans*-muconico e fenil mercapturico, rispettivamente).

Tabella 3. Marcatori di esposizione interna a benzene nei vigili urbani del comune di Roma

Biomarcatore (unità di misura)		Gruppo A (n.=72)		Gruppo B (n.=71)		Gruppo C (n.=63)	
		<i>inizio turno</i>	<i>fine turno</i>	<i>inizio turno</i>	<i>fine turno</i>	<i>inizio turno</i>	<i>fine turno</i>
Benzene ematico ($\mu\text{g/l}$)	<i>media</i>	186,32	219,85	167,28	196,80	194,42	195,90
	<i>DS</i>	59,34	136,15	46,80	61,59	178,59	117,44
	<i>mediana</i>	184,50	195,50	172,00	185,00	171,00	180,00
t,t-muconico urinario ($\mu\text{g/g}$ creatinina)	<i>media</i>	80,66	129,60	82,38	97,00	72,19	125,40
	<i>DS</i>	109,73	269,95	140,89	229,96	58,59	149,55
	<i>mediana</i>	56,50	87,50	47,00	61,00	53,00	79,00
S-PMA urinario ($\mu\text{g/g}$ creatinina)	<i>media</i>	1,68	2,58	1,79	2,64	2,14	2,72
	<i>DS</i>	1,17	1,85	1,94	1,80	1,26	1,41
	<i>mediana</i>	1,40	2,20	1,15	2,30	2,00	2,50

Una differenza significativa, o prossima alla significatività statistica, è stata osservata anche confrontando sottogruppi di fumatori e non fumatori omogenei per mansione (cioè solo viabilisti o solo amministrativi), rinforzando la plausibilità dell'ipotesi dell'effetto del fumo (Figure 5 e 6).

L'analisi dell'1-pirenolo urinario non ha mostrato differenze significative tra viabilisti e amministrativi (0.8 ± 0.8 vs 0.9 ± 0.2 $\mu\text{mol/l}$ mole di creatinina, rispettivamente). Una analisi di regressione multipla per passi in avanti dei dati di escrezione urinaria di pirenolo, considerando come variabili indipendenti l'occupazione, la stagione, l'esposizione personale a benzene e i livelli ambientali di benzene (considerati un indice polivalente di inquinamento atmosferico) ha mostrato una significativa ($p>0.001$) associazione tra la stagione invernale e più elevati livelli di escrezione di 1-pirenolo. Un simile *trend* stagionale è stato osservato per l'escrezione di acido *trans*-muconico, coerente con il parallelo andamento stagionale nel livello di inquinamento atmosferico registrato a Roma negli ultimi anni. I risultati di questi studi sono stati pubblicati *in extenso* separatamente (7, 8).

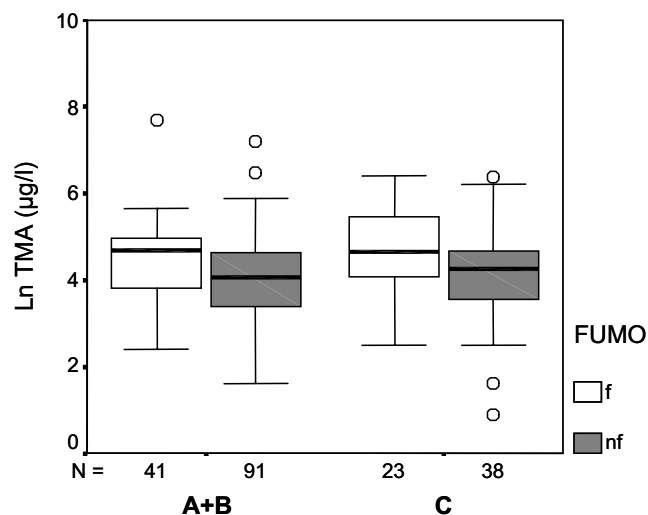


Figura 5. Distribuzione dei logaritmi dei valori di TMA urinario in viabilisti (gruppi A e B) e amministrativi (gruppo C) fumatori e non fumatori. Fumatori vs non fumatori: $p=0.06$ (viabilisti) e $p=0.02$ (amministrativi) (t test ad 1 coda)

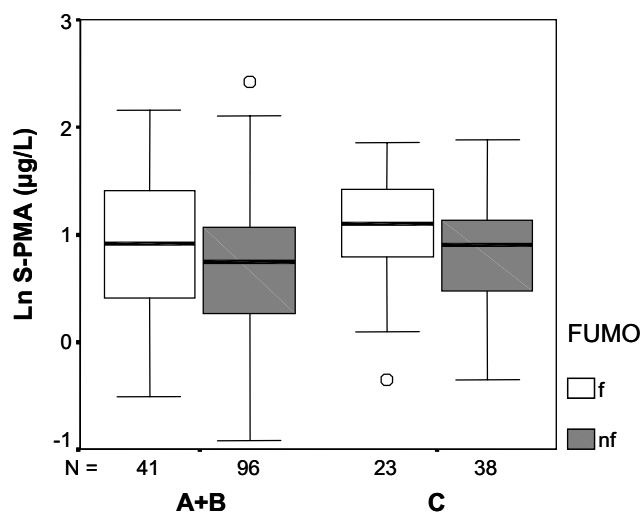


Figura 6. Distribuzione dei valori di S-PMA urinario in viabilisti (gruppi A e B) e amministrativi (gruppo C) fumatori e non fumatori. Fumatori vs non fumatori: $p=0.01$ (viabilisti) e $p=0.05$ (amministrativi) (t test ad 1 coda)

Marcatori di esposizione a benzene e polimorfismi metabolici

La genotipizzazione dei soggetti partecipanti allo studio di biomonitoraggio ha permesso di indagare l'effetto di alcuni comuni polimorfismi metabolici sul tasso di escrezione di due metaboliti specifici del benzene: S-PMA e TMA. I livelli di S-PMA e TMA sono stati misurati nelle urine raccolte alla fine del turno di lavoro, e normalizzati rispetto alla concentrazione di

benzene ematico determinata parallelamente. Il rapporto S-PMA/benzene ematico o TMA/benzene ematico è stato utilizzato come un indice di attività metabolica e analizzato in funzione del genotipo metabolico e di altre variabili (sesso, abitudine al fumo, età, stagione, ecc). Sono stati considerati i seguenti polimorfismi: CYP2E1, NQO1, GSTM1, GSTT1, implicati sia nelle fasi di attivazione metabolica (CYP2E1) che di detossificazione del benzene (tutti gli altri). Il contributo delle variabili indipendenti sopra citate alla variabilità nella capacità di trasformare il benzene è stato misurato per mezzo di analisi di regressione multipla. La genotipizzazione è stata effettuata secondo la tecnica della PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*). Dettagli sui genotipi analizzati e sulle metodiche seguite sono riportati nella relativa pubblicazione *in extenso* (9).

I risultati ottenuti hanno mostrato che il rapporto TMA/benzene ematico è influenzato dal genotipo metabolico (capacità di coniugare specie reattive con il glutatione attraverso i sistemi GSTM1 o GSTT1), con valori relativamente più elevati negli individui con genotipo nullo, a cui si può verosimilmente attribuire anche una maggiore sensibilità agli effetti tossici del benzene essendo il TMA a sua volta un metabolita della trans,trans-muconaldeide, specie altamente mielotossica. Oltre al genotipo, il rapporto TMA/benzene ematico è risultato influenzato da altre variabili quali il sesso, l'abitudine al fumo, e la stagione (eventualmente in relazione alla variabile presenza di precursori del TMA diversi dal benzene nella dieta). La variabilità del rapporto S-PMA/benzene ematico, cioè la capacità individuale nel metabolizzare il benzene a S-PMA, è invece risultata associata all'abitudine al fumo, ma a nessuno dei polimorfismi metabolici considerati (Tabella 4).

Tabella 4. Marker urinari di esposizione a benzene e polimorfismi metabolici: analisi di regressione

Variabile ^a	B*	SE**	R ²	P value
Variabile dipendente: In TMA/benzene ematico				
costante***	0.315	0.303		
stagione	-0.639	0.150	0.085	0.000
fumo	0.569	0.156	0.077	0.000
sesso	-0.479	0.166	0.037	0.004
GSTM1-GSTT1	-0.238	0.118	0.015	0.045
TOTALE			0.214	0.000
Variabile dipendente: In S-PMA/benzene ematico				
costante***	-4.584	0.063		
fumo	0.338	0.107	0.058	0.002
occupazione	-0.274	0.111	0.029	0.014
TOTALE			0.087	0.000

Analisi di regressione per passi in avanti: P "for entry" = 0.05.

Ricerca di anticorpi anti benzopirene-DNA addotto

Su un gruppo di 194 vigili tra viabilisti e amministrativi è stata inoltre effettuata la ricerca di anticorpi anti benzo(a)pirene-addotto, proposto come marcatore di esposizione cronica a idrocarburi policiclici aromatici. I risultati ottenuti hanno mostrato una prevalenza non significativa ($p=0.09$) di soggetti positivi per gli anticorpi anti-BaP tra i viabilisti rispetto agli amministrativi (Tabella 5).

Tabella 5. Incidenza di campioni di siero positivi per anticorpi anti benzopirene-DNA addotto in vigili viabilisti e amministrativi

Gruppo	Caso	Campione negativo	Campione positivo	Totale
Amministrativi	<i>osservato</i>	59	1	60
	<i>atteso</i>	56.6	3.4	60.0
Viabilisti	<i>osservato</i>	124	10	134
	<i>atteso</i>	126.4	7.6	134.0
Totale	<i>osservato</i>	183	11	194
	<i>atteso</i>	183.0	11.0	194.0

Biomarcatori di effetti biologici precoci

Analisi di marcatori citogenetici

Come marcatori di effetti biologici precoci sono stati analizzati due *end-point* citogenetici ampiamente utilizzati nel biomonitoraggio di popolazioni esposte ad agenti genotossici: gli scambi tra cromatidi fratelli (*Sister Chromatid Exchange*, SCE) con relative *High Frequency Cells* (HFC, cellule con un numero di scambi superiore al 90° percentile della complessiva distribuzione nella popolazione), e i micronuclei in cellule binucleate. Entrambi i marcatori sono stati studiati nei linfociti circolanti (linfociti T), considerati un adeguato surrogato di altri tessuti bersaglio di effetti genotossici. Le analisi sono state condotte secondo procedure sperimentali validate e adottate in precedenti indagini (11, 12). Per le indagini citogenetiche si sono resi disponibili 134 vigili viabilisti e 58 amministrativi. I due gruppi sono risultati confrontabili per età (41 vs 44 anni come media di gruppo in viabilisti e amministrativi, rispettivamente), anzianità lavorativa (11.7 vs 11.1 anni), e incidenza di fumatori (30 vs 36%).

Analisi degli SCE

I risultati dell'analisi degli SCE e delle HFC nei vigili urbani viabilisti e nei controlli sono riassunti nella Tabella 6. Una prima lettura dei risultati ottenuti non indica eccessi di danni citogenetici nei vigili esposti a traffico autoveicolare rispetto ai controlli con mansioni amministrative. I dati semmai indicano una leggera prevalenza di danno, statisticamente non significativa, nel gruppo degli amministrativi rispetto al gruppo dei vigili viabilisti.

Tabella 6. Biomonitoraggio dei vigili urbani: analisi degli SCE

Gruppo	SCE (media $\pm$ D S)	HFC (% media $\pm$ D S)
Viabilisti	5.23 $\pm$ 1.05	7.18 $\pm$ 6.32
Amministrativi	5.5 $\pm$ 1.09	8.86 $\pm$ 6.82
Totale	5.31 $\pm$ 1.06	7.68 $\pm$ 6.50

Per una più adeguata valutazione dei risultati è tuttavia necessario tenere conto di fattori di confondimento capaci di modulare l'espressione e l'incidenza dei marcatori di effetti biologici. Tra questi sesso, età, abitudine al fumo e capacità metaboliche sono ritenuti i più rilevanti. I risultati di questo studio confermano il ruolo dell'abitudine al fumo come fattore causale prevalente

nell'induzione di danni genotossici. Stratificando la popolazione studiata per l'abitudine al fumo (Tabella 7) si può osservare infatti che sia gli SCE che le HFC sono significativamente ($p < 0.001$) più frequenti nel gruppo di fumatori rispetto al gruppo dei non fumatori.

Tabella 7. Monitoraggio citogenetico dei vigili urbani: effetto dell'abitudine al fumo sugli SCE

Vigili urbani	SCE		HFC	
	N.	media $\pm$ DS	N.	% media $\pm$ DS
Fumatori	66	5.85 $\pm$ 1.12**	66	11.09 $\pm$ 7.28**
Non fumatori	123	5.02 $\pm$ 0.92	123	5.90 $\pm$ 5.25

** Mann-Whitney U test $p < 0.001$

La frequenza di SCE e HFC è risultata quantitativamente associata all'intensità della esposizione al fumo di tabacco, come dimostra la correlazione altamente significativa ($p < 0.001$) tra il numero di sigarette fumate e il numero di scambi ($r = 0.367$) o di HFC ($r = 0.373$).

Una marginale differenza nella incidenza di SCE e HFC è stata osservata anche tra i sessi, con valori medi più alti nelle donne. Tuttavia, aggiustando i dati per l'abitudine fumo nell'analisi di regressione il sesso non è risultato una variabile significativa, suggerendo che la differenza tra sessi osservata dipendeva essenzialmente dalla più alta incidenza di fumatori tra le donne.

Oltre all'abitudine al fumo e al sesso, anche le diverse capacità metaboliche possono rappresentare un importante fattore di variabilità. È noto infatti che un significativo fattore di variabilità o suscettibilità individuale ai cancerogeni è rappresentata dai polimorfismi dei geni coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici. Gli enzimi codificati da questi geni possono avere una differente efficienza a seconda del genotipo, influenzando così i livelli di attivazione e/o detossificazione delle sostanze tossiche. Per le specifiche finalità di questo studio è stato ritenuto appropriato caratterizzare la popolazione di vigili per i polimorfismi metabolici implicati nel metabolismo del benzene e degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), due degli inquinanti atmosferici più significativi per l'induzione di effetti genotossici. In particolare, sono stati presi in esame due enzimi della famiglia del citocromo P450 (CYP1A1 e CYP2E1), implicati nella ossidazione degli IPA e del benzene, rispettivamente, nonché gli enzimi detossificanti glutatione-S-transferasi M1 e T1 (GSTM1, GSTM2), e la NQO1 o DT-Diaforasi, implicata nella detossificazione dei chinoni. La distribuzione dei genotipi nella popolazione analizzata è riportata nella Tabella 8.

Tabella 8. Distribuzione dei polimorfismi metabolici nella popolazione di vigili urbani in esame

Genotipo	CYP1A1	CYP2E1	GSTM1	GSTT1	NQO1
Wild type	106 (58%)	169 (94%)	91 (50%)	136 (75%)	119 (65%)
Mutante	76 (42%)	11 (6%)	91 (50%)	45 (25%)	57 (31%)
Doppio mutante	0	0	0	0	6 (3%)

La distribuzione dei polimorfismi nella popolazione studiata non si discosta significativamente da quella nota per la razza caucasica, con frequenze relativamente alte di genotipi GST *null* e varianti alleliche del CYP1A1. Il possibile effetto del genotipo metabolico (e di altre confondenti) sulla incidenza di danni cromosomici è stata studiata per mezzo della regressione lineare multipla dei dati (ln trasformati) considerando come variabili indipendenti l'occupazione, il sesso, il consumo di alcol, l'abitudine al fumo, i genotipi metabolici, e la ricorrenza di casi di tumore nella famiglia.

Questa analisi ha mostrato che circa il 20% della varianza delle frequenze di SCE e HFC può essere spiegata da un modello statistico altamente significativo ($p = 0.001$) in cui l'abitudine al fumo – e in minore misura il genotipo CYP2E1 – entrano come variabili significative (Tabella 9).

