



# Rapporti ISTISAN

10/22



**Biomonitoraggio della popolazione italiana  
per l'esposizione ai metalli:  
valori di riferimento 1990-2009**



ISSN 1123-3117

A. Alimonti, B. Bocca,  
D. Mattei, A. Pino

[www.iss.it](http://www.iss.it)



**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**Biomonitoraggio della popolazione italiana per  
l'esposizione ai metalli: valori di riferimento 1990-2009**

Alessandro Alimonti, Beatrice Bocca, Daniela Mattei, Anna Pino

*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria*

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN**

**10/22**

Istituto Superiore di Sanità

**Biomonitoraggio della popolazione italiana per l'esposizione ai metalli: valori di riferimento 1990-2009.**

Alessandro Alimonti, Beatrice Bocca, Daniela Mattei, Anna Pino  
2010, iii, 58 p. Rapporti ISTISAN 10/22

Si descrivono il ruolo del biomonitoraggio (BM) umano nella valutazione degli effetti della qualità ambientale sulla salute, i criteri e le metodologie per la produzione, l'armonizzazione e l'interpretazione dei relativi risultati (selezione della popolazione, campionamento, pretrattamento e analisi). Il rapporto descrive anche le attività di BM umano dei metalli svolte negli USA e nei Paesi europei. Per l'Italia, si riportano i dati ad oggi disponibili che non consentono di tracciare un quadro rappresentativo dell'esposizione della popolazione generale ai metalli. Questa situazione ha giustificato l'avvio di un programma di monitoraggio su scala nazionale intrapreso con il progetto PROBE (*PROgram for the Biomonitoring of the Exposure of the population*).

*Parole chiave:* Metalli, Biomonitoraggio umano, Valori di riferimento

Istituto Superiore di Sanità

**Biomonitoring of the Italian population to metals: reference values 1990-2009.**

Alessandro Alimonti, Beatrice Bocca, Daniela Mattei, Anna Pino  
2010, iii, 58 p. Rapporti ISTISAN 10/22 (in Italian)

The report describes the role of human biomonitoring (BM) in assessing the effects of environmental quality on health, criteria and methodologies for the production, harmonization and interpretation of data (selection of the population, sampling, pre-treatment and analysis). The report also shows the activities of human BM for metals undertaken in the USA and European countries. For Italy, the data available to date do not allow to have the representative picture of the general population exposure to metals. This fact drove to undertake a national monitoring campaign in the framework of the PROBE project (*PROgram for the Biomonitoring of the Exposure of the population*).

*Key words:* Metals, Human biomonitoring, Reference values

Si ringrazia il Centro Nazionale per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie (CCM) del Ministero della Salute per il supporto al progetto di sorveglianza dell'esposizione ai metalli della popolazione italiana (PROBE, 8M/29, 2008-2010) di cui questo rapporto è parte delle attività.

Per informazioni su questo documento scrivere a: [alessandro.alimonti@iss.it](mailto:alessandro.alimonti@iss.it).

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it).

Citare questo documento come segue:

Alimonti A, Bocca B, Mattei D, Pino A. *Biomonitoraggio della popolazione italiana per l'esposizione ai metalli: valori di riferimento 1990-2009*. (Rapporti ISTISAN 10/22).

---

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, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*  
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2010

# INDICE

<b>Premessa</b> .....	iii
<b>1. Biomonitoraggio (BM) come strumento di prevenzione</b> .....	1
<b>2. Esperienze di BM</b> .....	3
2.1. Stati Uniti .....	3
2.2. Europa .....	4
<b>3. Obiettivi di un BM</b> .....	8
<b>4. Metodologie di un BM</b> .....	9
4.1. Selezione del campione di popolazione .....	9
4.2. Selezione della matrice biologica .....	10
4.3. Selezione del biomarcatore .....	12
4.4. Metodologie analitiche .....	16
4.5. Interpretazione del dato .....	17
4.6. Implicazioni etiche e sociali .....	20
<b>5. I valori di riferimento (VR)</b> .....	22
5.1. Finalità e trasferibilità .....	22
5.2. Criteri di qualità .....	24
5.3. La popolazione di riferimento .....	26
5.4. Trattamento del campione .....	28
5.5. Analisi: validazione e incertezza del metodo .....	29
5.6. Trattamento dei dati .....	31
<b>6. Situazione italiana: VR dal 1990 al 2009</b> .....	32
<b>7. Il progetto PROBE: obiettivi e azioni</b> .....	48
<b>8. Conclusioni e ricerca futura</b> .....	50
<b>Bibliografia</b> .....	51



## PREMESSA

L'esposizione della popolazione generale agli agenti xenobiotici attraverso l'ambiente, gli alimenti e i beni di consumo rappresenta una delle maggiori preoccupazioni per le istituzioni sanitarie. L'insufficienza di chiare informazioni sulla entità dell'esposizione e l'effettiva difficoltà di estrapolare all'uomo i dati di contaminazione ambientale/alimentare rendono meno rigorosa la caratterizzazione del rischio tossicologico e poco incisive le azioni normative di prevenzione. La definizione del rischio connessa alla presenza di inquinanti diventa maggiormente puntuale attraverso la misura di biomarcatori direttamente nella popolazione target, attraverso procedure di sorveglianza atte a valutare la dose interna all'organismo delle sostanze di interesse tossicologico presenti nell'ambiente. Anziché limitarsi a valutare la quota di contaminante misurata nell'ambiente che potrebbe penetrare nell'organismo, si dosa direttamente il contaminante (o i suoi metaboliti) nell'organismo stesso: si passa da una valutazione dell'esposizione ad una sua misura diretta. In questo modo si tiene conto di variabili che altrimenti sarebbe difficile prendere in considerazione, quali le varie vie di esposizione, le suscettibilità individuali, il differente potenziale di bioaccumulo dei composti chimici, la loro diversa persistenza, ecc. Per queste sue peculiarità alla sorveglianza attraverso il biomonitoraggio viene riconosciuta sempre maggior importanza ed efficienza nella definizione dell'esposizione per la valutazione del rischio per la salute. Questo rapporto descrive le varie attività di biomonitoraggio dei metalli svolte tra il 1990 e il 2009 su gruppi di popolazione italiana. Mentre negli altri Paesi europei e negli Stati Uniti da decenni vengono condotte intense e sistematiche attività di biomonitoraggio, in Italia, invece, i dati ad oggi reperibili non consentono di tracciare un quadro rappresentativo dell'esposizione ai metalli. Al fine di superare il carattere locale e la frequente scarsa affidabilità dei dati delle campagne realizzate in passato, si riportano le corrette procedure per la produzione, l'armonizzazione e l'interpretazione dei dati. Si descrivono, infine, gli obiettivi che vogliono essere raggiunti con un monitoraggio su scala nazionale avviato con il progetto PROBE (*PROgram for the Biomonitoring of the Exposure of the population*), promosso dal Ministero della Salute.

Loredana Musmeci, Alessandro Alimonti  
*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria*