Tabella 9. Regressione multipla dei dati su SCE

Variabile	B*	t	P
Variabile dipendente: In SCE			
costante	1.690	8.336	0.000
fumo (si/no)	0.137	4.405	0.000
CYP2E1	0.133	2.106	0.037
sex	-0.047	-1.376	0.171
CYP1A1	-0.038	-1.258	0.211
occupazione	-0.039	-1.161	0.247
familiarità per tumori	0.045	1.056	0.293
NQO1	0.027	0.868	0.387
PRI	-0.050	-0.753	0.453
GSTT1	0.022	0.640	0.523
alcol	0.005	-0.249	0.804
età	0.0001	-0.048	0.962
GSTM1	0.001	0.038	0.969

Significatività del modello $p = 0.001$, $F = 2.927$; varianza totale spiegata (R^2) = 0.191.

Analisi dei micronuclei

L'analisi dei micronuclei è stata condotta su appositi preparati citogenetici ottenuti da colture dei linfociti di sangue periferico alle quali è stata aggiunta, ad opportuni tempi di coltura, la citocalasina B, un inibitore dell'actina e della citodieresi cellulare, che permette di ottenere cellule binucleate e quindi di discriminare i linfociti proliferanti, gli unici in grado di produrre micronuclei, dai linfociti non proliferanti. Per ogni soggetto sono stati analizzati 1000 linfociti binucleati ed è stato determinato il numero di binucleate contenenti micronuclei. È stato inoltre stimato il *Nuclear Division Index* (NDI), calcolato sulla frequenza di linfociti mononucleati, binucleati e multinucleati, un parametro indicativo della capacità proliferativa dei linfociti *in vitro*.

Le frequenze dei micronuclei e il NDI nell'intera popolazione e in funzione dell'esposizione e di due potenziali fattori confondenti quali le abitudini al fumo e il sesso sono riportate in Tabella 10.

Tabella 10. Frequenza dei micronuclei e NDI in funzione dell'attività lavorativa, del sesso e della abitudine al fumo

Popolazione	Binucleate con micronuclei/1000 $\pm$ DS	NDI $\pm$ DS
Controlli	12.33 $\pm$ 5.82	1.52 $\pm$ 0.15
Esposti	11.46 $\pm$ 7.10	1.52 $\pm$ 0.14
Uomini	10.82 $\pm$ 5.93	1.52 $\pm$ 0.14
Donne	14.20 $\pm$ 8.15 *	1.53 $\pm$ 0.15
Non fumatori	11.90 $\pm$ 6.95	1.53 $\pm$ 0.14
Fumatori	11.43 $\pm$ 6.37	1.50 $\pm$ 0.14
Totale	11.72 $\pm$ 6.73	1.52 $\pm$ 0.14

* $p = 0.005$

La valutazione statistica mediante il test non parametrico di Mann-Whitney ha evidenziato esclusivamente un effetto del sesso sulla frequenza dei micronuclei, confermando quanto già riportato in letteratura e precedentemente osservato in questo stesso laboratorio. Né l'attività lavorativa né l'abitudine al fumo sono invece risultate associate a un significativo aumento di micronuclei. A questo risultato può contribuire, oltre alla insufficiente sensibilità dell'*end-point* genetico, anche la variabilità interindividuale nel metabolismo dei genotossici e nella rimozione del danno al DNA, che possono costituire confondenti capaci di mascherare i marginali effetti indotti da bassi livelli di esposizione.

Il ruolo delle caratteristiche metaboliche individuali è stato indagato per mezzo di regressione multipla per passi in avanti, applicata alla frequenza di cellule micronucleate (ln trasformato) nella popolazione, considerando come variabili indipendenti i genotipi metabolici, il sesso, l'abitudine al fumo, il consumo di alcol, il NDI e la familiarità per neoplasie. L'analisi di regressione (Tabella 11) ha prodotto un modello altamente significativo ($p < 0.001$, $R^2=0.126$) capace di spiegare circa il 13% della varianza totale, individuato da tre variabili: il sesso ($p = 0.001$), l'età ($p = 0.001$), e in minore misura il genotipo GSTM1 ($p = 0.02$), con una minore frequenza di micronuclei nei soggetti *null* rispetto ai *wild type*.

Tabella 11. Regressione multipla dei dati su micronuclei

Variabile	B*	t	P value
Variabile dipendente: ln binucleate con micronuclei			
costante	1.626	6.353	0.000
sesso	-0.364	-3.343	0.001
età	0.002	3.307	0.001
GSTM1	0.212	2.356	0.020
familiarità per tumori	-0.001	-0.014	0.989
fumo	-0.103	-1.395	0.965
occupazione	-0.059	0.165	0.165
NDI	-0.020	-0.269	0.788
CYP1A1	-0.022	-0.300	0.765
CYP2E1	0.017	0.229	0.820
GSTT1	0.099	1.345	0.181
NQO1	0.037	0.501	0.617
alcol	-0.061	-0.806	0.421

Una indagine supplementare è stata effettuata parallelamente al test del micronucleo convenzionale, applicando un protocollo sperimentale modificato per evidenziare le lesioni premutagene presenti sul DNA, prevenendone la rimozione prima della loro fissazione in alterazioni genetiche stabili. Il sistema utilizzato è basato sull'utilizzo *in vitro* della citosina arabinoside (Ara-C), un inibitore della DNA polimerasi β responsabile della resintesi del DNA dopo rimozione delle basi danneggiate. L'aggiunta di questo inibitore nelle prime 16 ore di coltura impedisce che venga richiusa l'interruzione del DNA (rottura a singolo filamento) prodotta dalla rimozione della/e base/i modificata/e durante i normali processi di riparazione del DNA. Il successivo passaggio delle cellule nella fase di sintesi del DNA comporta la trasformazione della interruzione a singolo filamento in una rottura a doppio filamento, cioè in una rottura cromatidica evidenziabile come micronucleo. La presenza di eventi premutageni, che non sarebbero in grado di modificare significativamente la frequenza dei micronuclei spontanei proprio per l'efficienza di rimozione e di riempimento ad opera dei sistemi riparativi, può così essere messa in evidenza, aumentando teoricamente la sensibilità del metodo agli effetti genotossici indotti da agenti chimici ed evidenziando eventuali variazioni nella capacità riparativa individuale.

Questo protocollo è stato applicato su un sottogruppo di 46 viabilisti e 32 amministrativi, per un totale di 78 individui. La presenza dell'Ara-C, proprio per la sua capacità di inibire la riparazione del DNA, ha indotto in tutti i soggetti un aumento significativo dei micronuclei rispetto al livello spontaneo (11.88 micronuclei/1000 nello spontaneo contro 35.49 micronuclei in presenza di Ara-C). L'analisi dei dati è stata quindi effettuata sulla frazione di micronuclei effettivamente indotta dall'Ara-C (frequenza dei micronuclei osservata in presenza di Ara-C sottratta della frequenza dei micronuclei spontanei) che rispecchia la quantità di lesioni al DNA la cui rimozione è operata dai meccanismi di riparazione che utilizzano la DNA polimerasi β . Nella Tabella 12 sono riportate le frequenze dei micronuclei in funzione dell'esposizione, delle abitudini al fumo e del sesso. I risultati ottenuti con questo protocollo modificato mostrano che né l'esposizione professionale né l'abitudine al fumo determinano un aumento significativo di micronuclei, suggerendo che le lesioni indotte da queste esposizioni sono probabilmente riparate attraverso una via che non utilizza la polimerasi β .

Tabella 12. Monitoraggio biologico dei vigili urbani: frequenza di cellule binucleate con micronuclei dopo incubazione in presenza di Ara-C

Popolazione	Binucleate con micronuclei indotte/1000 $\pm$ DS	NDI $\pm$ DS
Controlli	25.53 $\pm$ 14.02	1.43 $\pm$ 0.13
Esposti	22.26 $\pm$ 12.34	1.45 $\pm$ 0.15
Uomini	22.50 $\pm$ 12.91	1.45 $\pm$ 0.15
Donne	26.41 $\pm$ 13.35	1.42 $\pm$ 0.12
Non fumatori	24.31 $\pm$ 12.67	1.45 $\pm$ 0.14
Fumatori	22.19 $\pm$ 13.97	1.42 $\pm$ 0.15
Totale	23.60 $\pm$ 13.07	1.44 $\pm$ 0.14

L'analisi dei dati sui micronuclei con Ara-C per mezzo della regressione multipla in avanti, utilizzando le stesse variabili utilizzate per l'analisi dei micronuclei spontanei, ha confermato l'assenza di effetto dell'attività lavorativa e del fumo. È stato invece osservato un evidente effetto dell'età sulla frequenza di micronuclei (Figura 7) e sul NDI, con una riduzione nel numero di micronuclei indotti dal trattamento con Ara-C nei soggetti più anziani rispetto ai più giovani.

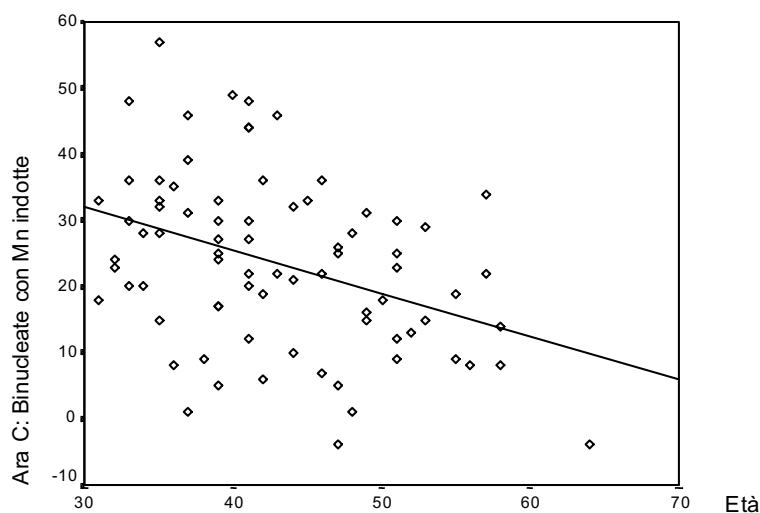


Figura 7. Regressione lineare della frequenza dei micronuclei indotti dall'Ara-C in funzione dell'età (B = - 0.658; Costante = 51.9; R^2 = 0.150)

Questo risultato, coerente con dati di letteratura, può essere interpretato come segno di una minore attività riparativa nei soggetti più anziani o, in alternativa, come indice di una maggiore quota di lesioni (per esempio prodotte dal metabolismo ossidativo) nei soggetti più giovani.

Analisi del danno al DNA per mezzo di elettroforesi di microgel (*comet assay*)

L'analisi delle rotture a singolo e a doppio filamento nel DNA dei linfociti periferici è stata effettuata per mezzo della tecnica della elettroforesi di microgel (*comet assay*), utilizzando il protocollo alcalino descritto in precedenza (13, 14). La quota di danno sul DNA è stata parametrizzata con il *tail moment* (prodotto della lunghezza e della fluorescenza della cometa), misurato in 100 cellule per individuo utilizzando un sistema computerizzato di analisi d'immagine. Sono stati studiati 126 viabilisti e 54 amministratori, confrontabili tra loro per età media, anzianità lavorativa, rapporto tra sessi e abitudine al fumo. I dati sperimentali sono stati analizzati a livello di gruppo per verificare la relazione tra *tail moment* e le seguenti variabili indipendenti: esposizione lavorativa, fumo, sesso, genotipo metabolico.

Le Figure successive mostrano la distribuzione dei valori medi individuali di *tail moment* in funzione dell'esposizione (Figura 8), del fumo (Figura 9) e del sesso (Figura 10). L'analisi statistica dei dati per mezzo del test non parametrico di Kruskal-Wallis non ha evidenziato differenze significative tra i gruppi esaminati.

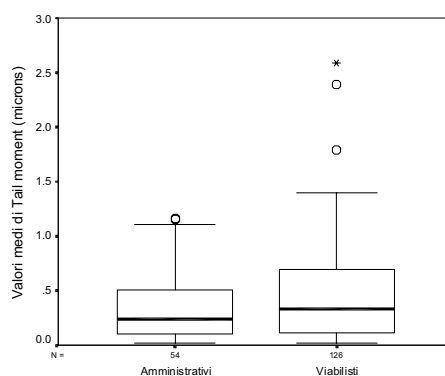


Figura 8. Grafico a scatole della distribuzione dei valori medi individuali di *tail moment* nei 2 gruppi di esposizione

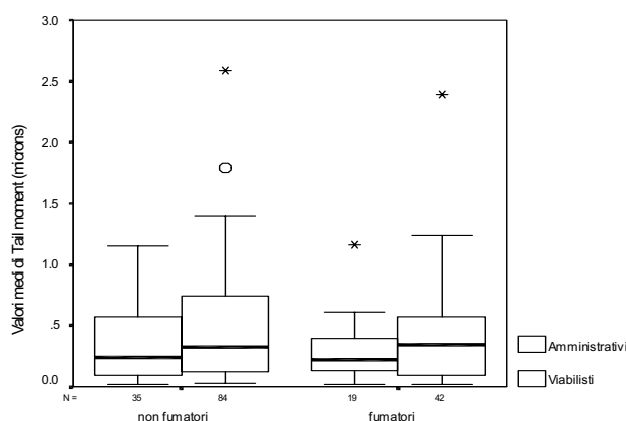


Figura 9. Grafico a scatole della distribuzione dei valori medi individuali di *tail moment* nei soggetti studiati, raggruppati secondo l'abitudine al fumo e l'occupazione

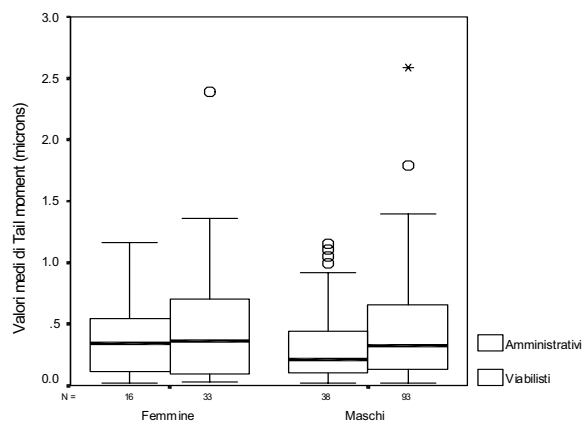


Figura 10. Grafico a scatole della distribuzione dei valori medi individuali di *tail moment* nei soggetti studiati, raggruppati secondo il sesso e l'occupazione

Per quanto riguarda i polimorfismi metabolici (Figure 11 e 12), solo il genotipo CYP1A1 è risultato capace di influenzare limitatamente ($P=0.037$) il livello di danno misurato con il *comet assay*, con valori relativamente più alti nei soggetti con genotipo *wild type*.

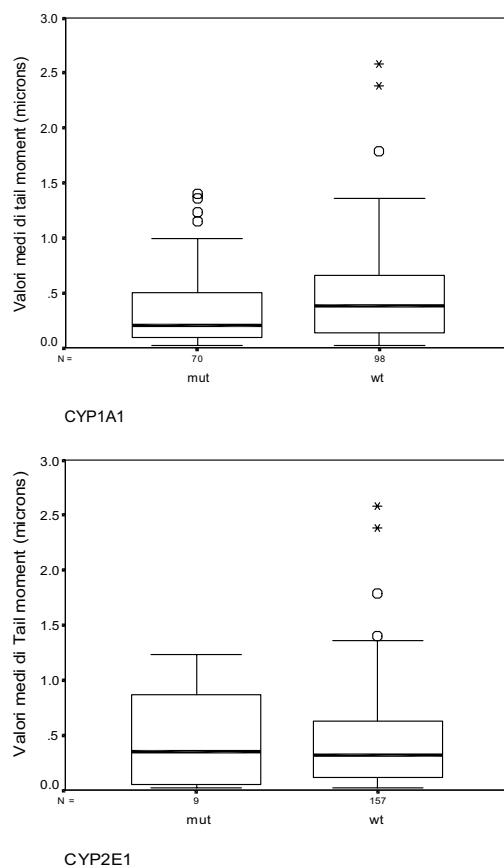


Figura 11. Polimorfismi genetici di fase 1: distribuzioni dei valori individuali di *tail moment* in soggetti con genotipo *wild type* (wt) e variante (mut) per il CYP1A1 e CYP2E1

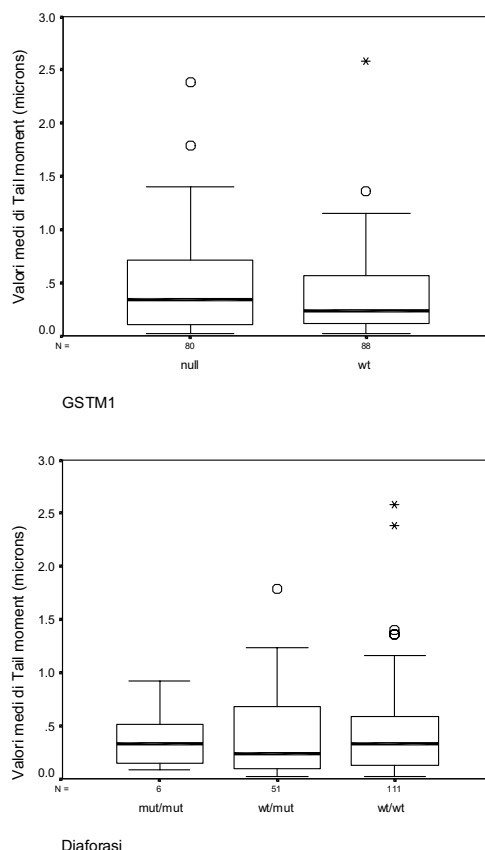


Figure 12. Polimorfismi genetici di fase 2: distribuzione di valori di *tail moment* in soggetti con genotipo GSTM1 *null* (privo del gene) o *wild type* per GSTM1 e DT-diaforasi

I risultati delle indagini sui marcatori di effetti biologici sono stati pubblicati *in extenso* separatamente (15, 16).

Studio pilota sugli effetti della esposizione al traffico sugli ormoni dello stress

Al fine di valutare il possibile effetto della esposizione professionale al traffico veicolare sullo stress, un fattore capace di modulare in modo trasversale una varietà di patologie ed effetti biologici, compresi quelli genotossici, sono stati analizzati nell'intera popolazione arruolata nel biomonitoraggio i seguenti ormoni, ritenuti possibili marcatori di stress cronico: cortisolo, prolattina, DEAS, testosterone. Le analisi sono state effettuate con kit commerciali seguendo le metodiche raccomandate.

I risultati delle analisi sono riassunti nella Tabella 13. I dati mostrano un significativo eccesso nel valore di DEAS nei viabilisti (uomini) e nel rapporto DEAS/cortisolo che potrebbero evidenziare gli effetti organici della esposizione cronica a fattori di stress, confermando le indicazioni di una parallela indagine effettuata su parametri psicologici e comportamentali dalla Clinica Psichiatrica dell'Università "La Sapienza". Una ulteriore indagine, su un campione di 1000 individui, è attualmente in corso in collaborazione con la cattedra di Medicina del Lavoro dell'Università la Sapienza.

Tabella 13. Ormoni dello stress in vigili viabilisti (gruppi A+B) e amministrativi (gruppo C)

Ormone	Uomini				Donne			
	gruppo (n)	media	mediana	t test *	gruppo (n)	media	mediana	t test*
Cortisolo	A+B (106) C (44)	34.39 35.40	23.15 24.45	0.85	A+B (36) C (18)	34.08 29.86	22.75 23.65	0.64
Prolattina	A+B C	267.77 234.64	220 226	0.21	A+B C	376.44 378.61	306 312.5	0.98
DEAS	A+B C	217.86 166.91	202 154.5	0.0016	A+B C	133.31 126.44	125 116	0.72
Testosterone	A+B C	3.71 3.34	3.25 3.25	0.22	A+B C	0.26 0.24	0.2 0.15	0.75
DEAS/cortisolo	A+B C	9.81 7.37	7.68 6.32	0.047	A+B C	6.69 6.39	5.49 6.10	0.83
Prolattin/cortis	A+B C	11.14 10.18	9.18 7.87	0.521	A+B C	18.03 16.95	15.03 15.52	0.83

* A+B vs C

Biomarcatori di suscettibilità individuale

Sensibilità individuale agli effetti mutageni (*challenge assay*)

Al fine di indagare le basi nella variabilità interindividuale della suscettibilità agli effetti genotossici e nella risposta dei marcatori di effetti biologici precoci impiegati, sono state effettuate ulteriori indagini sulla capacità individuale di riparare il danno al DNA. A tal fine è stato applicato un protocollo sperimentale che permette di valutare l'efficienza con cui un soggetto risponde all'insulto di un agente cancerogeno attraverso l'analisi della riparazione e del danno indotto da un trattamento *in vitro* dei linfociti periferici con radiazioni ionizzanti. Questo approccio, noto come *challenge assay*, è stato applicato su un sottogruppo di 31 vigili urbani (17 viabilisti e 14 amministrativi), formato per il 58% da maschi e per il 62% da non fumatori).

Il protocollo sperimentale applicato prevede l'esposizione di una aliquota di sangue intero di ciascun individuo a una dose di 2Gy di raggi gamma, provenienti da una sorgente di Cobalto. Le cellule irradiate sono state analizzate immediatamente nel *comet assay*, per determinare la quota di danno indotto dal trattamento, e dopo 15 e 30 minuti di incubazione per verificarne la riparazione. Un'altra aliquota è stata invece stimolata con mitogeno e coltivata per 48 ore per determinare alla prima mitosi la frequenza di aberrazioni cromosomiche indotte dal trattamento.

La Figura 13 mostra la variazione nei valori individuali di *tail moment* misurati nel *comet assay* nei 2 tempi successivi al trattamento. Gli istogrammi rappresentano la media dei valori medi di *tail moment* calcolati su 100 cellule per individuo. I dati mostrano sia per gli amministrativi che per i viabilisti una differenza molto significativa tra i livelli di danno al DNA (*tail moment*) misurati prima e dopo il trattamento con i raggi gamma. Solo nel gruppo degli amministrativi è però osservata una diminuzione statisticamente significativa del danno dopo 15 ($p<0.05$) e 30 minuti ($p<0.01$) dal trattamento. Questo risultato potrebbe indicare una diminuzione nell'efficienza di processamento del danno nei viabilisti, che potrebbe rappresentare un significativo fattore di suscettibilità individuale. I dati relativi alla frequenza di aberrazioni cromosomiche nella popolazione prima e dopo il trattamento con raggi gamma sono invece riportati nella Tabella 14.

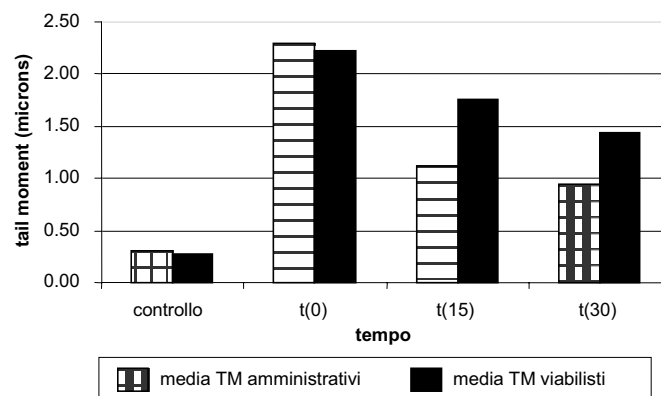


Figura 13. Riparazione del danno al DNA indotto *in vitro* da radiazioni ionizzanti nei linfociti periferici di vigili viabilisti e controlli

Tabella 14. Frequenza delle aberrazioni cromosomiche (per 100 cellule) spontanee e indotte dall'irraggiamento nella popolazione studiata nel *challenge assay*

Variabile		n.	Spontaneo		Indotto		p*
			media	DS	media	DS	
Professione	Amministrativi	17	1.76	1.19	29.59	9.61	0.246
	Viabilisti	14	1.82	1.66	32.57	7.93	
	Totale	31	1.79	1.40	30.94	8.88	
Età (anni)	<38	9	1.67	1.89	31.44	11.08	0.936
	38-46	14	1.89	1.11	30	7.54	
	>46	8	1.75	1.39	32	9.41	
Sesso	Maschi	18	1.39	1.19	31.28	9.03	0.953
	Femmine	13	2.35	1.5	30.46	9.01	
Fumo (sig/die)	0	19	1.87	1.56	32.68	8.83	0.05
	<15	6	1.58	0.66	32	8.94	
	>15	6	1.75	1.54	24.33	6.83	
Genotipo	CYP1A1 wt	17	1.61	1.3	30.29	8.92	0.83
	CYP1A1 mut	14	1.94	1.49	31.47	9.08	
	GSTM1 wt	20	1.67	1.33	33.4	9.35	0.025
	GSTM1 mut	11	2	1.55	26.45	6.02	
	GSTT1 wt	25	2	1.42	32.2	8.96	0.174
	GSTT1 mut	6	0.92	0.92	25.67	6.8	
	diaforase wt	19	1.82	1.61	31	7.81	0.251
	diaforase mut	11	1.82	1.05	29.27	9.72	
	diaforase doppio mut	1	1	-	48	-	
	MTHFR +/+	5	1.8	1.303	27.8	6.38	0.661
	MTHFR +/-	18	2.08	1.49	31.06	9.64	
	MTHFR -/-	8	1.12	1.13	32.62	8.88	
	MTRR +/+	10	1.65	1.23	30.9	11.06	0.899
	MTRR +/-	13	1.69	1.11	31.31	7.39	
	MTRR -/-	8	2.12	2.03	30.37	9.3	

° media + DS; * Mann-Whitney test solo per le aberrazioni indotte dai raggi gamma.

L'analisi metafisica non ha evidenziato differenze significative nella frequenza di aberrazioni cromosomiche strutturali tra controlli e viabilisti, sia prima che dopo il trattamento con il mutageno. La frequenza delle aberrazioni indotte è invece risultata influenzata in modo negativo dalla abitudine al fumo. Nei forti fumatori (>15 sigarette al giorno), infatti, l'entità del danno indotto è risultata significativamente inferiore rispetto ai non fumatori (Figura 14).

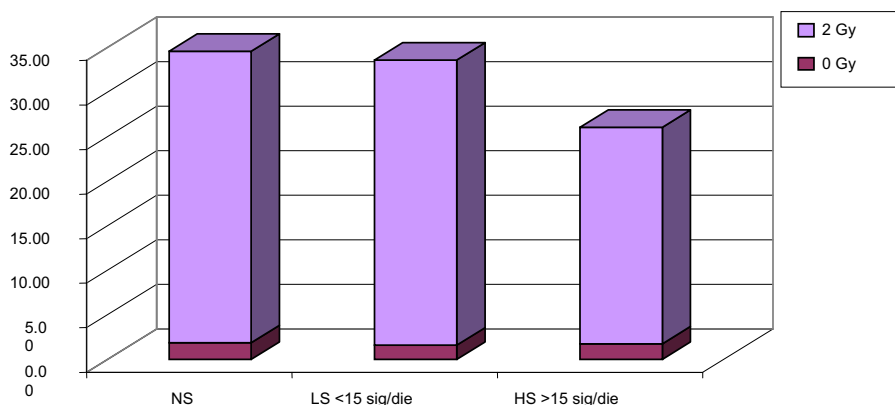


Figura 14. Frequenza di aberrazioni cromosomiche spontanee (0 Gy) e indotte (2 Gy) in funzione del consumo giornaliero di sigarette. I valori sono stati ricavati dall'analisi di 100 metafasi per individuo, analizzate prima e dopo l'irraggiamento con 2 Gy di raggi gamma

Una relazione simile è stata riscontrata anche tra il genotipo GSTM1 mutante e la frequenza di aberrazioni cromosomiche indotte; è stato infatti osservato che i mutanti hanno una frequenza di aberrazioni cromosomiche indotte minore rispetto a quella evidenziata nei *wild type* ($p=0.025$) (Figura 15).

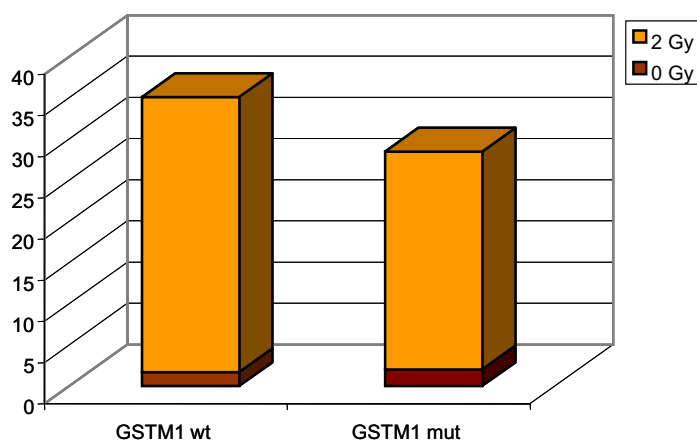


Figura 15. Frequenza di aberrazioni cromosomiche spontanee (0 Gy) e indotte (2 Gy) in funzione del genotipo GSTM1. I valori sono stati ricavati dall'analisi di 100 metafasi per individuo

I risultati di questo studio pilota sembrano quindi indicare una minore sensibilità agli effetti clastogeni delle radiazioni ionizzanti da parte di individui GSTM1 *null* e di forti fumatori. Si può ipotizzare che ciò rifletta una risposta adattativa, cioè l'induzione di una più efficiente

attività riparativa in soggetti costitutivamente o cronicamente esposti in maggiore misura a stress ossidativo come conseguenza di un inefficiente meccanismo di detossificazione (GSTM1) o per l'esposizione a ROS (*Reactive Oxygen Species*) con il fumo di sigaretta.

Metabolismo dei folati e instabilità cromosomica

Nella sezione sui biomarcatori di esposizione ed effetti precoci sono discussi gli effetti dei polimorfismi per i sistemi enzimatici deputati al metabolismo e detossificazione degli inquinanti ambientali. In aggiunta a questi, è stato valutato il possibile effetto modulatore del metabolismo dei folati, che gioca un ruolo chiave nella metilazione del DNA e nella sintesi dei nucleotidi. In particolare, è stato valutato il ruolo della interazione tra gene e ambiente sulla stabilità cromosomica in soggetti con diversa esposizione a inquinanti ambientali. A tal fine i soggetti sono stati genotipizzati per i polimorfismi dei loci MTHFR (*Methylene TetraHydroFolate Reductase*: metilene tetraidrofolato reduttasi) e MTR (*MeThionine synthase Reductase*: metionina sintasi reduttasi) e sono stati determinati i livelli plasmatici di omocisteina, acido folico e vitamina B12. La genotipizzazione è stata effettuata per mezzo di PCR-RFLP. Le analisi ematochimiche sono state effettuate con kit commerciali seguendo le metodiche raccomandate.

I risultati hanno confermato che i livelli serici dei marcatori del metabolismo dell'acido folico sono influenzati, oltre che dal sesso, anche da fattori genetici: nei soggetti omozigoti per la variante 677T della MTHFR è stato infatti osservato un maggiore livello di omocisteina plasmatica rispetto ai soggetti portatori dell'allele normale 677C, sia in omozigosi che in eterozigosi (Tabella 15). Data la associazione tra livelli di omocisteina plasmatica e danno genotossico, nonché l'aumentato rischio di malattie cardiovascolari nei soggetti con elevati livelli di omocisteina, la presenza del genotipo MTHFR 677T può quindi essere considerata un potenziale fattore di rischio di patologie irreversibili e cardiovascolari.