# 1. BIOMONITORAGGIO (BM) COME STRUMENTO DI PREVENZIONE

L'ambiente di vita determina in modo sostanziale lo stato di benessere o di malattia di un individuo. Acqua, dieta, aria e suolo rappresentano le vie attraverso le quali l'individuo è esposto a sostanze inquinanti che possono avere effetti sulla salute. Tali effetti si verificano quando l'inquinante raggiunge organi o tessuti bersaglio, anche in base a dose e durata dell'esposizione. L'impatto sulla salute è correlato strettamente alle caratteristiche dell'inquinante ma intervengono anche fattori ascrivibili alle condizioni generali di salute, allo stile di vita e alla suscettibilità (genetica o acquisita) dell'individuo. Pertanto, la valutazione del rischio sanitario determinato da fonti di inquinamento ambientale risulta particolarmente complessa e si basa sullo studio di dati ambientali e epidemiologici, e tiene conto di appropriati indicatori sanitari, demografici, culturali o sociali della popolazione o dell'individuo oggetto di studio. In tempi recenti le preoccupazioni per l'ambiente e quelle per la salute sono andate convergendo nel tentativo di trovare strategie di prevenzione per controllare e minimizzare alcuni dei problemi sanitari provocati da specifici determinanti ambientali. La prevenzione dei rischi di origine ambientale richiede un impegno operativo complesso per emanare norme e misure che consentano di aumentare la sicurezza della popolazione esposta, per promuovere comportamenti individuali e collettivi virtuosi e favorevoli alla salute e, più in generale, per accrescere la cultura della promozione della salute. Con il termine di prevenzione si intende un insieme di "atti finalizzati ad eradicare o a eliminare le malattie e le disabilità o a minimizzare il loro impatto" (1) e viene generalmente articolato in vari livelli di intervento. Un primo livello consiste nell'identificazione, analisi e rimozione delle possibili sorgenti di esposizione al fine di eliminare o ridurre l'esposizione dell'organismo limitando, di conseguenza, all'origine lo sviluppo di patologie collegate ad uno specifico rischio ambientale. In questo caso si opera sull'ambiente e/o sull'individuo attraverso l'allontanamento delle cause di insorgenza di patologie o stati di disagio dall'organismo bersaglio e attraverso il potenziamento di fattori utili alla salute (prevenzione primaria). Un secondo livello si propone di identificare precocemente una patologia e di rallentarla e/o contenerla con tempestivi interventi di carattere terapeutico o normativo, usualmente da parte delle autorità sanitarie (prevenzione secondaria). L'accertamento di stati di disagio sanitario si può ottenere attraverso l'attuazione di programmi di screening mirati e indirizzati a singoli individui o gruppi di popolazione. Un ulteriore strumento di prevenzione si serve di studi di follow-up, intervenendo su patologie conclamate con lo scopo di ridurre l'impatto negativo e le complicanze e/o recidive, e, puntando, in ultima analisi, ad una riduzione del suo incremento stimato. Nell'ambito dei programmi di screening particolare importanza rivestono i cosiddetti programmi di biomonitoraggio (BM) per raccogliere indicazioni puntuali sull'effettivo grado di esposizione a sostanze di interesse tossicologico di gruppi di popolazione opportunamente scelti o di singoli individui. Il BM è "un'attività sistematica condotta *in continuum* o ad intervalli regolari basata sulla raccolta di campioni biologici su cui determinare quantitativamente i livelli degli inquinanti o dei loro metaboliti, o gli effetti biologici provocati da tali inquinanti, al fine di valutare l'esposizione e i rischi per la salute dei soggetti esposti" (2-4). In altre parole, anziché limitarsi a valutare la parte di inquinante misurata nell'ambiente che potrebbe penetrare nell'organismo umano, si dosa direttamente l'inquinante o i suoi metaboliti nell'organismo stesso; si passa da una stima dell'esposizione attraverso la misura ambientale dell'inquinante, tipica di campagne di monitoraggio ambientale (MA) ad una misura della dose interna dell'inquinante stesso. Tale misura è indipendente dalla sorgente dell'inquinante (aria, acqua, polveri, suolo, alimenti, beni

di consumo), dalle vie di esposizione e dai fattori sinergici o antagonisti tra i diversi inquinanti. Con il BM si può valutare sia l'esposizione presente all'inquinante che quella passata e seguire nel tempo l'evoluzione dell'entità dell'esposizione (5, 6). Inoltre, di grande valore è la capacità del BM di identificare gruppi di popolazioni a maggior rischio; può essere, ad esempio, il caso rappresentato dai bambini la cui capacità di assunzione di alcuni inquinanti o di trasformazione di composti parentali in metaboliti tossici è maggiore rispetto agli adulti (7, 8). In questo senso il BM offre anche la possibilità di osservare *in vivo* il metabolismo umano, consentendo una più chiara e approfondita comprensione dei meccanismi di tossicità tipici di alcuni inquinanti. I dati di BM integrano quelli del MA e della sorveglianza sanitaria in una valutazione più completa dello stato di salute del cittadino esposto ad inquinanti. In ultima analisi il dato di BM, rispetto a quello di MA, riduce l'incertezza nella definizione dell'esposizione perché tiene conto di tutte le vie di esposizione (dieta, aria, acqua e suolo), di tutte le vie di assorbimento (respiratoria, orale e cutanea) e di tutti i fattori di variabilità individuali (susceptibilità, metabolismo, stili di vita, ecc.).

## 2. ESPERIENZE DI BM

### 2.1. Stati Uniti

Per diversi anni il BM è stato un'imprescindibile prerogativa della medicina del lavoro, condizione dettata soprattutto dalla disponibilità di tecniche analitiche in grado di rilevare solo elevate quantità di contaminanti, tipiche di esposizioni a carattere professionale. Le prime esperienze risalgono agli anni '30 ed erano rivolte al monitoraggio di piombo (9), benzene e alcuni suoi metaboliti (10) nel sangue e nelle urine di soggetti professionalmente esposti. A partire dagli anni '60 l'avvento di tecniche analitiche più sensibili e accurate ha permesso di misurare concentrazioni relativamente basse di sostanze chimiche nei fluidi biologici consentendo quindi di estendere il campo di applicazione anche alle esposizioni di tipo generale (ambientale e alimentare). Nel tempo si è andata progressivamente confermando l'efficacia del BM quale strumento essenziale di prevenzione sanitaria per la valutazione degli effetti legati a esposizioni di differente natura e entità. Gli Stati Uniti si caratterizzano per avere gradualmente trasformato le prime esperienze sporadiche di BM, iniziate più di 50 anni fa, in programmi a carattere sistematico. Il primo programma di BM (*National Human Monitoring Program*, NHMP) promosso dall'*Environmental Protection Agency* (EPA) risale al 1967; negli stessi anni è nato lo studio NHATS (*National Human Adipose Tissue Survey*) con lo scopo di monitorare i pesticidi nel tessuto adiposo umano. Da questa data in poi, il NHATS ha raccolto circa 12.000 campioni di tessuti umani e fornito dati sul grado di esposizione della popolazione degli Stati Uniti ad oltre 130 pesticidi (11). Ma le campagne di BM statunitensi più consistenti, in termini di rappresentatività del campione considerato e di numerosità degli inquinanti studiati, sono le campagne NHANES (*National Health And Nutrition Examination Surveys*), svolte già dagli anni '70 dai *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) e progettate per valutare l'esposizione a sostanze chimiche di interesse tossicologico nella popolazione generale americana non professionalmente esposta. La prima campagna, NHANES I (1971-1975), non era ancora volta alla misura degli inquinanti chimici, mentre successivamente nella campagna NHANES II (1976-1980) e nella campagna Hispanic HANES (1982-1984) furono misurati piombo e pesticidi organoclorurati. Nella terza campagna, NHANES III (1988-1994), furono presentati i dati per piombo, cadmio e selenio, e dal 1999 al 2000, sono stati pubblicati i valori per 116 sostanze chimiche. Nel 2003-2004 il numero di sostanze monitorate è salito ad un totale di 250 (12, 13). I risultati di tali campagne sono pubblicati in una serie di rapporti (*Report on Human Exposure to Environmental Chemicals*) che forniscono una puntuale valutazione della dose interna degli inquinanti indagati e dell'andamento nel tempo di tali inquinanti sia per l'intera popolazione americana che per popolazioni sensibili come bambini, anziani e etnie differenti della popolazione stessa (<http://www.cdc.gov/nchs/nhanes.htm>). Il primo rapporto del 2001 riassume i dati per 27 sostanze chimiche, il secondo del 2003 fornisce dati su 116 sostanze chimiche comprese le 27 del primo rapporto, il terzo rapporto pubblicato nel luglio del 2005, comprende 148 composti chimici tra cui alcune sostanze di nuovo interesse (es. metaboliti degli ftalati, benzo[a]pirene e alcuni pesticidi, erbicidi, diossine, furani e policlorobifenili non analizzati nella seconda campagna) (14). Il quarto rapporto del 2009 comprende 212 analiti tra cui 75 sostanze mai misurate prima quali acrilammide, arsenico (anche le sue forme chimiche), fenoli e perclorati (15). È importante sottolineare che nel corso degli anni, altri studi di BM sono stati condotti dall'EPA in collaborazione con altre istituzioni, alcuni dei quali completamente dedicati a specifiche etnie americane. Nel 1993 è nato lo studio NHEXAS (*National Human EXposure Assessment Survey*) (16) con l'obiettivo di valutare la

concentrazione di 46 sostanze (metalli, pesticidi, composti organici volatili e altri composti tossici) nel sangue e nelle urine di circa 500 individui appartenenti a differenti stati americani (Arizona, Maryland, Illinois, Indiana, Michigan, Minnesota, Ohio e Wisconsin). Dal 1998 il NIEHS (*National Institute of Environmental Health Sciences*) supporta programmi di BM per studiare la relazione tra esposizione ambientale a sostanze chimiche e sviluppo di malattie respiratorie, disturbi dell'infanzia e dello sviluppo in lattanti e bambini (17). Più recentemente, nel 2006, è stata avviata in Canada un campagna di BM nazionale (*Canadian Health Measures Survey*) su 5.000 soggetti al fine di raccogliere dati sulla concentrazione biologica di metalli quali piombo e mercurio e sulla stato di salute della popolazione canadese (18).