Tabella 15. Livelli serici di acido folico, omocisteina e vitamina B12 nella popolazione studiata rispetto alle principali variabili categoriche

Variabile		Acido folico ± DS (ng/ml)	Omocisteina ± DS (µM/l)	Vitamina B12 ± DS (pg/ml)
Sesso	Uomini	4.15 ± 1.82	14.88 ± 6.04***	407.4* ± 131.5
	Donne	4.56 ± 1.99	10.86 ± 3.37	460.4 ± 155.5
Esposizione	Controlli	4.38 ± 2.15	14.62 ± 8.65	448.0 ± 136.9
	Esposti	4.20 ± 1.74	13.54 ± 3.96	409.2 ± 139.6
Abitudini al fumo	Non fumatori	4.23 ± 1.72	13.29 ± 3.80	417.8 ± 137.8
	Fumatori	4.29 ± 2.16	15.02 ± 8.35	427.4 ± 144.0
Consumo di alcol	Astemi o moderati	4.27 ± 1.65	13.33 ± 4.05	434.9 ± 135.2**
	Bevitori	3.87 ± 1.76	15.08 ± 5.19	355.6 ± 105.3
MTHFR (677C → T)	CC	4.66 ± 2.06	12.66 ± 2.86	389.3 ± 135.8
	CT	4.19 ± 1.79	12.38 ± 3.03	435.6 ± 146.7
	TT	3.95 ± 1.99*	18.33 ± 9.34***	433.4 ± 145.7
MTR (66A → G)	AA	4.54 ± 1.70	14.35 ± 9.58	404.6 ± 119.7
	AG	4.18 ± 2.12	13.74 ± 4.33	415.2 ± 142.4
	GG	4.25 ± 1.51	13.89 ± 3.99	457.1 ± 167.9
	Totale	4.25 ± 1.87	13.86 ± 5.75	421.1 ± 139.6

* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 mediante test di Mann-Whitney or Kruskal Wallis (MTHFR).

Il confronto tra i livelli basali di danni genotossici nei linfociti di soggetti con diverso genotipo MTHFR e MTRR non ha mostrato differenze significative (Tabella 16). Un effetto diretto del genotipo sui livelli di danno è d'altronde inatteso, in quanto nel caso del metabolismo dei folati è piuttosto l'interazione tra genotipo e fattori ambientali a rappresentare un eventuale fattore di rischio. Al fine quindi di tenere conto sia del genotipo che di variabili legate allo stile di vita o all'occupazione, è stata eseguita una analisi di regressione multipla dei dati citogenetici considerando come variabili indipendenti il genotipo MTHFR e MTRR, i genotipi metabolici, la familiarità per le neoplasie, l'età, il sesso, l'abitudine al fumo e il consumo di alcolici, e i livelli serici di acido folico, omocisteina e vitamina B12.

Tabella 16. Danno genotossico e proliferazione nei linfociti di sangue periferico rispetto alle varianti alleliche dei geni MTHFR e MTRR

Polimorfismo	G	SCE	HFC	Mn	Tail moment	RI	NDI
MTHFR (677 C → T)	CC	5.26 ± 1.18	7.72 ± 7.06	11.04 ± 6.90	0.43 ± 0.41	2.42 ± 0.25	1.51 ± 0.15
	CT	5.43 ± 1.10	8.13 ± 6.94	12.29 ± 6.78	0.40 ± 0.45	2.41 ± 0.21	1.51 ± 0.13
	TT	5.29 ± 0.98	7.59 ± 5.59	10.95 ± 7.18	0.41 ± 0.41	2.46 ± 0.18	1.52 ± 0.13
MTRR (66 A → G)	AA	5.59 ± 1.02	9.07 ± 7.15	11.87 ± 7.78	0.31 ± 0.31	2.38 ± 0.24	1.48 ± 0.13
	AG	5.24 ± 1.11	7.67 ± 6.59	11.12 ± 6.69	0.42 ± 0.42	2.45 ± 0.20	1.51 ± 0.14
	GG	5.35 ± 1.07	6.84 ± 5.97	12.79 ± 6.49	0.54 ± 0.53	2.41 ± 0.23	1.55 ± 0.13

G: genotipo

L'analisi di regressione ha mostrato che il livello di vitamina B12 serica è, dopo l'abitudine al fumo, il più importante fattore capace di modulare la frequenza di SCE e HFC. Queste due variabili, insieme al polimorfismo del CYP2E1, spiegano circa il 20% della variabilità di entrambi i marcatori di danno genotossico (Tabella 17).

Tabella 17. Analisi di regressione multipla per passi in avanti dei dati sugli SCE e sui micronuclei

Variabile dipendente		B	SE	R ²	p value
In SCE	Costante*	1.307	0.080		
	Abitudini al fumo	0.144	0.030	0.124	0.000
	Vitamina B12 serica	0.0003	0.000	0.038	0.002
	CYP2E1	0.166	0.061	0.040	0.007
	Totale			0.202	0.000
In Micronuclei	Costante*	1.761	0.286		
	Età	0.022	0.007	0.036	0.001
	Sesso	0.387	0.109	0.063	0.001
	GSTM1	0.218	0.093	0.028	0.020
	MTRR	0.246	0.119	0.024	0.040
	Totale			0.151	0.000

B = pendenza della linea di regressione

* Costante = valore stimato dell'intercetta

p di ingresso = 0.05

Variabili indipendenti considerate:

Età, Sesso, Abitudini al fumo (sì/no); Familiarità per le neoplasie (patologia nei parenti di primo grado: sì/no), Professione (controlli/esposti), Indice di replicazione (solo per gli SCE), NDI (solo per i Micronuclei), CYP1A1 (wt/eterozigoti), CYP2E1 (wt/eterozigoti), GSTM1 (wt/null), GSTT1 (wt/null), NQO1 (wt/eterozigoti e omozigoti varianti), MTHFR (GG and GT/TT), MTRR (AA and AG/GG), Acido folico serico, Vitamina B12 serica, Omocisteina serica, Consumo di alcol (più di 1 bicchiere di vino per pasto: sì/no)

È rilevante notare che gli SCE (e le HFC) risultano modulati dalla vitamina B12 esclusivamente nel sottogruppo di fumatori (Figura 16), nel quale il livello di vitamina B12 da solo spiega circa il 16% della variabilità intraindividuale nella frequenza di SCE. Al momento possono essere formulate solo delle ipotesi per spiegare l'effetto osservato, in disaccordo con l'azione protettiva generalmente attribuita alla vitamina B12 rispetto al danno genotossico. Per esempio, dato che la vitamina B12 è implicata nella conversione dell'omocisteina in metionina, il donatore universale di gruppi metilici per diverse attività cellulari tra cui la metilazione del DNA, ad elevati livelli di B12 verosimilmente corrispondono più elevati livelli di metilazione del DNA. Poiché alcuni genotossici presenti nel fumo di sigaretta si legano preferenzialmente al DNA metilato, è possibile ipotizzare che la maggiore metilazione del DNA determinata da elevati livelli di vitamina B12 comporti conseguentemente maggiori livelli di danno al DNA nei fumatori.

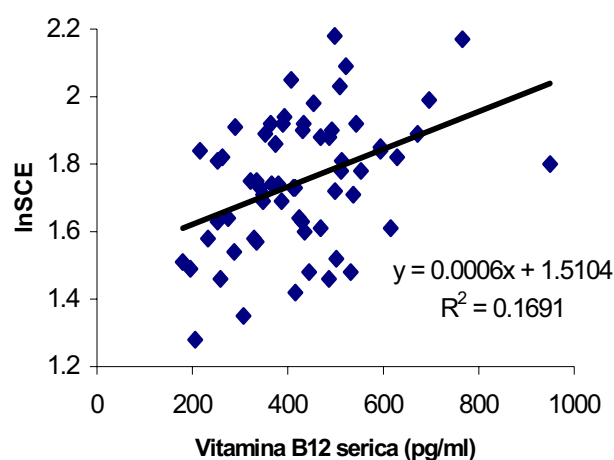


Figura 16. Regressione lineare della frequenza di SCE (valori trasformati mediante logaritmo naturale e i livelli di vitamina B12 nel sottogruppo di fumatori)

L'analisi di regressione ha anche mostrato che il genotipo MTRR può svolgere un ruolo significativo nel modulare il livello di micronuclei. Nel modello di regressione il genotipo MTRR, insieme all'età, al sesso e al genotipo GST1, contribuisce infatti a spiegare il 15% della variabilità intraindividuale della frequenza di micronuclei (Tabella 17). Il leggero aumento di micronuclei osservato nei soggetti omozigoti per la variante GG (Tabella 16) risulta essere quindi essere significativo una volta che vengano considerate le altre potenziali variabili esplicative (sesso, età, genotipo GSTM1). Questa osservazione è confermata dal confronto dei residui dei Mn dopo la regressione con il sesso l'età e il GSTM1 che risultano essere significativamente più elevati nei soggetti MTRR 66GG rispetto agli altri ($p = 0.026$). Ad oggi non è stato individuato nessun effetto della variante GG sull'attività enzimatica del gene MTRR, implicato nella conversione della omocisteina a metionina. Recenti studi però indicano che la MTRR può contribuire alla stabilità cromosomica in quanto alla variante 66AA è associato un aumentato rischio di concepimenti Down dovuti ad eventi di malsegregazione cromosomica, un meccanismo in grado di generare anche micronuclei.

Allo scopo di evidenziare se a valori estremi dei marcatori serici corrispondano più elevati livelli di danno genotossico sono stati calcolati il 33° e il 66° percentile per l'acido folico (rispettivamente 3.30 e 4.50 ng/ml), per l'omocisteina (rispettivamente 11.13 e 14.45 $\mu\text{M/l}$) e

per la vitamina B12 (rispettivamente 346.55 e 471.26 pg/ml) e successivamente identificati i soggetti con acido folico e vitamina B12 nel tertile più alto e l'omocisteina nel tertile più basso (gruppo A) e viceversa i soggetti con acido folico e vitamina B12 nel tertile più basso e omocisteina nel tertile più alto (gruppo B). Questa distinzione ha permesso di identificare 9 soggetti nel gruppo A che hanno livelli di marcatori considerati protettivi per il danno genotossico e 15 soggetti nel gruppo B con livelli di marcatori considerati negativi per il danno genotossico. Il confronto tra i due gruppi (Figura 17) non ha mostrato alcuna differenza significativa, anche quando l'analisi veniva ristretta al gruppo di non fumatori (rispettivamente 7 e 11 soggetti).

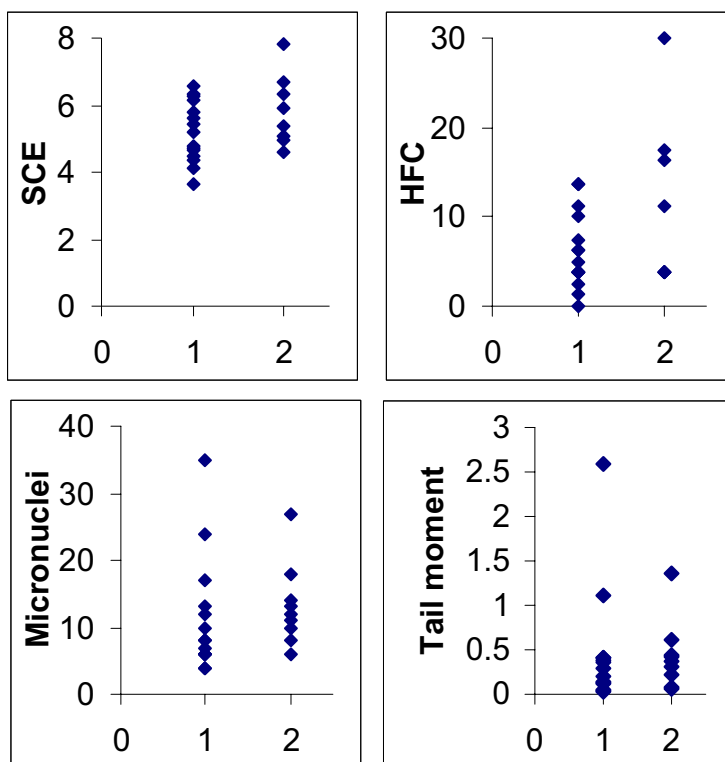


Figura 17. Livelli di danno genotossico nei soggetti classificati nel gruppo 1 (livelli serici di acido folico, omocisteina e vitamina B12 considerati negativi) e nel gruppo 2 (livelli di marcatori serici considerati protettivi)

Questa parte dello studio ha confermato che il metabolismo dell'acido folico può modulare i livelli di danno genotossico e rappresentare quindi un fattore di confondimento e di suscettibilità da tenere in considerazione nel disegno sperimentale. In particolare i livelli di Vitamina B12 si sono dimostrati estremamente efficaci nell'influenzare il danno indotto dal fumo di sigaretta, la più rilevante fonte di esposizione a cancerogeni evidenziata in questo studio. I risultati ottenuti hanno inoltre dimostrato che due genotipi del metabolismo dell'acido folico possono modulare, anche se limitatamente, il livello di danni genotossici in una popolazione normale. Ciò non esclude tuttavia che questi possano rappresentare dei significativi fattori di rischio in particolari situazioni, in associazione a specifici fattori fisiologici, genetici o ambientali.

Conclusioni

I risultati dell'indagine sulla esposizione a benzene nei vigili urbani del Comune di Roma indicano – per il periodo dicembre 1998-giugno 1999 – livelli medi di esposizione durante il turno lavorativo antimeridiano inferiori a $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ di benzene per gli addetti al controllo della viabilità nel centro storico e di poco superiori per quelli operanti in zone periferiche a medio-alto traffico. Pur con le dovute cautele nella trattazione strettamente quantitativa dei risultati, il numero elevato di soggetti coinvolti nello studio (206), l'esteso arco temporale in cui esso si è svolto, e la scelta di aree ampiamente rappresentative della realtà del traffico urbano, permettono di considerare con accettabile confidenza i livelli di esposizione misurati come tipici della intera categoria dei viabilisti. Ovviamente variazioni quantitative attorno a questi valori medi sono comunque attese in funzione dell'intensità del traffico e del livello di inquinamento conseguente.

Complessivamente, i valori medi di esposizione a benzene nei viabilisti misurati in questa indagine appaiono confrontabili con i valori misurati nell'aria urbana. I dati delle centraline del PMP indicano infatti per il 1998 un valore medio annuale compreso tra 13 e $16 \mu\text{g}/\text{m}^3$, con un trend verso valori più bassi successivo alla adozione dei provvedimenti per la limitazione del contenuto di benzene nei carburanti (luglio 1998). Questa indagine ha comunque segnalato con alcuni valori *outlier* anche la possibilità di esposizioni personali verosimilmente superiori ai livelli ambientali. Seppure confrontabili in prima approssimazione con i livelli di contaminazione ambientale, l'esposizione personale a benzene e sostanze correlate dei vigili viabilisti risulta comunque significativamente più elevata di quella del personale amministrativo, indipendentemente dal contributo di altre fonti come il fumo di tabacco, sia attivo che passivo.

Gli indicatori di dose interna studiati – sviluppati primariamente per il monitoraggio della esposizione in ambienti lavorativi con livelli di esposizione prossimi ai TLV occupazionali ($3250 \mu\text{g}/\text{m}^3$ o superiori) – non hanno mostrato significative differenze tra viabilisti e soggetti che svolgono attività di tipo amministrativo. Entrambi i marcatori urinari di esposizione interna a benzene (acido *trans*, *trans*-muconico e fenilmercapturico) sono invece risultati significativamente aumentati nei soggetti fumatori, indipendentemente dalla loro attività lavorativa e dalla esposizione a inquinanti atmosferici, dimostrando che nella popolazione urbana il fumo di tabacco dà un contributo prevalente alla esposizione personale a benzene, oltre che a numerose altre sostanze cancerogene.

Sebbene i dati disponibili non permettano una valutazione quantitativa del rischio incrementale di effetti a lungo termine nei soggetti con mansioni *outdoor* rispetto a quelli impiegati *indoor*, le informazioni note sul meccanismo d'azione del benzene, un cancerogeno genotossico, fanno ritenere in via cautelativa che anche l'esposizione a dosi molto basse come quelle misurate in questo studio non siano teoricamente del tutto prive di rischi. Appare quindi raccomandabile l'adozione di misure atte a ridurre sia le esposizioni più elevate in ambito lavorativo che i livelli generali di contaminazione ambientale da questo cancerogeno.

I risultati delle analisi citogenetiche (SCE e micronuclei) effettuate sui linfociti di vigili urbani esposti a traffico autoveicolare e di soggetti non esposti, con mansioni amministrative svolte *indoor*, non hanno mostrato una significativa influenza dell'esposizione a inquinanti atmosferici su questi marcatori di esposizione ad agenti genotossici. L'abitudine al fumo è invece risultata associata in modo altamente significativo all'aumentata incidenza di scambi tra cromatidi fratelli, confermando il contributo predominante del fumo di tabacco alla esposizione personale ad agenti genotossici. I micronuclei sono risultati scarsamente influenzati dal fumo e da altri fattori esogeni, mentre sono risultati significativamente associati all'età e al sesso

(relativamente più frequenti nelle donne). Ciò verosimilmente rispecchia il contributo alla formazione di micronuclei della perdita del cromosoma X, che è nota aumentare con l'età e soprattutto nelle donne. Altri potenziali fattori di suscettibilità individuale correlati al genotipo metabolico dei soggetti sono risultati ininfluenti o solo marginalmente associati ai marcatori di effetti precoci studiati. I risultati di uno studio pilota sulla sensibilità agli effetti mutageni mostrano come in una popolazione normale la sensibilità agli effetti di un agente mutageno possa essere modulata da fattori esogeni, legati allo stile di vita, o endogeni (quali le variazioni dell'attività degli enzimi del metabolismo degli xenobiotici).

Bibliografia

1. World Health Organization. *Air quality guidelines*. Geneva: WHO; 1999.
2. Hagmar L, Bonassi S, Stromberg U, Brogger A, Knudsen LE, Norppa H, Reuterwall C, and the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European study Group on cytogenetic biomarkers and health (ESCH). *Cancer Research* 1998;58:4117-21.
3. Ghittori S, Fiorentino ML, Maestri L. Urinary excretion of unmetabolized benzene as an indicator of benzene exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1993;38:233-43.
4. Maestri L, Ghittori S, Grignani E, Fiorentino ML, Imbriani M. Measurement in humans of benzene metabolite urinary s-phenylmercapturic acid (S-PMA). *Med Lav* 1993;84:55-65.
5. Maestri L, Ghittori S, Fiorentino ML, Imbriani M. Measurement of low levels of urinary trans, trans-muconic acid. *Med Lav* 1995;86:40-9.
6. Jongeneelen FJ, Anzion RBM, Henderson PTH. Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *J Chromatogr* 1987;413:227-32.
7. Tomei F, Ghittori S, Imbriani M, Pavanello S, Carere A, Marcon F, Zijno A, Crebelli R. Environmental and biological monitoring of traffic wardens from the city of Rome. *Occup Med* 2001;51:198-203.
8. Crebelli R, Tomei F, Zijno A, Ghittori S, Imbriani M, Gamberale D, Martini A, Carere A. Exposure to benzene in urban workers: environmental and biological monitoring of traffic police in Rome. *Occup Environ Med* 2001;58:165-71.
9. Verdina A, Galati R, Falasca G, Ghittori S, Imbriani M, Tomei F, Marcellini L, Zijno A, Del Vecchio V, Crebelli R. Metabolic polymorphisms and urinary biomarkers in subjects with low benzene exposure. *J Toxicol Environ Health* 2001;64(Part A):607-18.
10. Galati R, Zijno A, Crebelli R, Falasca G, Tomei F, Iecher F, Carta P, Verdina A. Detection of antibodies to the benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in sera from individuals exposed to low doses of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Exp Clin Cancer Res* 2001;20:359-64.
11. Carere A, Antoccia A, Crebelli R, Degrassi F, Isacchi G, Iavarone I, Lagorio S, Leopardi P, Marcon F, Palitti F, Tanzarella C, Zijno A. Genetic effects of petroleum fuels: cytogenetic monitoring of gasoline station attendants. *Mutation Res* 1995;332:17-26.
12. Carere A, Antoccia A, Cimini D, Crebelli R, Degrassi F, Leopardi P, Marcon F, Sgura A, Tanzarella C, Zijno A. Genetic effects of petroleum fuels. II. Analysis of chromosome loss and hyperploidy in peripheral lymphocytes of gasoline station attendants by fluorescence in situ hybridization techniques. *Environmental Molecular Mutagenesis* 1998;32:130-8.
13. Andreoli C, Leopardi P, Crebelli R. Detection of DNA damage in human lymphocytes by alkaline single cell gel electrophoresis after exposure to benzene or benzene metabolites. *Mutation Research* 1997;377:95-104.

14. Andreoli C, Leopardi P, Rossi S, Crebelli R. DNA damage by hydroquinone in human white blood cells: analysis by alkaline single-cell gel electrophoresis. *Mutation Research* 1999;438:37-45.
15. Carere A, Andreoli C, Galati R, Leopardi P, Marcon F, Rosati MV, Rossi S, Tomei F, Verdina A, Zijno A, Crebelli R. Biomonitoring of exposure to urban air pollutants: analysis of sister chromatid exchanges and DNA lesions in peripheral lymphocytes of traffic policemen. *Mutation Research* 2002;518: 215-24.
16. Leopardi P, Zijno A, Marcon F, Conti L, Carere A, Verdina A, Galati R, Tomei F, Baccolo TP, Crebelli R. Analysis of micronuclei in peripheral blood lymphocytes of traffic wardens. Effects of exposure, metabolic genotypes, and inhibition of DNA repair *in vitro* by Ara-C. *Environmental Molecular Mutagenesis* 2002;41:126-30.

VALUTAZIONE DEI PARAMETRI ALLERGOLOGICI SU GRUPPI DI POPOLAZIONE CON ALTI LIVELLI DI ESPOSIZIONE AD INQUINANTI ATMOSFERICI

Carlo Pini (a), Gabriella Di Felice (a), Bianca Barletta (a), Patrizia Iacovacci (a), Raffaella Tinghino (a), Claudia Afferni (a), Cinzia Butteroni (a), Chiara Alisi (a), Barbara Brunetto (a), Cristina D'Ippolito (b), Corrado Fagnani (b), Maria Antonietta Stazi (b)

(a) Laboratorio di Immunologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Il meccanismo patogenetico alla base della atopia è caratterizzato da una elevata capacità dei linfociti B di produrre anticorpi di isotipo IgE, specifici per alcuni gruppi di antigeni presenti nell'ambiente quali pollini, muffe, acari, ecc. Questa risposta è profondamente influenzata da fattori genetici, ma enorme rilevanza vanno assumendo sempre più vari fattori ambientali, tra i quali di primaria importanza l'inquinamento. Gli anticorpi IgE sono coinvolti nelle manifestazioni cliniche della atopia, quali rinite, asma, congiuntivite, allergia alimentare, dermatite atopica, anafilassi, definite in base agli organi e ai sistemi di organi di volta in volta interessati. La diagnosi delle malattie atopiche, e la loro prevenzione basata in primo luogo sull'allontanamento della causa di sensibilizzazione, si fonda sulla determinazione delle IgE specifiche verso gli allergeni implicati. L'importanza del ruolo dei linfociti T helper CD4⁺ nel determinare la produzione di IgE da parte dei linfociti B è ampiamente riconosciuta. Dopo le iniziali osservazioni di Mosmann *et al.* nel topo (1) sulla presenza di due sottopopolazioni di linfociti T helper (Th) CD4⁺ differenziabili in base al tipo di citochine prodotte e alla loro attività funzionale, numerose conferme sono state ottenute anche nell'uomo (2, 3) in studi *in vitro* su cloni T isolati da linfociti di sangue periferico. I linfociti Th1 producono interferone- γ (IFN- γ), interleuchina (IL)-2, *Tumor-Necrosis-Factor* (TNF)- β , e sono responsabili di risposte immuni sia umorali che soprattutto cellulo-mediate (produzione di anticorpi di isotipo IgG2a nel topo, attivazione di macrofagi, citotossicità anticorpo-dipendente, ipersensibilità ritardata). I linfociti Th2 producono IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, e hanno una ottimale capacità helper per le risposte umorali, che includono lo *switch* isotipico verso la produzione di IgE e IgG1 (nel topo) o IgG4 (nell'uomo), l'immunità mucosale attraverso la maturazione di mastociti, la crescita e il differenziamento di eosinofili, e la sintesi di IgA (4). Poiché la sintesi di IgE avviene solo in presenza di IL-4 ed è soppressa da IFN- γ (5), l'attività di linfociti Th2 e lo sbilanciamento del rapporto Th1/Th2 sono stati chiamati in causa per spiegare gli eventi patogenetici degli stati atopici IgE-mediati. Questa ipotesi è stata confermata da numerose evidenze provenienti da studi effettuati *in vitro* con cellule di soggetti atopici e di controllo, provenienti sia dal sangue periferico (2, 3, 6) che dai distretti mucosali interessati (7, 8), grazie all'impiego di biopsie delle vie respiratorie. La ragione per cui nelle malattie atopiche siano preferenzialmente espanse popolazioni di linfociti di tipo Th2 non è ancora nota (9) ed è oggetto di numerosi studi.

Un aspetto importante da considerare nello studio delle interazioni tra allergeni e sistema immunitario a livello sia locale che periferico, proprio perché spesso le sostanze allergeniche sono ubiquitarie e aerodisperse, è l'interazione tra queste strutture e sostanze inquinanti presenti

nell'ambiente. La produzione delle immunoglobuline di classe E è, in condizioni normali, assai limitata mediante un complesso meccanismo di regolazione negativa che si attua in vari distretti. Nell'apparato respiratorio in genere e nelle vie respiratorie in particolare, due meccanismi di controllo possono essere identificati: uno basato sulla rimozione dell'allergene prevenendone il contatto con il sistema immune, e il secondo basato sulla soppressione immunologica della risposta IgE.

Ciò premesso, è chiaro come ogni fenomeno in grado di disturbare questa delicata omeostasi possa influenzare l'insorgenza di una patologia allergica respiratoria. In tal senso, i dati disponibili nella letteratura scientifica degli ultimi anni indicano che alcuni comuni contaminanti atmosferici delle aree urbane possono giocare un ruolo determinante sia a seguito di una attività irritante sia attraverso altri meccanismi di natura ancora da definire (10-14). Modelli sperimentali hanno finora fornito l'evidenza dell'attività di alcune componenti dell'inquinamento atmosferico sulla risposta IgE nell'animale da esperimento (15-21). Gli studi più recenti nell'uomo dimostrano chiaramente il ruolo del particolato aerodisperso, in particolare quello dai gas di scarico del diesel, come adiuvante per la produzione di anticorpi di classe IgE specifici per allergeni ambientali (22-25).

Erano previsti la realizzazione di un'indagine per acquisire una serie di informazioni dal punto di vista allergologico su soggetti esposti professionalmente ad inquinanti atmosferici, il successivo approfondimento di queste informazioni a livello sierologico, e l'allestimento di modelli animali. Quindi, le attività sperimentali connesse alla linea di ricerca hanno sviluppato essenzialmente due aspetti: "Monitoraggio allergologico dei Vigili Urbani", e "Allestimento e studio di modelli animali".

Monitoraggio allergologico dei Vigili Urbani

Dati epidemiologici

Le visite specialistiche allergologiche sono state organizzate dal Medico Competente Centrale dell'Amministrazione Comunale, Francesco Tomei, con i suoi collaboratori, sullo stesso gruppo di Vigili arruolati negli studi di biomonitoraggio. Durante le visite è stato somministrato un questionario anamnestico e sono stati eseguiti i test di cutirazione (*Skin Prick Test*, SPT) su un pannello di 35 allergeni inalanti comprendenti pollini, acari e micofiti, riportati in Allegato A. Le visite sono state effettuate su 194 Vigili, ripartiti nei gruppi selezionati in base alla mansione (viabilisti addetti al controllo del traffico o amministrativi) e al Gruppo Circoscrizionale di appartenenza, operante in zone ad alto e medio-basso traffico veicolare, come riportato nella Tabella 1.

In base ai criteri di positività fissati (la reazione di SPT è considerata positiva se il diametro medio del ponfo è maggiore di 3 mm, corrispondente al punteggio "+"); un paziente è considerato SPT POS se positivo per almeno uno degli allergeni testati), l'esito degli SPT (Tabella 1) ha evidenziato un valore piuttosto elevato di positività in SPT nei Vigili Urbani (in media 67.0%). Non sono state riscontrate differenze significative tra i tre gruppi di Vigili studiati nei valori di positività riscontrati e quindi nella prevalenza di sensibilizzazione allergica.

Inoltre, l'esame della storia professionale dei Vigili del gruppo C (con mansioni amministrative al momento della visita) ha messo in evidenza che la quasi totalità dei soggetti, a prescindere dalla mansione attuale, aveva precedentemente svolto periodi più o meno lunghi di attività lavorativa nel traffico. Questi elementi hanno posto il problema di esaminare un gruppo di popolazione, con le stesse caratteristiche socio-demografiche, non professionalmente esposto all'inquinamento urbano da traffico, che costituisca un effettivo gruppo di controllo, come verrà in seguito dettagliato.

Tabella 1. Risultati dei test cutanei (SPT) effettuati sui tre gruppi di Vigili Urbani*

Gruppo	Esposizione	Sesso (m/f)	Età (m ± DS)	Vigili visitati (n.)	SPT (%)		SPT pos (%)	
					neg	pos	sintomatici	asintomatici
A - Viabilisti, I Gruppo Circoscrizionale	alta	51/18	42.2 ± 7.4	69	22 (31.9)	47 (68.1)	41 (59.4)	6 (8.7)
B - Viabilisti, VIII e XX Gruppo Circoscrizionale	medio-bassa	51/16	42.2 ± 7.6	67	23 (34.3)	44 (65.7)	37 (55.2)	7 (10.4)
C - Amministrativi	—	41/17	44.7 ± 6.6	58	15 (25.9)	43 (74.1)	39 (67.2)	4 (6.9)
Totale	194	143/51	43.0 ± 7.0	194	60 (30.9)	134 (69.1)	117 (60.3)	17 (8.8)

* criteri di positività dello SPT: una reazione di SPT è considerata positiva se il diametro medio del ponfo è maggiore di 3 mm; un paziente è considerato SPT POS se positivo per almeno uno degli allergeni testati.

L'analisi della distribuzione delle positività in SPT agli allergeni, provati sui 194 Vigili sottoposti a visita allergologica, ha dimostrato che le prevalenze più elevate si riscontrano per i pollini di piante erbacee e di alberi, e per gli acari domestici (Figura 1).