## 2.2. Europa

I vantaggi offerti dal BM sono stati riconosciuti anche in Europa. Con la *European Environment and Health Strategy* – adottata nel 2003 (19) – la Commissione Europea pone la “salute” al centro della sua politica ambientale in una visione che affronta in modo integrato i problemi ambientali e di sanità pubblica. L'Action 3, un programma di azione comunitario all'interno dell'*Environment and Health Action Plan 2004-2010* (20) ha ribadito l'importanza di implementare gli studi di BM negli Stati Membri al fine anche di armonizzarne le procedure. In un studio in collaborazione tra la *European Environment Agency* (EEA) e la *European Science Foundation* viene raccomandato esplicitamente l'impiego di definizioni integrate dell'esposizione che combinino stime del rischio per l'uomo e per l'ambiente. Nel 2003, è stata promossa un'iniziativa europea per migliorare l'ambiente e la salute dei bambini, chiamata SCALE, acronimo di *Scientific evidence, focused on Children, meant to raise Awareness, improve the situation by use of Legal instruments and ensure a continual Evaluation of the progress made* (20). È stato inoltre, lanciato il progetto ESBIO (*Expert team to Support BIOMonitoring in Europe*) con l'obiettivo di sviluppare approcci armonizzati per il BM, metodi per l'integrazione tra i dati di BM e di MA e strategie per la comunicazione del rischio (<http://www.eu-humanbiomonitoring.org/sub/esbio.htm>). Nell'ambito del VII Programma Quadro 2007-2013, è nato nel 2009 il progetto COPHES II (*Consortium to Perform Human biomonitoring on an European Scale*) che coinvolge 24 Stati Membri e il cui obiettivo principale è, ancora una volta, quello di armonizzare le procedure di BM (dall'analisi all'interpretazione e comunicazione dei risultati) al fine di migliorare la comparabilità dei dati tra i Paesi Membri. La ricerca comprende anche le attività di sviluppo, validazione e uso di nuovi biomarcatori inclusi quelli non invasivi e di effetto. Nel 2004, come parte del progetto europeo WWF (*World Wildlife Fund*) sono stati raccolti numerosi campioni di sangue al fine di rilevare la presenza di contaminanti nel corpo umano (21). Nel 2005, il centro ECETOC (*European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals*) ha pubblicato la “Guida alla interpretazione dei dati di biomonitoraggio” (22) che fornisce elementi per il corretto utilizzo e l'interpretazione dei dati di BM. D'altra parte sull'utilità della tecnica di BM umano concordano ormai anche le industrie chimiche; la ICCA (*International Council of Chemical Associations*) e il CEFIC (*Conseil Européen de l'Industrie Chimique*) promuovono anche finanziariamente l'uso del BM come strumento di valutazione del rischio per la salute. A livello comunitario l'esperienza più avanzata in ambito di BM è probabilmente quella della Germania, dove le campagne di BM GerES (*German Environmental Surveys*) vengono condotte dal 1985 e sono finalizzate a definire l'esposizione della popolazione generale e/o di gruppi suscettibili a diversi tipi di inquinanti (<http://www.umweltbundesamt.de/gesundheit-e/survey/index.htm>). Dal 1996 in Germania è insediata la commissione *Kommission Human-Biomonitoring des Umweltbundesamtes*, composta da esperti internazionali, nata per approfondire le conoscenze in ambito di BM e stabilire procedure standardizzate per integrare i dati di BM con i protocolli internazionalmente riconosciuti di valutazione del rischio (23, 24). Le campagne GerES svolte finora sono state quattro. La prima

campagna (GerES I) (1985-1986), focalizzata sui metalli pesanti, ha visto il reclutamento di circa 3.000 individui adulti; la seconda (GerES II) dal 1990 al 1992 ha incluso più di 6.000 soggetti, compresi i bambini, e ha previsto l'analisi di metalli e pentaclorofenolo; la terza (GerES III) (1997-1999; 5.000 soggetti) ha ampliato il campo di analisi ad inquinanti organici quali idrocarburi policiclici aromatici, policlorobifenili e altri composti organoclorurati (5, 7, 24); la quarta (GerES IV) conclusa nel 2006 è stata dedicata interamente ai bambini (1.800 bambini di età compresa tra 3 e 14 anni) (5, 7, 24). In concomitanza con il BM durante le campagne è stato svolto anche un MA al fine di individuare diverse sorgenti di esposizione come predittori del carico corporeo di inquinanti ambientali. Sulla base delle campagne realizzate, la commissione ha stabilito i valori di riferimento (VR) e i valori limite di BM umano (HBM I e II) per diverse sostanze chimiche (<http://www.umweltbundesamt.de/gesundheit/monitor/>). I VR rappresentano l'esposizione di base della popolazione generale e possono essere espressi come il 95° percentile del livello del contaminante nei campioni biologici di un gruppo rappresentativo della popolazione generale (si rimanda al Capitolo 5 per la teoria dei VR e alla Tabella 7 per i dati di VR). Gli HBM I corrispondono alla concentrazione di inquinante nel campione biologico al di sotto della quale non vi è rischio di effetti avversi per la popolazione, mentre gli HBM II rappresentano i livelli caratterizzati da un rischio di effetti avversi (25). A concentrazioni più alte degli HBM I e più basse degli HBM II si è in presenza di un livello di allerta e il dato deve essere confermato tramite ulteriori misurazioni. Un valore di concentrazione al di sopra degli HBM II è considerato come livello di azione o di intervento. Si tratta in entrambi i casi di valori limite difficilmente desumibili tanto che, finora, in Germania tali valori (riportati in Tabella 1) sono stati fissati solo per un numero limitato di metalli.

**Tabella 1. Valori limite HBM I e HBM II in fluidi biologici**

Metallo	Matrice	Popolazione	HBM I	HBM II
Cadmio	Urine	Bambini, adolescenti e adulti ≤ 25 anni	1 µg/g creatinina	3 µg/g creatinina
		Adulti ≥ 25 anni	2 µg/g creatinina	5 µg/g creatinina
Mercurio	Urine	Bambini e adulti	5 µg/g creatinina	20 µg/g creatinina
	Sangue	Bambini e adulti	5 µg/L	15 µg/L
Piombo	Sangue	Adulti	100-150 µg/L	150-250 µg/L

Nella Regione delle Fiandre, all'interno del progetto pilota FLEHS (*FLemish Environment and Health Study*) (1999) e di successive campagne di BM (2001-2006), è stata campionata la popolazione della Regione al fine di determinare sia gli inquinanti tradizionali che quelli emergenti (26). Questa campagna di BM utilizzava diversi marcatori di esposizione (quali cadmio e piombo nel sangue) e di effetto (inclusi danni al DNA, asma e allergie) per lo studio dell'esposizione della popolazione appartenente a tre fasce di età - neonati (n. 1.200), adolescenti (14-15 anni, n. 1.600) e adulti (50-65 anni, n. 1.600) e residente in 8 aree regionali (2 centri urbani, una zona agricola caratterizzata da frutteti, un'area rurale e 4 zone industriali). I risultati hanno evidenziato l'esistenza di differenze significative nei livelli dei biomarcatori in funzione delle aree studiate e hanno individuato effetti biologici misurabili a livelli di esposizione ben al di sotto degli standard correnti. In Belgio, l'obiettivo del progetto PLUTOCRACY (*PLacental Uptake and Transfer Of environmental Chemicals Relating to Allergy in Childhood Years*) è quello di collegare la cinetica di trasferimento placentare degli xenobiotici con le associazioni epidemiologiche delle malattie allergiche in 1.000 coppie madre-neonato e, attraverso uno studio longitudinale, in 500 bambini di 18 mesi di età. Tra i metalli sono stati misurati il cadmio e il piombo nel tessuto placentare, nel latte materno e nel sangue periferico e ombelicale, mentre come biomarcatori di effetto sono stati misurati lo stato

ossidativo e le citochine nel sangue periferico e ombelicale (<http://www.eu-biomonitoring.org/>). Nei Paesi Bassi lo studio *Association between chemical features of fine particulate air pollution and respiratory health of schoolchildren* è stato progettato per indagare se l'esposizione a metalli e a particolato atmosferico fosse associata ad infiammazione delle vie aeree e riduzione della funzionalità polmonare in età scolare (<http://www.eu-biomonitoring.org/>). In Lussemburgo, il progetto LNS/ALMEN/CST/AKUT: *Impact of heavy metals and moulds on environmentally burdened patients* si avvale dell'utilizzo di biomarcatori di esposizione (livelli di metalli nel siero e nei capelli) e di effetto (produzione di citochine e attivazione di linfociti) per il BM di adulti e bambini tra i 12 e i 16 anni (<http://www.eu-biomonitoring.org/>). L'EHMS (*Environmental Health Monitoring System*) nella Repubblica Ceca ha avviato programmi di BM già dal 1994 al fine di valutare l'esposizione della popolazione generale ad un ampio spettro di contaminanti ambientali, tra cui metalli tossici e essenziali quali cadmio, mercurio, piombo, rame, selenio e zinco, analizzati nel latte materno e nel sangue e nelle urine di bambini (dagli 8 ai 10 anni) e adulti. L'obiettivo delle campagne è quello di: 1) documentare l'entità, la distribuzione e i determinanti dell'esposizione a inquinanti ambientali per mezzo di biomarcatori di esposizione e/o di effetto; 2) stabilire i VR per la popolazione ceca; 3) generare informazioni per le strategie di prevenzione e limitazione dell'esposizione (27). In Francia sono nati nel corso degli anni diversi progetti di BM: il progetto EDEN (*Emerging Diseases in a changing European environment*) con l'obiettivo di analizzare una coorte di 20.000 bambini al fine di caratterizzare il rapporto tra esposizione ambientale, contesto socio-economico e allergie/malattie respiratorie dell'infanzia anche attraverso la misura di alcuni metalli in sangue, placenta e capelli (<http://www.eden-fp6project.net/>); lo studio PÉLAGIE (*Perturbateurs Endocriniens: Etude Longitudinale sur les Anomalies de la Grossesse, l'Infertilité et l'Enfance*) per valutare le conseguenze dell'esposizione ambientale, alimentare e occupazionale a composti chimici (tra cui il mercurio derivante dall'ingestione di pesce) sulla crescita intrauterina e sullo sviluppo psicomotorio del bambino attraverso un'indagine longitudinale su 5.000 donne in gravidanza; il progetto ISAAC-II (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*) che coinvolge oltre la Francia più di 100 paesi e 2 milioni di bambini e il cui scopo è quello di valutare le origini e le cause di asma, rinite ed eczema nei bambini al fine di costituire la base per futuri interventi atti a ridurre il carico di tali malattie (<http://isaac.auckland.ac.nz/>) e il progetto EPIC (*European Prospective Investigation into Cancer and nutrition*), al quale partecipano anche altri 9 Paesi Europei (Danimarca, Germania, Grecia, Italia, Norvegia, Olanda, Regno Unito, Spagna e Svezia), per studiare la relazione tra dieta, stili di vita, fattori ambientali e sviluppo di malattie croniche e incidenza di cancro avvalendosi del reclutamento di 520.000 persone (<http://epic.iarc.fr>). In Polonia vengono condotte indagini specifiche soprattutto per quanto riguarda l'esposizione di adulti e bambini al piombo comprendenti l'identificazione dei danni al DNA provocati dall'esposizione a tale contaminante, lo studio dei polimorfismi genetici per la comprensione dei meccanismi alla base della diversa suscettibilità individuale, e lo studio della biotrasformazione e dei meccanismi di riparazione del DNA (<http://www.eu-biomonitoring.org/>). Inoltre, ormai da qualche anno, vengono condotti studi sistemici (per esempio il progetto *Evaluation of the health risk resulting from environmental exposure to lead and cadmium in selected regions in Poland*) sul contenuto di cadmio e piombo nel sangue della popolazione generale (adulti e bambini) di varie regioni della Polonia (28). In Portogallo, sono state condotte campagne di BM (ProVEpA, *Programa de Vigilância Epidemiológica Ambiental*) per valutare l'esposizione umana alle emissioni degli inceneritori. In particolare, sono stati rilevati nei fluidi di differenti gruppi di popolazione (coppie madri-neonati, bambini al di sotto dei 6 anni, adulti 18-65 anni) numerosi contaminanti quali metalli, policlorobifenili e diossine approfondendone il potenziale effetto sulla salute della popolazione con riferimento a particolari patologie (29). In Croazia, lo studio *Exposure, intake and effects of toxic and*

*essential elements* valuta l'uso della placenta come tessuto indicatore per indagini sull'ambiente materno-fetale e prevede sia il BM di metalli tossici e essenziali (alluminio, cadmio, calcio, mercurio, ferro, selenio, zinco) che la valutazione dell'assunzione di tali metalli con la dieta (<http://www.imi.hr/projekt.php?tip=77&lang=en>). Nel Regno Unito, il progetto ALSPAC (*Avon Longitudinal Study of Parents And Children*) si basa sulla raccolta di dati personali, socio-economici, clinici, ambientali e di dieta, e sull'analisi di campioni biologici di 14.000 donne in gravidanza (<http://www.bristol.ac.uk/alspac/>). L'EPA Svedese ha avviato progetti (*Swedish Environmental Protection Agency: National Health Related Environmental Monitoring Program*) focalizzati sulla valutazione dell'esposizione umana a metalli e inquinanti organici tramite aria e alimenti, attraverso l'analisi dei metalli stessi in campioni umani tra cui il latte materno (<http://www.swedishepa.se/en/In-English/Menu/State-of-the-environment/Environmental-monitoring/Reports-on-environmental-monitoring/>). In Danimarca il programma *ChildrenGenoNetwork* (altre nazioni partecipanti al progetto: Repubblica Ceca, Polonia, Italia, Paesi Bassi, Norvegia, Finlandia, UK e Belgio) si occupa dello studio delle interazioni gene-ambiente durante i periodi fetale, neonatale e infantile, valutando il danno genetico e la suscettibilità in relazione all'esposizione a sostanze nocive quali metalli (cadmio e piombo) e idrocarburi policiclici aromatici tramite analisi di campioni di sangue e placenta ([http://cgn.pubhealth.ku.dk/childrengen\\_en/](http://cgn.pubhealth.ku.dk/childrengen_en/)).

### 3. OBIETTIVI DI UN BM

Un programma di BM può comprendere molteplici attività con i seguenti obiettivi:

- definire i livelli basali di esposizione (valori di riferimento) della popolazione generale a determinate sostanze;
- determinare l'esposizione di gruppi a rischio, gruppi particolarmente esposti o particolarmente sensibili: bambini e anziani, persone residenti in zone urbane o rurali, nei pressi di siti industriali, soggetti esposti professionalmente, ecc. È possibile identificare gli individui che presentano valori nettamente al di sopra dell'esposizione di base per determinate sostanze realizzando una valutazione individuale dei rischi e formulando raccomandazioni individuali per ridurli;
- evidenziare tendenze temporali: un aumento può essere interpretato come un segnale di allerta precoce e portare a misure di prevenzione, in particolare rivolte alla riduzione dell'esposizione. Si possono individuare anche nuove esposizioni;
- individuare differenze geografiche: l'esposizione può essere particolarmente elevata in certe aree geografiche a livello locale, nazionale e internazionale. Questi dati potrebbero contribuire ad appurare le fonti e le vie di esposizione;
- verificare l'efficacia delle misure normative e legislative adottate: il BM può essere uno strumento di verifica delle azioni volte a ridurre l'esposizione, di limitazioni o divieti di prodotti chimici, di formazione professionale per l'uso e di raccomandazioni ai consumatori;
- valutare la presenza di oligoelementi e sostanze essenziali evidenziando anche i possibili benefici;
- evidenziare priorità per la ricerca sugli effetti tossici delle sostanze: la quantificazione dell'esposizione a tali sostanze può essere utile per interpretare i dati e le tendenze relativi alla salute in base al registro della salute (collegamento tra BM e monitoraggio della salute).