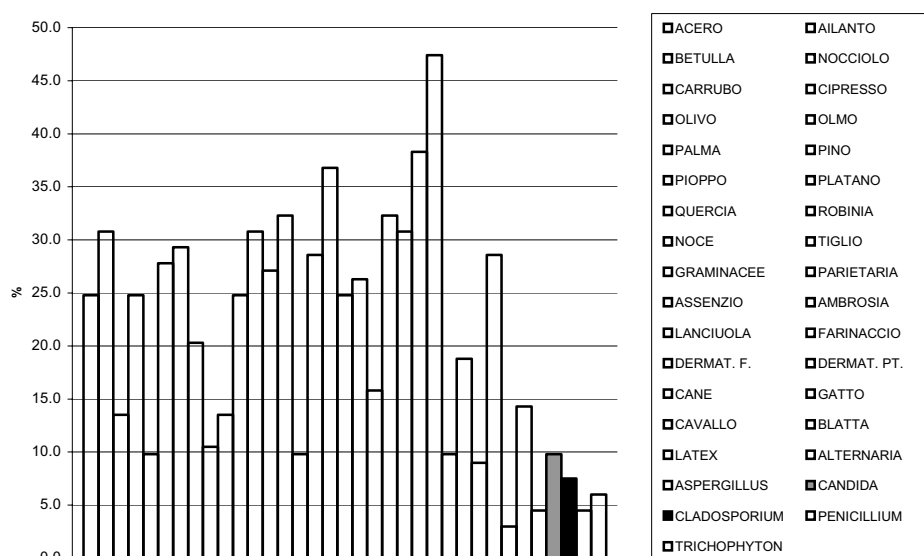


Figura 1. Prevalenza di positività verso il pannello di allergeni impiegato in SPT nei 194 Vigili Urbani

I soggetti monosensibilizzati costituiscono il 9.3% dei positivi. L'anamnesi mirata è stata condotta sia durante il colloquio con il Medico Specialista Allergologo, sia avvalendosi dell'apposito questionario elaborato per questo scopo. I questionari raccolti sono stati classificati per gruppi, e immessi in un programma di database, per l'elaborazione statistica

delle informazioni, effettuata in collaborazione con il Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica dell'Istituto Superiore di Sanità. La popolazione dei 194 Vigili Urbani arruolati nell'indagine è stata rianalizzata, tenendo conto della storia di sintomatologia precedente e successiva all'assunzione nel corpo dei Vigili Urbani. Sono state costituite 3 categorie di soggetti che hanno dichiarato di avere sofferto di raffreddore/rinite, asma, orticaria e allergia prima o dopo essere stati assunti nel corpo dei Vigili Urbani, come risulta dalle risposte alle domande contenute nel questionario:

- Gruppo 1: coloro che hanno manifestato almeno un sintomo DOPO l'assunzione;
- Gruppo 2: coloro che non hanno MAI manifestato una sintomatologia;
- Gruppo 3: coloro che erano sintomatici già PRIMA di essere assunti.

All'interno di queste categorie, la distribuzione dei viabilisti (gruppo A e B) e degli amministrativi (gruppo C) è risultata omogenea (Tabella 2).

Tabella 2. Distribuzione dei Vigili Urbani viabilisti e amministrativi*

Gruppo	Categorie			
	Allergico "DOPO"	Allergico "MAI"	Allergico "SEMPRE"	Totale
A	24 38.7%	31 39.7%	14 25.9%	69 35.6%
B	18 29.0%	28 35.9%	21 38.9%	67 34.5%
C	20 32.3%	19 24.4%	19 35.2%	58 29.9%
Totale	62	78	54	194

* Chi-square = 4.27; degrees of freedom = 4; p value = 0.37085637

Le tre categorie sono risultate omogenee anche per età, sesso, residenza, abitudine al fumo (attivo e passivo), presenza di animali domestici e familiarità per raffreddore, asma, orticaria, allergia. In accordo con la letteratura, la prevalenza di allergie risulta associata al titolo di istruzione e si riscontra una differenza tra le categorie 1 e 2 (omogenee) contro la categoria 3 (Tabella 3).

Tabella 3. Titolo di studio (Vigili Urbani)*

Titolo di studio	Categorie			
	Allergico "DOPO"	Allergico "MAI"	Allergico SEMPRE	Totale
Media inferiore	15 24.2%	18 23.1%	4 7.4%	37 19.1%
Media superiore	47 75.8%	60 76.9%	50 92.6%	157 80.9%
Totale	62	78	54	194

*Chi square = 6.62; degrees of freedom = 2; p value = 0.03643379

Considerando la variabile "esposizione al traffico", i Vigili sono stati raggruppati a seconda dell'esposizione da loro stessi dichiarata sempre nell'ambito del questionario somministrato (bassa e lieve contro alta), non tenendo conto per il momento della durata.

La Tabella 4 riporta la distribuzione dei 194 Vigili secondo la categoria di sintomatologia allergica e l'esposizione al traffico. Il 79% dei Vigili che hanno dichiarato di avere sviluppato allergia dopo l'assunzione è risultato essere stato esposto a traffico pesante, contro il 61% dei Vigili sintomatici prima e dopo, e il 55% dei Vigili che sono sempre stati asintomatici ($p=0.01$).

Quindi il rischio dovuto all'esposizione a traffico pesante, di essere sintomatici dopo l'assunzione, è di 3.1 (IC 95%: 1.4-6.5) sulla base delle risposte fornite nel questionario.

Tabella 4. Attività lavorativa svolta in alto traffico (Vigili Urbani)*

Attività in alto traffico	Categorie			
	Allergico "DOPO"	Allergico "MAI"	Allergico SEMPRE"	Totale
No	13 21.0%	35 44.9%	21 38.9%	69 35.6%
Sì	49 79.0%	43 55.1%	33 61.1%	125 64.0%
Totale	62	78	54	194

*Chi square = 8.97; degrees of freedom = 2; p value = 0.01125920

Analizzando la percentuale dei soggetti che ha eseguito test per la diagnosi di allergia nelle tre categorie, si riscontra che effettivamente molti soggetti che riferivano una sintomatologia di tipo allergico non avevano mai eseguito un test specifico. Analoga osservazione può essere fatta per la Immunoterapia Specifica ("vaccino").

Per quanto riguarda i test cutanei, si evidenzia chiaramente che non c'è una differenza significativa fra le tre categorie di soggetti per quanto riguarda la reattività cutanea ad almeno due allergeni (polisensibilizzazione). Considerando soltanto la categoria 1 (Tabella 5), si osserva una debole associazione tra l'esposizione al traffico pesante e il numero di allergeni a cui i soggetti risultano positivi.

Tabella 5. Sensibilizzazione allergica (Vigili Urbani)*

Attività in alto traffico	Categorie			Totale
	1 allergene	2 o + allergeni	Nessuno	
No	3 23.0%	5 38.5%	5 38.5%	13
Sì	3 6.1%	34 69.4%	12 24.5%	49
Totale	6 9.7%	39 62.9%	17 27.4%	62

*Chi square = 5.35; degrees of freedom = 2; p value = 0.06906420

Una successiva analisi dei dati raccolti è stata condotta costituendo 3 nuove categorie di soggetti che hanno sofferto di raffreddore/rinite solo primavera e/o tutto l'anno, prima o dopo essere stati assunti nel corpo dei Vigili Urbani:

- Gruppo 1: coloro che hanno manifestato rinite in almeno uno dei due periodi solo DOPO l'assunzione;
- Gruppo 2: coloro che non hanno MAI manifestato rinite;
- Gruppo 3: coloro che hanno manifestato rinite PRIMA di essere assunti.

Questo ha permesso di lavorare solo con i soggetti che dichiaravano di soffrire di un problema allergologico, sicuramente rapportato ad una patologia IgE-mediata e legata a fonti allergeniche aerodisperse. Con queste categorie è stata studiata l'eventuale associazione con l'esposizione al traffico pesante (Tabella 6).

Tabella 6. Attività lavorativa svolta in alto traffico (Vigili Urbani)*

Attività in alto traffico	Categorie			
	Rinite "DOPO"	Rinite "MAI"	Rinite "SEMPRE"	Totale
No	8 29.6%	57 38.0%	4 23.5%	69 35.6%
Sì	19 70.4%	93 62.0%	13 76.5%	125 64.4%
Totale	27	150	17	194

*Chi square = 1.88; degrees of freedom = 2; p value = 0.39107790

Dall'analisi della Tabella 6 si evince che la rinite, riferita come sintomo, non sembra essere correlata all'esposizione all'alto traffico. Anche con questo nuovo criterio di classificazione non si riscontrano differenze significative fra le tre categorie di soggetti per quanto riguarda la reattività cutanea ad almeno due allergeni.

L'analisi dei dati demografici e anamnestici indica che il questionario somministrato si è rivelato un valido ausilio per valutare lo stato di salute della popolazione esaminata. Inoltre, appare evidente che le informazioni che si ottengono sono di natura complessa e richiedono una attenta valutazione, che è funzione dei vari aspetti presi in considerazione dal questionario stesso. In tal senso, di un certo interesse sono i dati che si ottengono analizzando i soggetti che si autodichiarano allergici e i soggetti che si autodichiarano sofferenti di rinite.

Saggi *in vitro*

La determinazione quantitativa delle IgE totali, effettuata sui campioni di siero di 194 Vigili Urbani, ha dato risultati sostanzialmente concordanti con i risultati delle cutireazioni (Tabella 7).

Tabella 7. Risultati del test per le IgE totali effettuato sui tre gruppi di Vigili Urbani

Gruppo	SPT neg (media±DS)*	SPT pos (media±DS)*
A	19.98±23.61°	157.46±262.67°
B	34.03±35.72§	192.75±355.36§
C	83.11±195.81^	130.68±125.33^

* risultati espressi in kU/l; °p < 0.0005; §p > 0.005; ^p = 0.18 (n.s.)

Nonostante l'elevata variabilità dei valori quantitativi espressi in kU/l, è stato possibile rilevare differenze statisticamente significative tra i soggetti SPT-positivi e quelli SPT-negativi nei gruppi A e B, mentre nel gruppo C tale differenza non risulta significativa.

In base ai risultati ottenuti con lo SPT che evidenziavano una elevata percentuale di soggetti con positività cutanea verso più allergeni (polisensibili), per l'analisi *in vitro* delle IgE specifiche sono stati selezionati due diversi "panallergeni" di natura proteica, Bet v 2 e Jun o 2,

e una molecola modello, la bromelina, contenente epitopi glicidici ampiamente rappresentati sulle glicoproteine allergeniche. Questo approccio era mirato a chiarire ulteriormente se nei soggetti polisensibili la presenza di numerose positività *in vivo* sia dovuta all'effettivo riconoscimento di molteplici allergeni da differenti fonti, o se invece sia riconducibile al riconoscimento di una o poche molecole allergeniche, in questo caso anche di natura glicidica, ampiamente diffuse in un gran numero di fonti allergeniche. È stato utilizzato un metodo *in vitro* disponibile in commercio che fa uso di un sistema automatizzato e gestito da computer, per garantire la qualità e la riproducibilità delle determinazioni. I risultati indicano che tra tutti i soggetti polisensibili esaminati, solo una ristretta percentuale presenta anticorpi IgE specifici per allergeni condivisi da fonti non tassonomicamente correlate (Bet v 2 e/o epitopi glicidici). Occorre comunque sottolineare che il reale significato clinico delle IgE specifiche per i carboidrati deve comunque ancora essere chiarito. Tutti gli altri casi di polispecificità sono da ricondurre ad una positività verso molteplici allergeni, oppure alla possibile reattività verso altri panallergeni non ancora noti.

Analisi del gruppo di controllo

Durante l'analisi dei dati epidemiologici relativi ai tre gruppi di Vigili Urbani, oggetto della prima parte dello studio, è emersa la necessità di raccogliere dati analoghi su un gruppo di controllo non professionalmente esposto all'inquinamento urbano da traffico veicolare.

A tal fine, è stata richiesta ancora la collaborazione del Comune di Roma e del Medico Competente per studiare un gruppo di dipendenti comunali addetti a mansioni amministrative. Dopo la concessione delle necessarie autorizzazioni da parte del Comune di Roma, è stato quindi selezionato un gruppo di 71 amministrativi, con caratteristiche omogenee per distribuzione di sesso ed età rispetto ai gruppi di Vigili Urbani precedentemente studiati. Sono state effettuate le visite specialistiche allergologiche, con le stesse modalità già impiegate nello studio sui Vigili Urbani (anamnesi, test di cutireazione, somministrazione di questionario e prelievo di un campione di sangue), dopo aver ottenuto il consenso informato degli interessati.

Dati epidemiologici

In Tabella 8 sono riportate le caratteristiche demografiche e l'abitudine al fumo del gruppo di controllo rispetto a quello dei vigili.

I dipendenti comunali amministrativi sono leggermente più anziani e la percentuale di donne è un po' più elevata che nei vigili (36.6% vs. 26.3), anche se queste differenze non sono statisticamente significative. Gli amministrativi risultano però avere un titolo di studio più elevato dei vigili (solo media superiore e laurea: 97.2% vs. 80.9%). Anche l'abitudine passata e presente al fumo risulta significativamente differente nei due gruppi (40.9% vs 58.8). La familiarità per allergie e i disturbi allergici riferiti prima dell'assunzione non differiscono nei due gruppi (Tabella 9).

Tabella 8. Distribuzione di variabili demografiche e abitudine al fumo nel gruppo dei Vigili Urbani e dei dipendenti comunali amministrativi

Variabile		Vigili Urbani (n. 194)	Amministrativi (n. 71)	p
Sesso	<i>maschi</i>	143 (73.7%)	45 (63.4%)	0.10
	<i>femmine</i>	51 (26.3%)	26 (36.6%)	
Età	<35	31 (16.0%)	9 (12.7%)	0.67
	>=35 & <=39	53 (27.3%)	18 (25.4%)	
	>=40 & <=44	38 (19.6%)	18 (25.4%)	
	>=45 & <=49	37 (19.1%)	9 (12.7%)	
	>=50 & <=54	25 (12.9%)	12 (16.9%)	
	>=55	9 (4.6%)	4 (5.6%)	
Titolo di studio	<i>media inferiore</i>	35 (18.0%)	2 (2.8%)	<0.01
	<i>media superiore/laurea</i>	157 (80.9%)	69 (97.2%)	
Fumo	<i>mai</i>	80 (41.2%)	42 (59.2%)	<0.01
	<i>ex fumatore/fumatore attuale</i>	114 (58.8%)	29 (40.9%)	
Fumo passivo (casa e/o ufficio)	<i>no</i>	62 (32.0%)	47 (66.2%)	<0.01
	<i>sì</i>	132 (68.0%)	24 (33.8%)	

Tabella 9. Distribuzione della familiarità per disturbi allergici e positività agli SPT nel gruppo dei Vigili Urbani e dei dipendenti comunali amministrativi

Variabile		Vigili Urbani (n. 194)	Amministrativi (n. 71)	p
Familiarità	<i>no</i>	83 (42,8%)	31 (43,7%)	0.90
	<i>sì</i>	111 (57,2%)	40 (56,3%)	
Disturbi prima dell'assunzione	<i>no</i>	140 (72,2%)	49 (69,0%)	0.61
	<i>sì</i>	54 (27,8%)	22 (31,0%)	
Esito allergeni	<i>nessun allergene</i>	57 (29,4%)	26 (36,6%)	0.02
	<i>positivo ad 1 solo allergene</i>	18 (9,3%)	14 (19,7%)	
	<i>positivo a 2 o più allergeni</i>	119 (61,3%)	31 (43,7%)	
Tipo di allergeni	<i>nessun allergene</i>	57 (29,4%)	26 (36,6%)	0.07
	<i>outdoor o entrambi</i>	123 (63,4%)	35 (49,3%)	
	<i>solo indoor</i>	14 (7,2%)	10 (14,1%)	

In base agli stessi criteri di positività precedentemente fissati per i gruppi di Vigili Urbani, l'esito degli SPT nel gruppo di controllo ha rilevato un valore di positività dello stesso ordine di grandezza (63.3%) di quello ottenuto nei Vigili Urbani; i soggetti monosensibili costituiscono il 19.7% dei soggetti positivi, rispetto al 9.3% dei Vigili Urbani. L'analisi dettagliata della distribuzione delle positività in SPT agli allergeni, provati sui 71 dipendenti comunali sottoposti a visita allergologica, ha dimostrato che anche nel caso della popolazione di controllo le prevalenze più elevate si riscontrano per gli acari domestici, ma a differenza di quanto osservato nella popolazione di Vigili Urbani precedentemente studiata (Figura 1) si ottengono percentuali sensibilmente più basse di prevalenza soprattutto per i pollini di alberi e di piante erbacee (Figura 2).