## 4. METODOLOGIE DI UN BM

Un sistema efficiente di BM prende in considerazione i più importanti temi di salute pubblica correlabili alle diverse pressioni ambientali, rimanendo flessibile e adattabile a nuove informazioni che possono emergere nel corso delle attività (es. nuovi marcatori più specifici e sensibili, nuove emergenze per la salute, tecniche meno invasive, ecc.). L'integrazione a livello Europeo delle iniziative locali, regionali e nazionali richiede l'adozione di procedure armonizzate, l'uso di biomarcatori adeguati, di strumentazioni appropriate per l'analisi e protocolli di campionamento affidabili. Di primaria importanza è il controllo della variabilità biologica per produrre dati coerenti e migliorare la comparabilità dei risultati tra i vari studi/programmi e Paesi. Pertanto, per realizzare indagini di BM attendibili, trasferibili tra laboratori e utilizzabili anche nei processi decisionali è indispensabile: 1) reclutare correttamente il campione di popolazione; 2) scegliere la matrice biologica più idonea sulla quale eseguire la misurazione; 3) individuare i più appropriati biomarcatori che riflettano la dose interna, o gli effetti, o la suscettibilità; 4) impiegare metodi analitici sensibili, affidabili e validati, inseriti in un sistema di qualità; 5) elaborare statisticamente e esprimere i risultati in maniera chiara, univoca e trasferibile; 6) riconoscere e rispettare le implicazioni etiche e sociali nell'organizzazione e realizzazione di una campagna di BM; 7) comunicare i risultati in modo chiaro e adeguato.

### 4.1. Selezione del campione di popolazione

L'individuazione del campione di popolazione è realizzata attraverso l'adozione di rigorosi criteri di selezione in base a tipo di esposizione ipotizzato, fascia di età, sesso, area geografica, stato generale di salute, uso di medicinali, assunzione di alcool, caffè e tabacco, abitudini alimentari, attività sportive, ecc., al fine di: 1) tenere sotto controllo eventuali fattori confondenti l'esposizione al composto chimico in esame; 2) permettere la stratificazione dei dati per riscontrare differenze nella suscettibilità in sottogruppi della popolazione (30). Una possibile strategia di reclutamento può basarsi sull'analisi dei dati di censimento, ma una più attiva e consapevole partecipazione è, in genere, ottenuta attraverso la richiesta di collaborazione con strutture sanitarie. Il numero dei partecipanti necessari in uno studio di BM dipende dall'ipotesi, la metodologia e lo scopo della campagna di BM, ma deve essere sufficientemente ampio da permettere un adeguato trattamento statistico ( $\geq 120$  soggetti): più è ristretto il gruppo campionato e più è ampia la variabilità del dato dovuta a differenze inter-individuali e metodologiche. Comunque, qualunque scelta venga fatta, la strategia di reclutamento e i criteri di selezione dei soggetti devono essere esplicitamente e dettagliatamente descritti in modo tale che siano possibili confronti con altre situazioni e si possano individuare eventuali distorsioni nello schema dello studio. Maggiori informazioni sulla scelta della popolazione e gli strumenti per la selezione e il reclutamento dei soggetti al fine di garantire l'omogeneità e la rappresentatività del dato finale sono riportate nel paragrafo 5.3.

## 4.2. Selezione della matrice biologica

La matrice su cui effettuare le misure in una campagna di BM sarà un materiale biologico facilmente accessibile, disponibile in quantità sufficiente nelle normali condizioni, il cui campionamento sia meno invasivo possibile e, comunque, non presenti rischi per la salute del donatore (23). Una matrice con tali caratteristiche è ideale per indagini di routine e su larga scala, e per indagini su particolari gruppi di popolazioni (bambini, donne in gravidanza, anziani o persone malate) laddove il campionamento risente maggiormente di limiti etici e pratici. In generale, l'uso di prelievi non-invasivi è altamente raccomandato rappresentando un approccio eticamente opportuno e a costo relativamente basso dato che non richiede personale altamente specializzato (31). Di seguito vengono riportate le caratteristiche e il significato di alcune matrici biologiche utilizzate in studi di BM:

- *Aria espirata*  
ideale per composti volatili; valutazione diretta dell'esposizione recente; criticità nelle fasi di campionamento, trasporto e conservazione del campione.
- *Capelli*  
rilevano esposizioni a medio e lungo termine; facilmente accessibili; inclini a contaminazione esterna (uso di shampoo, balsami, tinte); la regione di prelievo del capello può creare differenze nel risultato.
- *Latte materno*  
idoneo per composti liposolubili; fornisce informazioni sull'esposizione di madre e neonato; facilmente accessibile; richiede la standardizzazione dei risultati per il contenuto grasso.
- *Placenta*  
fornisce informazioni sull'esposizione di madre e neonato; facilmente accessibile; distribuzione non uniforme dell'inquinante.
- *Sangue del cordone*  
fornisce informazioni sull'esposizione di madre e neonato; il prelievo è standardizzato; il volume di campione è limitato.
- *Sangue/Siero*  
rilevano esposizioni a medio e lungo termine; il prelievo è standardizzato; il campionamento è invasivo.
- *Unghie*  
rilevano esposizioni a medio e lungo termine; inclini a contaminazione esterna.
- *Urina*  
rileva esposizioni recenti; ideale per sostanze con breve emivita; il prelievo è standardizzato; è disponibile in elevate quantità; richiede la standardizzazione dei risultati per la creatinina o la densità relativa; spesso rileva i metaboliti del composto parente piuttosto che il composto parente stesso.

L'urina è la matrice più frequentemente usata per valutare il grado di esposizione ambientale o professionale a sostanze inquinanti, in particolare per le sostanze con breve emivita biologica, non persistenti e rapidamente metabolizzate. La raccolta di campioni di urina non comporta alcun disagio associato, non è invasiva e permette di avere congrui volumi di campione (32, 33). Il principale svantaggio consiste nella variabilità del volume giornaliero e della densità delle urine stesse. Perciò, i risultati vanno standardizzati esprimendo il dato in grammi di creatinina o tenendo conto della densità relativa dell'urina (34). L'OMS ha stabilito che i campioni di urina

con una concentrazione di creatinina  $< 0,3$  e  $> 3,0$  mg/L possono essere ritenuti troppo diluiti o troppo concentrati, rispettivamente, e, quindi, non idonei quali matrici di indagine tossicologica (35). Tuttavia, questa indicazione è stata recentemente messa in discussione in quanto la densità urinaria è significativamente influenzata dallo stato fisiologico (donne in gravidanza, bambini, anziani) oltre che da variabili quali sesso ed etnia (33). Una limitazione all'uso delle urine deriva talvolta dal fatto che nelle urine si può ritrovare il metabolita del composto parente piuttosto che il composto parente stesso. Per questo è indispensabile avere informazioni sul metabolismo del contaminante studiato, per evitare il rischio di aspecificità nel caso in cui il metabolita derivi da più di un composto parente. Le misure nel sangue e nel siero riflettono più direttamente le dosi disponibili per gli organi e tessuti bersaglio ma il campionamento prevede una procedura invasiva che ne limita l'utilizzo in studi su larga scala o che coinvolgono particolari categorie di popolazione (es. bambini). Inoltre, molti inquinanti sono presenti nel sangue e siero a bassa concentrazione e questo, insieme alla limitata quantità di materiale biologico disponibile, costringe all'uso di tecniche analitiche estremamente sensibili. I capelli sono stati usati con successo per misurare l'esposizione a una grande varietà di inquinanti organici e inorganici e, in funzione della velocità di crescita mensile (circa un centimetro), riflettono l'esposizione temporale all'inquinante nel corso dei mesi o addirittura anni. Una possibile limitazione all'uso dei capelli è la difficoltà di distinguere origine endogena (deposizione attraverso il sangue) e esogena del contaminante (deposizione da particolato atmosferico e/o da prodotti cosmetici utilizzati). Sebbene alcune procedure di pretrattamento e lavaggio siano state ottimizzate e standardizzate non è stata totalmente eliminata la possibilità di contaminazione esterna da impiego di prodotti per la cura e il trattamento dei capelli (shampoo e tinture) (36). Eccezione è il metilmercurio per il quale la contaminazione esterna del capello non è ipotizzabile e l'esposizione è primariamente dovuta a dieta e amalgami dentali (37, 38). La *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR) americana ha organizzato un *panel* di esperti per discutere l'uso dei capelli nel BM e ha sottolineato la stringente necessità di procedure operative standard (POS) per la raccolta (lunghezza del capello e zona del prelievo), la preparazione (lavaggio e mineralizzazione) e l'analisi, al fine di produrre VR che siano confrontabili internazionalmente (39). Il latte materno è una delle matrici ampiamente riconosciute e utilizzate per il monitoraggio di composti persistenti liposolubili grazie al suo elevato contenuto lipidico e alla sua facile reperibilità e non invasività del prelievo. È estremamente utile in un BM perché fornisce informazioni sull'esposizione al contaminante sia della madre che del bambino. Poiché la composizione lipidica del latte materno non è costante la comparabilità e trasferibilità dei dati è affidata alla normalizzazione dei risultati con la quantità di sostanza grassa presente. Inoltre, quando si usa il latte materno è importante considerare il processo di depurazione, ovvero, la riduzione del composto chimico durante l'allattamento (40). Altre matrici biologiche, come le unghie, la saliva, l'aria espirata, la placenta e il sangue del cordone possono essere utilizzabili per indagini di BM, ma presentano alcuni ostacoli, primi tra tutti l'assenza di POS e la conseguente scarsità di VR affidabili di confronto. Inoltre, ciascuna di esse presenta particolari criticità. Le unghie presentano un'elevata variabilità intra-individuale e risultano inclini a contaminazione esterna (41); sono state comunque utilizzate con successo in alcuni studi di epidemiologia ambientale, come nel caso della valutazione dell'assunzione a lungo termine di metilmercurio attraverso il consumo di pesce (42) o dell'esposizione ai composti inorganici dell'arsenico (43). In letteratura sono presenti indicazioni contrastanti sull'impiego della saliva, alcune delle quali sembrano suggerirne l'idoneità – non confermata però da altri autori (44) – soprattutto per la valutazione dell'esposizione a piombo e ad insetticidi organofosforici (45). La saliva è usata per valutare esposizioni recenti, è una matrice facilmente campionabile, a basso costo, molto utile per screening su un elevato numero di campioni. La presenza di un inquinante nella saliva dipende

dalle sue caratteristiche chimiche: sostanze lipofile e molecole non-ionizzate passano dal sangue alla saliva più facilmente di quelle idrofile e ionizzate (46). Inoltre, la saliva ha un elevato contenuto di acqua e un basso contenuto di proteine (per questo le sostanze legate alle proteine sono difficilmente riscontrabili in tale matrice) (47), oltre ad essere facilmente influenzata da fattori quali il ritmo cardiaco, l'esercizio e l'età del soggetto (48). L'aria espirata rappresenta una matrice indicata per l'analisi di numerose sostanze volatili (49). Il monitoraggio dei metalli in aria espirata è poco documentato, sebbene alcuni studi riportino che il condensato dell'aria espirata può avere grande validità nella valutazione della dose al tessuto bersaglio per metalli con potenziale attività pneumotossica, come cadmio, cobalto, nichel e tungsteno (50, 51). Alcuni svantaggi dell'aria espirata sono: 1) il tempo di permanenza piuttosto breve delle sostanze in fase gassosa; 2) l'elevata probabilità di perdita delle sostanze nelle fasi di campionamento, trasporto e conservazione; 3) la difficoltà di utilizzo per studi su larga scala. L'utilizzo della placenta e/o del sangue del cordone come matrici per il BM di inquinanti (per esempio di cadmio e piombo) offrono il vantaggio di poter studiare allo stesso tempo l'esposizione sia della madre che del neonato (52, 53). Un limite della rappresentatività della placenta è che, trattandosi di un insieme complesso di vasi sanguigni, villi corionici e membrane, il composto chimico potrebbe non essere distribuito nella matrice uniformemente, come riscontrato per i metalli (52). Il sangue del cordone offre il vantaggio che il prelievo può essere condotto seguendo le procedure già standardizzate per la raccolta del sangue periferico, tuttavia il volume dei campioni di sangue del cordone è solitamente limitato. L'utilizzo di altre matrici quali cute, ossa, denti, sudore e feci è riportato solo in alcuni casi. La cute può costituire un substrato di deposizione, una via di assorbimento o una via di eliminazione (54). Le ossa possono essere considerate come un deposito del contaminante o anche una sorgente endogena di contaminante (per esempio nel caso del piombo è ben noto il turnover di tale metallo dalle ossa al sangue) (55). Denti, sudore e feci sono stati usati per l'analisi di metalli ma i dati disponibili sono pochi (56, 57).

### **4.3. Selezione del biomarcatore**

Fattori critici nella scelta del biomarcatore sono la sua aderenza all'obiettivo del BM e il grado di informazione che può fornire nel raggiungerlo. La scelta tiene conto delle priorità tossicologiche e di sanità pubblica identificate a livello locale, nazionale e internazionale, delle caratteristiche di trasferibilità e comparabilità tra Paesi, della rilevanza per intraprendere o supportare iniziative internazionali (linee guida, regolamenti, ecc.) e processi decisionali a vari livelli. Caratteristiche essenziali nell'individuazione del più idoneo biomarcatore sono la sua validità e affidabilità. La validità è intesa come capacità del biomarcatore di riflettere un evento designato in un sistema biologico (es. l'esposizione, l'effetto dell'esposizione, la malattia o la suscettibilità), e si esprime tramite due indici: la sensibilità (capacità di rilevare un segnale ad una data concentrazione e evidenziare differenze per variazioni minori della popolazione in esame) e la specificità (capacità di essere caratteristico di quel particolare evento). L'affidabilità di un biomarcatore coincide con la riproducibilità del dato e dipende, oltre che da proprietà intrinseche del biomarcatore stesso, dalla variabilità biologica della popolazione (intra e inter-individuale), dalla variabilità del metodo analitico e dall'esperienza degli operatori coinvolti. Altro aspetto da tener presente nella scelta di un biomarcatore è la sua praticabilità, in quanto facilmente reperibile, conservabile e analizzabile in tempi e a costi adeguati. Un biomarcatore è scelto anche in base ad alcuni parametri quali la disponibilità di VR o di valori limite per i confronti e di protocolli operativi riconosciuti internazionalmente

per il campionamento, trattamento e analisi. Alcune caratteristiche favorevoli e alcuni limiti di un biomarcatore e le conseguenti considerazioni per la sua scelta sono riportate di seguito.

I vantaggi di un biomarcatore sono:

- associazione ad un'esposizione realmente avvenuta;
- integrazione di tutte le vie di esposizione;
- caratterizzazione dell'esposizione specifica del singolo individuo;
- inclusione di alcune vie di esposizione difficilmente valutabili in altro modo (es. esposizione cutanea);
- migliore interpretazione dei dati sugli effetti sulla salute;
- contributo alla valutazione/gestione del rischio.

Gli svantaggi sono rappresentati da:

- possibile mancanza dei relativi valori limite o normativi di confronto;
- informazioni insufficienti o mancanti sulla cinetica e il tempo di esposizione;
- suscettibilità ai fattori confondenti e alle variazioni biologiche;
- possibile risposta alterata come risultato di esposizioni multiple;
- possibile campionamento invasivo;
- difficoltà di campionamento.

Per poter ottenere una corretta identificazione di un biomarcatore, quindi, occorre:

- definire l'*end-point* di interesse della campagna di BM;
- documentare la relazione tra esposizione, biomarcatore candidato ed *end-point* di interesse, prendendo in esame i dati di letteratura disponibili;
- valutare la sensibilità e la specificità del biomarcatore in relazione all'esposizione e la riproducibilità nel tempo;
- verificare che la matrice prescelta sia rappresentativa del biomarcatore e che il suo campionamento richieda tecniche meno invasive possibili;
- esaminare le procedure analitiche disponibili per la quantificazione del biomarcatore, valutandone i limiti di rivelabilità, la sensibilità, la precisione e l'accuratezza.
- valutare l'esistenza di protocolli analitici riconosciuti che includano controllo e assicurazione di qualità;
- valutare l'esistenza di VR, valori limite o normativi;
- valutare la capacità del biomarcatore di definire la relazione dose-effetto anche in funzione della suscettibilità individuale;
- valutare la capacità del biomarcatore di prevedere il rischio per la salute sia per la popolazione generale che per sottogruppi della popolazione;
- effettuare, in ogni fase del processo, considerazioni etiche e sociali.