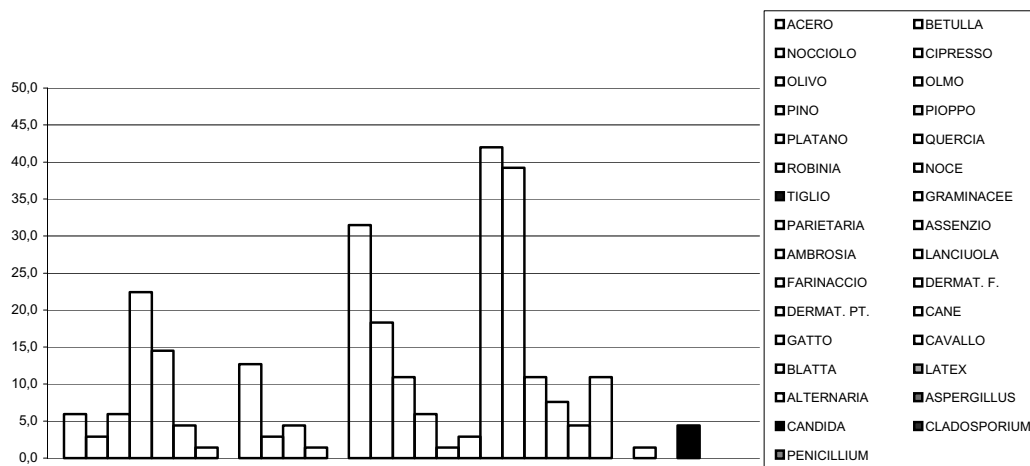


Figura 2. Prevalenza di positività verso il pannello di allergeni inalanti impiegato in SPT nei 71 dipendenti comunali

Valori di prevalenza confrontabili tra le due popolazioni si riscontrano soltanto per i pollini di Cupressaceae e Graminaceae, oltre che per i due acari domestici. Lo sbilanciamento del gruppo di controllo per le variabili istruzione e abitudine al fumo, descritte in letteratura come correlate alla patologia allergica, ha reso necessaria un'analisi di tipo multivariato per verificare l'ipotesi che non vi fossero differenze tra il gruppo dei Vigili e quello di controllo rispetto alla prevalenza di sensibilità agli allergeni testati. Nell'analisi sono state anche incluse le variabili età e sesso, la cui distribuzione era comunque leggermente sbilanciata nei due gruppi a confronto. Nelle Tabelle 10 e 11 vengono riportati i risultati dell'associazione tra positività alle cutireazioni (SPT) e condizione di Vigile.

Tabella 10. Associazione tra positività agli SPT (un allergene o due o più) e condizione di Vigile*

Covariate		1 allergene		2 o più allergeni	
		OR	IC 95%	OR	IC 95%
Categorie	<i>amministrativi</i>	1		1	
	<i>vigili</i>	0.9	(0.3-2.3)	2.3	(1.1-4.6)
Sesso	<i>femmine</i>	1		1	
	<i>maschi</i>	1.4	(0.5-4.1)	0.8	(0.4-1.5)
Età	<i><35</i>	1		1	
	<i>>=35 & <=39</i>	2.8	(0.5-15.8)	1.4	(0.6-3.3)
	<i>>=40 & <=44</i>	5.3	(0.9-30.2)	1.8	(0.7-4.8)
	<i>>=45 & <=49</i>	2.5	(0.4-16.0)	0.8	(0.3-2.2)
	<i>>=50 & <=54</i>	2.7	(0.4-18.9)	1.1	(0.4-3.4)
	<i>>=55</i>	2.4	(0.3-23.3)	0.4	(0.1-1.9)
Titolo di studio	<i>media inferiore</i>	1		1	
	<i>media superiore/laurea</i>	2.9	(0.6-15.5)	1.1	(0.5-2.8)
Fumo	<i>mai</i>	1		1	
	<i>ex fumatore/fumatore attuale</i>	0.9	(0.4-2.1)	0.5	(0.3-1.0)
Fumo passivo	<i>no</i>	1		1	
	<i>sì</i>	0.6	(0.2-1.4)	0.9	(0.5-1.6)

*Variabile dipendente: numero di allergeni a cui il soggetto è sensibile. Codifiche variabile dipendente: 0 = "0 allergeni" (categoria di riferimento); 1 = "1 allergene"; 2 = "2 o più allergeni".

Tabella 11. Associazione tra positività agli SPT (allergeni *indoor* e *outdoor*/entrambi) e condizione di Vigile*

Covariate		<i>Indoor</i>		<i>Outdoor/entrambi</i>	
		OR	IC 95%	OR	IC 95%
Categorie	<i>amministrativi</i>	1		1	
	<i>vigili</i>	1.1	(0.4-3.4)	2.0	(1.0-4.1)
Sesso	<i>femmine</i>	1		1	
	<i>maschi</i>	0.5	(0.2-1.6)	0.9	(0.5-1.8)
Età	<i><35</i>	1		1	
	<i>>=35 & <=39</i>	1.1	(0.3-4.9)	1.5	(0.6-3.7)
	<i>>=40 & <=44</i>	2.0	(0.4-9.3)	2.1	(0.8-5.6)
	<i>>=45 & <=49</i>	0.6	(0.1-4.0)	1.0	(0.4-2.7)
	<i>>=50 & <=54</i>	2.7	(0.5-15.8)	1.1	(0.4-3.4)
	<i>>=55</i>	1.0	(0.1-12.6)	0.6	(0.1-2.3)
Titolo di studio	<i>media inferiore</i>	1		1	
	<i>media superiore/laurea</i>	4.3	(0.5-39.6)	1.2	(0.5-2.9)
Fumo	<i>mai</i>	1		1	
	<i>ex fumatore/fumatore attuale</i>	0.6	(0.2-1.6)	0.6	(0.3-1.0)
Fumo passivo	<i>no</i>	1		1	
	<i>sì</i>	0.7	(0.2-1.9)	0.8	(0.4-1.5)

*Variabile dipendente: tipo di allergene a cui il soggetto è sensibile. Codifiche variabile dipendente: 0 = "nessun allergene" (categoria di riferimento); 1 = "allergeni *indoor*"; 2 = "allergeni *outdoor*/entrambi".

Per quanto riguarda la situazione di monosensibilizzazione rispetto a quella di polisensibilizzazione, i Vigili presentano un rischio circa doppio rispetto agli amministrativi di essere positivi a 2 o + allergeni (OR=2.3, 95% IC 1.1-4.6), avendo tenuto in considerazione l'età, il sesso, l'istruzione, l'abitudine al fumo.

Rispetto invece alla sensibilizzazione verso allergeni rappresentati nell'ambiente esterno (*outdoor*) o in quello interno (*indoor*), per i Vigili si riscontra un rischio doppio di essere positivi ad allergeni *outdoor* (OR=2.0, 95% IC 1.0-4.1). L'indicazione fornita da questo dato dovrebbe essere ulteriormente confermata dall'analisi di un gruppo di controllo di dimensioni comparabili (sono stati studiati 71 controlli vs. 194 Vigili Urbani). Un altro importante fattore da considerare nella valutazione del peso di questo dato è costituito dalle differenti annualità in cui, per motivi legati al reclutamento dei soggetti da esaminare, è stato effettuato lo studio: in questa situazione non è possibile escludere che differenti stagioni polliniche possano aver influito sui risultati degli SPT, proprio per quanto riguarda la polisensibilizzazione ad allergeni *outdoor*.

Saggi *in vitro*

Sui 70 campioni di siero disponibili dei 71 dipendenti comunali amministrativi è stata effettuata la valutazione quantitativa delle IgE totali. Nella totalità dei soggetti è stato trovato un valore medio di 111.69 kU/l di IgE totali, con un valore medio di 65.12 kU/l nei soggetti SPT-negativi, e di 141.62 kU/l in quelli SPT-positivi. I risultati indicano che i valori si distribuiscono nel gruppo di controllo con elevata variabilità, paragonabile a quella riscontrata nei gruppi di Vigili Urbani; non si rilevano differenze statisticamente significative tra i soggetti SPT-positivi e quelli SPT-negativi, analogamente a quanto riscontrato nel gruppo C (Vigili Urbani adibite a mansioni amministrative).

Anche la determinazione di IgE specifiche per comuni panallergeni e per epitopi glicidici ha dato risultati sovrapponibili a quelli ottenuti con i tre gruppi di Vigili Urbani.

Allestimento e studio dei modelli animali

Come accennato nella parte introduttiva, sono disponibili nella letteratura scientifica dati che dimostrano come componenti del particolato aerodisperso possono influenzare la produzione di anticorpi di classe IgE, specifici per allergeni ambientali. Per sviluppare un modello animale nel quale valutare il ruolo del particolato aerodisperso nella patologia allergica, è indispensabile precedentemente mettere a punto un protocollo di sensibilizzazione, sistemica e locale, dell'animale con differenti allergeni. È stato quindi inizialmente ottenuto un modello murino di sensibilizzazione verso l'estratto pollinico di *Olea europaea* (Figura 3).

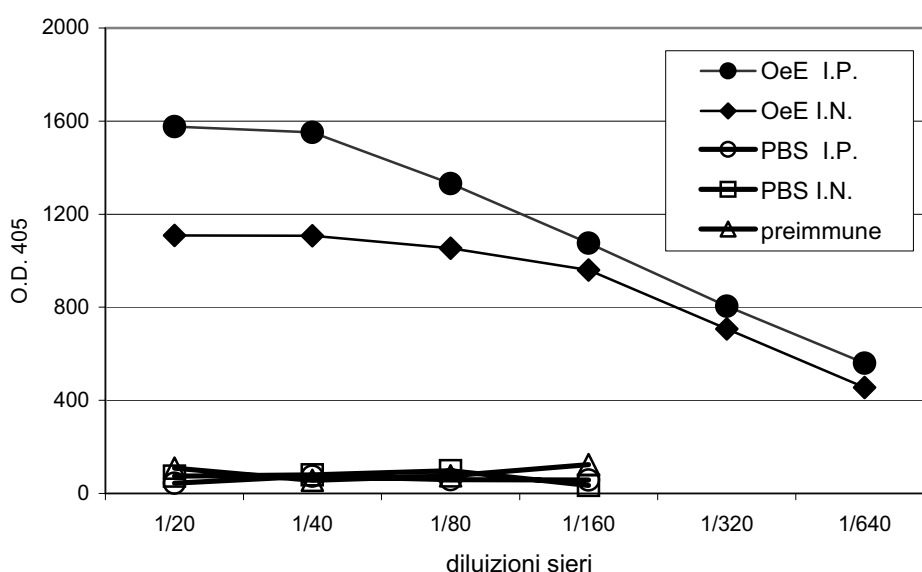


Figura 3. Induzione di anticorpi IgE specifici per l'estratto allergenico di *Olea europaea* (OeE) in topi Balb/c

Al fine di verificare che il modello a disposizione potesse essere impiegato anche per altri estratti pollinici, è stato applicato lo stesso protocollo sperimentale per il trattamento degli animali con gli estratti proteici ottenuti dal polline di *Cupressus arizonica* e di *Parietaria judaica* (26, 27). Tutti gli estratti allergenici impiegati sono stati scelti perché di particolare rilievo nel nostro Paese e nell'area Mediterranea in generale. I risultati ottenuti attraverso la sensibilizzazione sistemica sono analoghi a quelli derivati dall'impiego dell'estratto di *Olea europaea*. Per quanto riguarda la sensibilizzazione locale, la somministrazione intranasale degli estratti di *C. arizonica* e *P. judaica* non ha dato risultati soddisfacenti, rendendo necessari altri esperimenti per l'individuazione di nuovi protocolli di sensibilizzazione.

Inoltre, per il *C. arizonica* è stato possibile impiegare la molecola dell'allergene maggiore purificata, nCup a 1 (28), e per la *P. judaica* la molecola ricombinante dell'allergene maggiore, rPar j 1 (29). Infatti, come dimostrato dai molti dati presenti nella letteratura scientifica,

l'impiego di molecole ricombinanti o purificate è di fondamentale importanza per l'individuazione e l'accurata caratterizzazione degli allergeni causali della patologia in esame. I risultati della sensibilizzazione sistemica sono riportati nelle Figure 4 e 5.

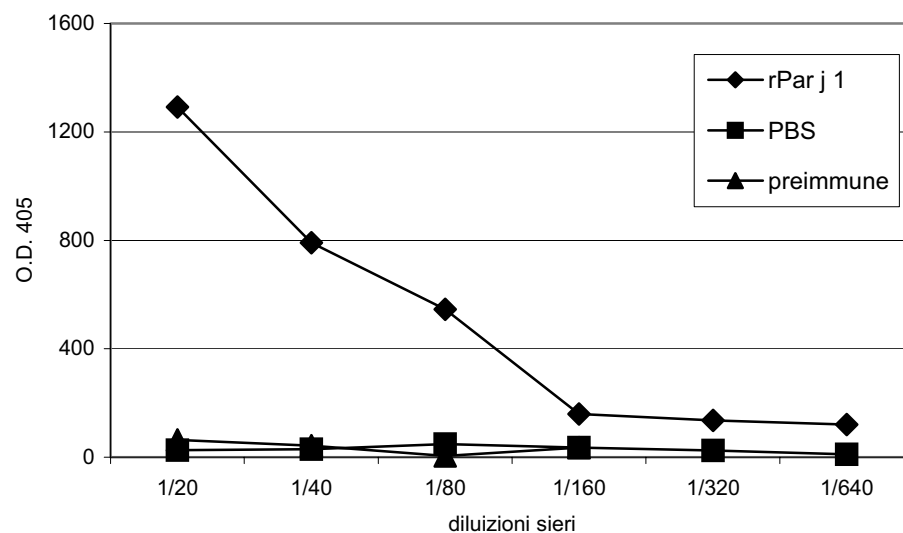


Figura 4. Induzione di anticorpi IgE per l'allergene ricombinante rPar j 1 in topi Balb/c

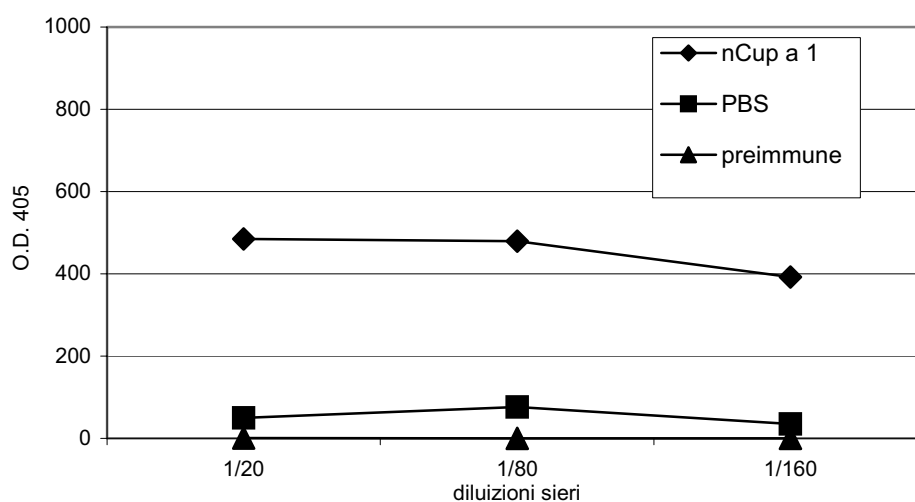


Figura 5. Induzione di anticorpi IgE per l'allergene purificato nCup a 1 in topi Balb/c

Nel modello di sensibilizzazione sistemica ottenuto con le molecole nCup a 1 e rPar j 1, è stata condotta anche una caratterizzazione della produzione di anticorpi di classe IgG. In particolare gli isotipi IgG1 e IgG2a, che nel topo rappresentano rispettivamente le due

sottoclassi proprie di una risposta di tipo Th2 o Th1. I risultati, mostrati nelle Figure 6 e 7, indicano che l'immunizzazione intraperitoneale ha portato ad una risposta di tipo Th2.