Un biomarcatore ideale dovrebbe, quindi, essere specifico, riproducibile e capace di quantificare basse concentrazioni di contaminante (per poter misurare l'esposizione della popolazione generale), dovrebbe prevedere l'utilizzo di tecniche di prelievo non-invasive e saggi non costosi, dovrebbe rappresentare in maniera accurata il grado di esposizione e poter integrare l'esposizione nel tempo. Allo stato attuale, esistono pochi biomarcatori con tutte le caratteristiche sopra citate, anche se negli ultimi anni si sono intensificate le ricerche su biomarcatori più affidabili e di nuova generazione (es. i biomarcatori di esposizioni multiple nel caso di più sostanze che causano comuni effetti tossici). In Tabella 2 sono riportate alcuni biomarcatori (coppia metallo-matrice) idonei per studi di BM dei metalli.

**Tabella 2. Significato di alcuni biomarcatori (coppie metallo-matrice)**

Elemento	Emivita	Matrice	Tipo di Esposizione
Alluminio	8-14 ore	urina	recente
	42 giorni	siero	cronica
Antimonio	95 ore	urina	recente
Arsenico	2-4 giorni	urina	recente
Berillio	1-60 giorni	urina	recente
Cadmio	7 ore	urina	recente
	1-3 mesi	sangue	
Cobalto	24 ore	urina	recente
Cromo	2-3 giorni	urina	recente
	25-35 giorni	sangue	
Mercurio	1-3 mesi	urina	recente-cronica
	1-3 giorni/1-3 mesi	sangue	cronica
Piombo	1-2 mesi	sangue	recente
Platino	< 24 ore	urina	recente
Tallio	alcuni giorni	urina	recente
Uranio	15 giorni	urina	recente

Nella Tabella 2 è riportato anche il tempo di emivita del metallo, caratteristica tra le più importanti da considerare in fase di scelta del biomarcatore. Per un metallo con un tempo di emivita breve il BM rifletterà, ovviamente, solo l'esposizione recente. Con la concentrazione del biomarcatore che decresce rapidamente con il tempo, la conoscenza del tempo che intercorre tra esposizione e campionamento diventa indispensabile, anche se nella pratica è molto difficile riuscire a stabilire esattamente quando è avvenuta l'esposizione. Tutto ciò introduce una considerevole variabilità nella stima della dose. Un biomarcatore con emivita breve può, comunque, rappresentare un affidabile dosimetro interno se l'esposizione è costante nel tempo (es. l'esposizione cronica a cadmio in persone con abitudine al fumo). I metalli con breve emivita vengono comunemente misurati nelle urine. L'utilità di un BM diventa massima quando si è in presenza di metalli con emivita sufficientemente lunga, per i quali è possibile valutare un'esposizione pregressa anche di mesi e anni. Per un biomarcatore con emivita lunga la concentrazione continua lentamente a crescere nel tempo e quindi il tempo totale dell'esposizione e/o l'età del soggetto diventano importanti fattori discriminanti. I metalli con tempi di emivita lunghi sono generalmente misurati nel sangue, dove, dopo un rapido processo iniziale di stabilizzazione, la concentrazione misurata è ben correlabile con il carico corporeo del metallo e tende a mantenere questa correlazione nel tempo. Altri contaminanti (quelli liposolubili) sono facilmente misurabili in matrici con elevato contenuto di grasso quali il tessuto adiposo e il latte materno, altri sono quantificabili nei relativi tessuti e organi di deposito. Il piombo, per esempio, può essere monitorato sia nel sangue che nei suoi siti di deposito (ossa e denti), così come il cadmio viene misurato nel sangue e nel fegato (il suo organo di accumulo). Ne consegue che avere a disposizione una approfondita conoscenza della tossicocinetica e tossicodinamica del metallo in esame, in termini di distribuzione, biotrasformazione, accumulo e escrezione, rende anche possibile la scelta della matrice biologica più idonea su cui eseguire la misura. Bisogna anche considerare che, nella realtà, molti composti chimici esprimono una farmacocinetica bifasica o polifasica (vari compartimenti e vari tempi di emivita): presupporre un solo compartimento e una singola emivita per ciascun biomarcatore può portare a errori di interpretazione del dato di concentrazione. Medesima attenzione si deve porre in presenza di processi non lineari come l'induzione, la saturazione e l'inibizione metabolica. Un buon modo per valutare l'accuratezza del modello farmacocinetico

presupposto è verificarne, fin dall'inizio dello studio, la sua comparabilità con un modello PBPK (*Physiologically Based Pharmacokinetic model*) che tiene in considerazione e valuta l'influenza di vari fattori (emivita, saturazione metabolica, tempo di campionamento, variabilità inter- e intra-individuale, ecc.) (si rimanda al paragrafo 4.5 per dettagli). Esistono diversi tipi di biomarcatori, quelli di esposizione, di effetto e di suscettibilità. Ciò deriva dal fatto che il BM può essere in grado di distinguere tra: a) monitoraggio della dose, inteso come quantificazione degli inquinanti (o loro metaboliti) nei fluidi biologici; b) monitoraggio degli effetti biochimici o biologici, inteso come stima dei prodotti derivanti dall'interazione tra inquinanti e molecole biologiche e come misura degli effetti biologici causati dagli inquinanti stessi; c) monitoraggio della suscettibilità, inteso come stima delle molecole responsabili di meccanismi di biotrasformazione e/o di riparazione in soggetti suscettibili. Le caratteristiche e l'utilizzo dei diversi tipi di biomarcatori sono di seguito elencati:

- *biomarcatori di esposizione*  
valuta e conferma l'esposizione di individui o popolazioni ad una particolare sostanza;  
mette in evidenza variazioni nel tempo.
- *biomarcatori di effetto*  
documenta le alterazioni precliniche o gli effetti avversi sulla salute causati dall'assorbimento della sostanza o da un suo metabolita.
- *biomarcatori di suscettibilità*  
documenta il grado di risposta dell'individuo in funzione della sua suscettibilità (genetica o acquisita) ad una sostanza o ad un suo metabolita;  
riconosce e protegge individui sensibili.

Un biomarcatore di esposizione fornisce la relazione esistente tra esposizione e dosimetria interna e permette anche di mettere in evidenza eventuali variazioni dell'esposizione ambientale nel tempo. Come esempi di biomarcatori di esposizione a metalli si possono annoverare: a) piombo e cadmio nel sangue; b) alluminio, cromo, cobalto, nichel e selenio in urine e siero; c) mercurio in sangue e urine; d) arsenico, manganese, tallio e vanadio in urine. Un biomarcatore di effetto può essere indice di un'alterazione biochimica, fisiologica o di altro tipo misurabile in un organismo a seguito di un'esposizione o di un danno effettivo o potenziale sulla salute o di una vera e propria patologia. Nel caso dei metalli, tipici biomarcatori di effetto sono rappresentati dall'inibizione di enzimi eritrocitari come l'acido  $\delta$ -aminolevulinico-deidratasi (ALAD) e la pirimidina-5-nucleotidasi (P5N) e dall'aumento di coproporfirina urinaria e zinco-protoporfirina eritrocitaria provocate da esposizioni a piombo a dosi interne comprese tra 100-600  $\mu\text{g/L}$ . L'utilizzo di biomarcatori di effetto in studi di BM è spesso limitato dal fatto che in molti casi essi possono rappresentare dei marcatori aspecifici e, pertanto, possono essere di minore utilità per individuare popolazioni non professionalmente esposte. Al contrario essi rappresentano strumenti di straordinaria validità in ambito di medicina occupazionale, laddove la causa è più facilmente individuabile. Di più recente applicazione nell'ambito del BM sono i biomarcatori di suscettibilità, per i quali lo studio delle relazioni dose-risposta in particolari soggetti in grado di biotrasformare la sostanza assorbita in una dose a rischio rappresentano un indice di predisposizione (ereditaria o acquisita) di un individuo a subire gli effetti del contaminante. I biomarcatori di suscettibilità comprendono marcatori tossicogenetici o farmacogenetici che identificano i tratti genetici responsabili di alcuni meccanismi di biotrasformazione o di riparazione. Un esempio, relativo ai metalli, è rappresentato dall'insorgenza della berilliosi cronica, patologia per la quale la suscettibilità individuale svolge un ruolo fondamentale in quanto è stato osservato che la patologia si manifesta quasi esclusivamente in soggetti con aplotipia HLA-DPB1, caratterizzata dalla presenza di glutammato sulla catena  $\beta$  in posizione 69. In Tabella 3 sono mostrati alcuni esempi di biomarcatori di esposizione, effetto e suscettibilità per i metalli (14, 15, 43, 58-62).