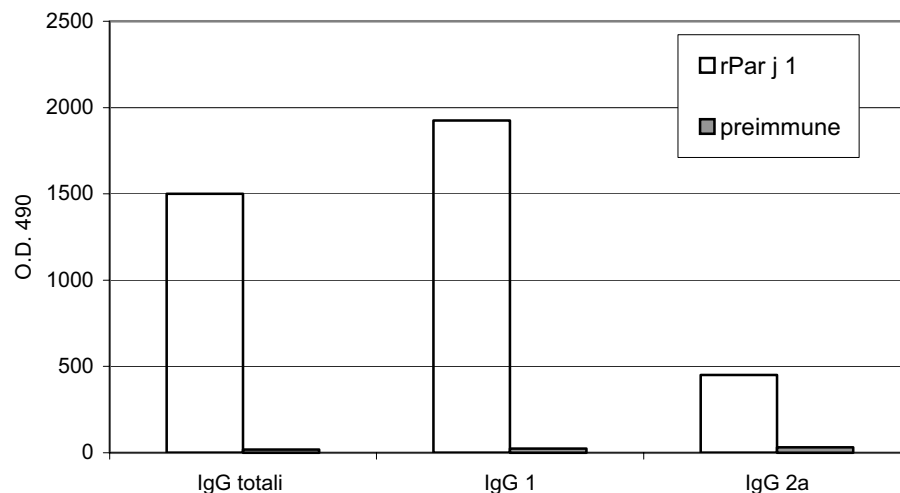


Figura 6. Induzione di anticorpi IgG per l'allergene rPar j 1 in topi Balb/c

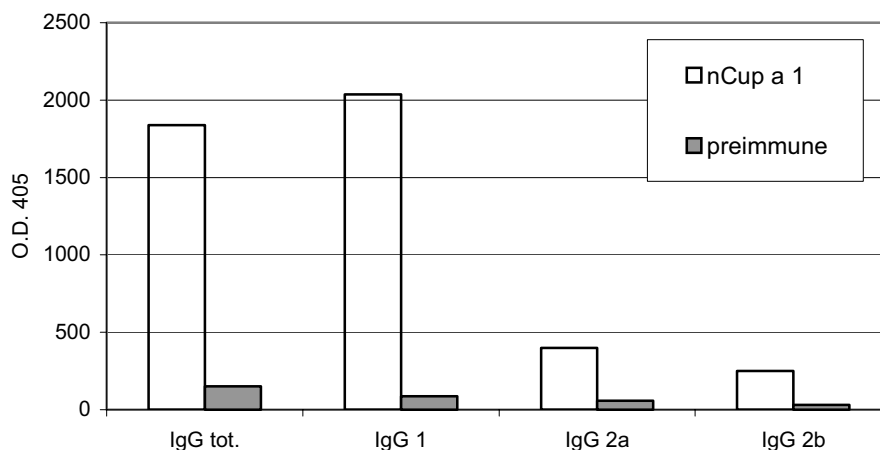


Figura 7. Induzione di anticorpi IgG per l'allergene nCup a 1 in topi Balb/c

Per quanto riguarda la sensibilizzazione locale, anche in questo caso, impiegando il metodo già descritto per l'estratto pollinico di *Olea europaea*, la somministrazione intranasale non ha dato risultati positivi. Quindi, sono stati provati altri due protocolli sperimentali, schematizzati nella Allegato B, che non hanno dato risultati soddisfacenti. Attualmente sono in corso nuovi protocolli sperimentali per sviluppare un modello di sensibilizzazione locale con le due nuove fonti allergeniche, impiegando un apposito adiuvante specifico per l'immunizzazione indotta per via mucosale.

Conclusioni e possibili ricadute

Le malattie allergiche costituiscono un rilevante problema di salute pubblica, con elevati costi sociali legati sia alla spesa diretta per la diagnosi e la terapia, che a quella indiretta dovuta alla perdita di giornate lavorative, nonché un generale peggioramento della qualità della vita. Le sorgenti primarie delle sensibilizzazioni allergiche più diffuse sono molto varie, e vanno dalle componenti aerodisperse (pollini, micofiti, acari, ecc.) agli alimenti più comuni o a conservanti in essi contenuti. Una volta indotta, tale sensibilizzazione è seguita da un processo patologico di tipo infiammatorio che, se non propriamente individuato, diagnosticato e trattato, spesso si traduce in un danno irreversibile (degenerazioni di natura fibrosa, perdita di funzionalità polmonare, ecc.).

Le varie fasi della patologia allergica, che vanno dall'assenza di manifestazioni patologiche fino alla irreversibilità delle stesse, possono essere efficacemente prevenute e contrastate introducendo tre livelli di prevenzione: a) primaria, tendente a limitare il processo di sensibilizzazione allergica. Quest'ultima deriva dall'esposizione ad allergeni e a co-fattori ad azione facilitante; b) secondaria, finalizzata a prevenire la comparsa della sintomatologia una volta stabilitasi la sensibilizzazione allergica; c) terziaria, volta a controllare e ridurre il danno conseguente il permanere della sintomatologia. Quanto più precoce e incisivo è l'intervento preventivo nell'evoluzione della patologia allergica, tanto più limitato sarà il danno per la popolazione interessata. Quindi il controllo dell'inquinamento atmosferico, nella sua globalità e con particolare riguardo alla riduzione dell'esposizione al particolato aerodisperso ad esso associato, è da considerarsi un importante intervento di prevenzione primaria.

I dati raccolti nel presente studio sembrano indicare che l'esposizione all'inquinamento atmosferico nelle aree urbane può favorire lo sviluppo delle patologie allergiche, contribuendo alla multifattorialità della malattia. Tali risultati devono comunque essere valutati con cautela, tenendo presente alcune considerazioni. In primo luogo, la elevata prevalenza di positività in SPT, rilevata in questo studio sia nei gruppi di popolazione professionalmente esposta (Vigili Urbani) che nel gruppo di controllo (dipendenti comunali), appare molto superiore al valore generale di prevalenza di patologie allergiche registrata nei Paesi a stile di vita occidentale (15-30%) (30). È necessario d'altra parte sottolineare che il nostro dato riflette la sensibilizzazione verso allergeni inalanti, ma non è di per sé stesso indice diretto di patologia allergica: per la verifica di quest'ultima situazione sarebbe infatti stata necessaria una anamnesi clinica approfondita che non poteva essere effettuata nel contesto di tale studio. Inoltre, il pannello di allergeni impiegato è molto più ampio di quello comunemente usato nelle indagini epidemiologiche, che di solito comprende al massimo una decina di estratti allergenici. Infine, almeno per l'Italia, non esistono studi epidemiologici sulla prevalenza di patologie allergiche nella popolazione generale adulta, quindi risulta difficile operare un confronto corretto con i dati raccolti nel presente studio. Le differenze tra i gruppi professionalmente esposti con differente intensità al traffico veicolare rispetto alla popolazione urbana generale non sembrano essere di tipo quantitativo (le prevalenze di positività in SPT sono paragonabili). Piuttosto, appaiono di tipo qualitativo, in quanto le due popolazioni mostrano differenze nella tipologia degli allergeni riconosciuti (allergeni da pollini vegetali rispetto ad allergeni *indoor* quali acari e micofiti) e nel loro numero (monosensibili verso polisensibili). In tal senso, i dati presentati a conclusione del presente progetto forniscono nel loro insieme un originale contributo alla valutazione del rischio della esposizione ambientale in aree urbane in campo allergologico.

Per quanto riguarda gli studi sui modelli animali, le difficoltà incontrate nella fase di messa a punto di un modello animale sensibile ed efficace hanno di fatto rallentato lo studio *in vivo*, per cui non è stato possibile passare in tempo utile alla fase successiva di valutazione degli effetti degli inquinanti sulla sensibilizzazione allergica. La disponibilità di un buon modello animale,

adatto per diversi allergeni da pollini rilevanti nell'area Mediterranea, costituirà comunque una solida base di partenza per poter studiare tutte le possibili variabili coinvolte nelle interazione tra sistema immunitario, allergeni aerodispersi e sostanze inquinanti presenti nell'ambiente, con particolare attenzione a due aspetti diversi ma complementari: 1) l'effetto sul sistema immunitario, 2) l'azione sulla struttura stessa del polline.

Bibliografia

1. Mosmann TR, Coffmann RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-73.
2. Wierenga EA, Snoek M, Jansen HM, Bos JD, van Lier RA, Kapsenberg ML. Human atopen-specific types 1 and 2 T helper cell clones. *J Immunol* 1991;147:2942-9.
3. Parronchi P, Macchia D, Piccinini MP, Biswas P, Simonelli C, Maggi E, Ricci M, Ansari AA, Romagnani S. Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4538-42.
4. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994;12:227-57.
5. Pene J *et al.* IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:6880-4.
6. Romagnani S. Regulation and deregulation of human IgE synthesis *Immunol Today* 1990;11:316-21.
7. Robinson DS, Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992;326:298-304.
8. Del Prete GF, Del Prete GF, De Carli M, D'Elis MM, Maestrelli P, Ricci M, Fabbri L, Romagnani S. Allergen exposure induces the activation of allergen-specific Th2 cells in the airway mucosa of patients with allergic respiratory disorders. *Eur J Immunol* 1993;23:1445-9.
9. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994;76:241-51.
10. Knox RB, Suphioglu C, Taylor P, Desai R, Watson HC, Peng JL, Bursill LA. Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clin Exp Allergy* 1997;27:246-51.
11. Nel AE, Diaz-Sanchez D, Ng D, Hiura T, Saxon A. Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:539-54.
12. Ormstad H, Johansen BV, Gaarder PI Airborne house dust particles and diesel exhaust particles as allergen carriers. *Clin Exp Allergy* 1998;28:702-8.
13. Antico A. Environmental factors and allergic airway diseases. *Aerobiologia* 2000;16:321-329.
14. Fujimaki H, Saneyoshi K, Nohara O, Shiraishi F, Imai T. Intranasal instillation of diesel exhaust particulates and antigen in mice modulated cytokine productions in cervical lymph node cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;108:268-73.
15. Nilsen A, Hagemann R, Eide I. The adjuvant activity of diesel exhaust particles and carbon black on systemic IgE production to ovalbumin in mice after intranasal instillation. *Toxicology* 1997;31;124:225-32.
16. Ichinose T, Takano H, Miyabara Y, Yanagisawa R, Sagai M. Murine strain differences in allergic airway inflammation and immunoglobulin production by a combination of antigen and diesel exhaust particles. *Toxicology* 1997;19;122:183-92.

17. Maejima K, Tamura K, Taniguchi Y, Nagase S, Tanaka H. Comparison of the effects of various fine particles on IgE antibody production in mice inhaling Japanese cedar pollen allergens. *J Toxicol Environ Health* 1997;24:52:231-48.
18. Fujimaki H, Nohara O, Ichinose T, Watanabe N, Saito S. IL-4 production in mediastinal lymph node cells in mice intratracheally instilled with diesel exhaust particulates and antigen. *Toxicology* 1994;6:92:261-8.
19. Miyabara Y, Yanagisawa R, Shimojo N, Takano H, Lim HB, Ichinose T, Sagai M. Murine strain differences in airway inflammation caused by diesel exhaust particles. *Eur Respir J* 1998;11:291-8.
20. Miyabara Y, Ichinose T, Takano H, Lim HB, Sagai M. Effects of diesel exhaust on allergic airway inflammation in mice. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:805-12.
21. Steerenberg PA, Dormans JA, van Doorn CC, Middendorp S, Vos JG, van Loveren H. A pollen model in the rat for testing adjuvant activity of air pollution components. *Inhal Toxicol* 1999;11:1109-22.
22. Diaz-Sanchez D, Dotson AR, Takenaka H, Saxon A. Diesel exhaust particles induce local IgE production *in vivo* and alter the pattern of IgE messenger RNA isoforms. *J Clin Invest* 1994;94:1417-25.
23. Takenaka H, Zhang K, Diaz-Sanchez D, Tsien A, Saxon A. Enhanced human IgE production results from exposure to the aromatic hydrocarbons from diesel exhaust: direct effects on B-cell IgE production. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:103-15.
24. Diaz-Sanchez D. The role of diesel exhaust particles and their associated polyaromatic hydrocarbons in the induction of allergic airway disease. *Allergy* 1997;52(38):52-8.
25. Diaz-Sanchez D, Garcia MP, Wang M, Jyralla M, Saxon A. Nasal challenge with diesel exhaust particles can induce sensitization to a neoallergen in the human mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:1183-8.
26. Di Felice G, Caiaffa MF, Bariletto G, Afferni C, Di Paola R, Mari A, Palumbo S, Tinghino R, Sallusto F, Tursi A, Macchia L, Pini C. Allergens of Arizona cypress (*Cupressus arizonica*) pollen: characterization of the pollen extract and identification of the allergenic components. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:547-55.
27. D'Amato G, Lobefalo G. Allergenic pollens in the southern Mediterranean area. *J Allergy Clin Immunol* 1989;83:116-22.
28. Aceituno E, Del Pozo V, Minguez A, Arrieta I, Cortegano I, Cardaba B, Gallardo S, Rojo M, Palomino P, Lahoz C. Molecular cloning of major allergen from *Cupressus arizonica* pollen: Cup a 1. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1750-8.
29. Costa MA, Colombo P, Izzo V, Kennedy H, Venturella S, Cocchiara R, Mistrello G, Falagiani P, Geraci D. cDNA cloning, expression and primary structure of Par jI, a major allergen of *Parietaria judaica* pollen. *FEBS Lett* 1994;341:182-6.
30. Kay A. *Allergy and allergic disease*. Oxford (UK): Blackwell Science; 1997.

Allegato A

Elenco degli allergeni utilizzati per lo SPT

Pollini alberi

Acero (*Acer pseudoplatanus*)
Ailanto (*Ailanthus altissima*)
Betulla (*Betula* spp.)
Nocciolo (*Corylus avellana*)
Carrubo (*Ceratonia siliqua*)
Cipresso (*Cupressus arizonica*)
Olivo (*Olea europea*)
Olmo (*Ulmus campestris*)
Palma Canarie (*Phoenix canariensis*)
Pino (*Pinus silvestris*)
Pioppo (*Populus alba*)
Platano (*Platanus hybrida*)
Quercia (*Quercus robur*)
Robinia (*Robinia pseudoacacia*)
Noce (*Juglans regia*)
Tiglio (*Tilia europea*)

Pollini piante erbacee

Graminacee
Erba vetriola (*Parietaria judaica*)
Assenzio selvatico (*Artemisia vulgaris*)
Ambrosia (*Ambrosia elatior*)
Lanciuola (*Plantago lanceolata*)
Farinaccio (*Chenopodium album*)

Acari, epiteli, insetti:

Dermatophagoides farinae
Dermatophagoides pteronissinus
Cane (peli e forfore)
Gatto (peli e forfore)
Cavallo (peli e forfore)
Blatta

Micofiti

Alternaria tenuis
Aspergillus fumigatus
Candida albicans
Cladosporium herbarium
Penicillium notatum
Trichophyton mentagrophytes

Vari

Latex

Allegato B

Schema dei protocolli di sensibilizzazione locale applicati per gli allergeni nCup a 1 e rPar j 1

Protocollo n. 1

- 1 µg proteine di estratto allergenico/topo/giorno dal giorno I al IV giorno e dal giorno VII al X giorno;
- salasso al giorno XI;
- 5 topi Balb/c per gruppo sperimentale.

Protocollo n. 2

- 5 µg proteine di estratto allergenico/topo al giorno I, VII e XIV;
- 1 µg proteine di estratto allergenico/topo dal giorno XXII al giorno XXVIII;
- salasso al giorno XXIX;
- 5 topi Balb/c per gruppo sperimentale.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.*

*Stampato da Ditta Grafiche Chicca & C. snc
Via di Villa Braschi 143, 00019 Tivoli (Roma)*

Roma, giugno 2003 (n. 2) 5° Suppl.