**Tabella 3. Esempi di biomarcatori per i metalli**

<b>Metallo</b>	<b>Biomarcatore di esposizione</b>	<b>Biomarcatore di effetto</b>	<b>Biomarcatore di suscettibilità</b>
Arsenico	Arsenico in urine	Eme ossigenasi (attivazione); coproporfirinogeno ossidasi (inibizione); eme-sintetasi (inibizione)	-
Berillio	Berillio in urine e in sangue	Test di proliferazione dei linfociti	HLA-DPB1 Glu69
Cadmio	Cadmio in urine e in sangue	$\beta_2$ - microglobulina in urina (aspecifico); NAG (N-acetilglucosammina) in urina (aspecifico)	Metallotioneine
Mercurio	Mercurio in urine e in sangue	$\beta_2$ - microglobulina in urina (aspecifico); NAG in urina (aspecifico); $\beta$ - galattosidasi in urina (aspecifico); RBP (proteina che lega il retinolo) in urina (aspecifico)	GST (glutazione-S-transferasi)
Piombo	Piombo in sangue	Zinco-protoporfirina eritrocitaria; ALAD ( $\delta$ -aminolevulinico-deidratasi) in urina (aspecifico); coproporfirina in urina (aspecifico)	ALAD

## 4.4. Metodologie analitiche

Il raggiungimento di dati di BM attendibili e affidabili è funzione anche dell'adozione di particolari accorgimenti e precauzioni durante le fasi pre-analitica e analitica del processo, compresa l'adozione di un sistema di controllo di qualità (interno e esterno) e una valutazione statisticamente appropriata dei risultati. La stesura e l'applicazione di POS rappresenta un valido strumento per garantire la produzione di dati affidabili. Esse trovano larga applicazione nell'ambito di quelle fasi del processo più criticamente connesse alla probabilità di alterazione dell'informazione analitica contenuta nei campioni, quali il tempo di campionamento, la perdita di analiti per evaporazione o degradazione, la contaminazione esogena, l'aliquotazione del campione biologico, la calibrazione, l'analisi strumentale, ecc. A questo proposito il gruppo di lavoro della commissione tedesca per le indagini sui rischi per la salute derivanti da composti chimici ha pubblicato una serie di POS per la determinazione di circa 200 parametri (63), tra cui i seguenti metalli: alluminio (Al), arsenico (As), bario (Ba), berillio (Be), cadmio (Cd), cromo (Cr), cobalto (Co), rame (Cu), mercurio (Hg), indio (In), manganese (Mn), nichel (Ni), piombo (Pb), platino (Pt), antimonio (Sb), selenio (Se), stagno (Sn), stronzio (Sr), titanio (Ti), tallio (Tl), vanadio (V) e zinco (Zn). Le tecniche analitiche per le quali vengono descritte le POS sono la spettroscopia di assorbimento atomico con fiamma o fornetto di grafite (F-AAS o FG-AAS), l'AAS con formazione di idruri, l'AAS con formazione di vapori freddi, la spettroscopia di emissione atomica con plasma accoppiato induttivamente (ICP-AES) e la spettrometria di massa con plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS). Per quanto riguarda il controllo di qualità (per una trattazione più approfondita si rimanda al paragrafo 5.5), quello interno consiste nella verifica della precisione in condizioni ripetute e nella verifica dell'accuratezza delle determinazioni quantitative di laboratorio. Lo studio dell'accuratezza viene generalmente realizzato mediante l'impiego di materiali certificati di riferimento (MCR) a contenuto noto di analita nelle varie matrici biologiche. Il controllo di qualità esterno, invece, può essere inteso come la verifica del livello di precisione e accuratezza analitica raggiunta da un laboratorio attraverso il confronto dei risultati prodotti dal laboratorio stesso con quelli prodotti da altri

laboratori che partecipano ad un circuito di qualità comune. In ambito europeo, in USA e Canada, vengono eseguiti dei programmi per l'assicurazione della qualità (EQUAS, *External Quality Assessment Scheme*) in cui partecipano numerosi laboratori (Tabella 4). L'adozione di sistemi di qualità inter-laboratoriali facilita la produzione di dati attendibili sulla base dei quali possono essere intraprese iniziative di carattere normativo derivanti da una puntuale valutazione dell'esposizione interna. Il crescente numero di pubblicazioni in ambito di BM (30) è stato reso possibile anche grazie all'avanzamento tecnologico che offre, al momento, una buona varietà di tecniche analitiche quali l'AAS, ma soprattutto l'ICP-AES e l'ICP-MS per quanto riguarda l'analisi dei metalli. Queste ultime due tecniche hanno l'indubbio vantaggio di consentire la rilevazione simultanea di più metalli, utilizzando il medesimo campione biologico e consentendo il contenimento dei tempi analitici. In particolare, l'ICP-MS presenta notevoli vantaggi, quali un eccellente intervallo di linearità analitica, l'elevata sensibilità e l'ottima riproducibilità, a fronte, però, degli elevati costi di acquisto e di esercizio e della necessità di personale specializzato (64-73).

**Tabella 4. Rete internazionale di controllo qualità esterno per i metalli (23)**

Paese	Sangue	Urine	Siero/plasma	Sito web
Belgio	As, Cd, Hg, Mn, Pb	-	Al, Cu, Se, Zn	<a href="http://www.iph.fgov.be">http://www.iph.fgov.be</a>
Canada	Cd, Hg, Pb	As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Se, Zn	Al, Cu, Mn, Se, Zn	<a href="http://www.ctq.qc.ca">http://www.ctq.qc.ca</a>
Francia	-	-	Cu, Se, Zn	<a href="http://www.inrs.fr">http://www.inrs.fr</a>
Germania	Cd, Co, Cr, Hg, Mn, Ni, Pb	Al, As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Sb, Ti, V, Zn	Al, Cr, Co, Cu, Mn, Ni, Pt, Se, Zn	<a href="http://www.G-EQUAS.de">http://www.G-EQUAS.de</a>
Gran Bretagna	As, Cd, Hg, Mg, Mn, Pb, Zn	As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Ti, Zn	Al, Cu, Se, Zn	<a href="http://www.surrey.ac.uk/sbms/">http://www.surrey.ac.uk/sbms/</a>
Italia	Cd, Pb	As, Co, Cr, Mn, Ni, Pb, Ti	Al, Cu, Se, Zn	<a href="http://www.iss.it">http://www.iss.it</a>
Olanda	Cd, Co, Hg, Pb, Se, Ti	Al, Cd, Co, Cu, Hg, Mg, Pb, Se, Ti, Zn	Al, Co, Cr, Cu, Li, Mg, Mn, Se, Zn	<a href="http://www.skzI-mca.nl">http://www.skzI-mca.nl</a>
Spagna	Pb	Cr, Hg	-	<a href="http://www.insht.es">http://www.insht.es</a>
USA	As, Cd, Hg, Pb	As, Ba, Be, Cd, Co, Cs, Hg, Mo, Pb, Pt, Sb, Ti, U, W	-	<a href="http://www.wadsworth.org/testing/lead/ptprogram.htm">http://www.wadsworth.org/testing/lead/ptprogram.htm</a>

Simboli dei metalli: Al (alluminio), As (arsenico), Ba (bario), Be (berillio), Cd (cadmio), Co (cobalto), Cr (cromo), Cs (cesio), Cu (rame), Fe (ferro), Hg (mercurio), Li (litio), Mg (magnesio), Mn (manganese), Mo (molibdeno), Ni (nichel), Pb (piombo), Pt (platino), Sb (antimonio), Se (selenio), Ti (tallio), U (uranio), W (tungsteno), Zn (zinco)

## 4.5. Interpretazione del dato

I dati prodotti nell'ambito delle campagne di BM, se pur analiticamente affidabili, dovranno essere sottoposti ad una attenta interpretazione. Generalmente tramite un dato di BM si cerca di dare risposta a due domande: 1) la misura risultante cade all'interno di un intervallo tipico di VR per la popolazione generale? oppure, 2) può indicare e evidenziare un rischio per la salute umana? Partendo dal risultato analitico si può proseguire lungo due direttrici: la prima, che

utilizza il confronto diretto con i VR, permette di risalire all'entità e, più raramente, alla fonte dell'esposizione, e si basa sull'utilizzo della statistica descrittiva e il confronto con i dati di letteratura; la seconda prevede il dosaggio del biomarcatore nel tempo (*in continuum*), l'utilizzo di modelli di analisi del rischio per ricavare il grado di rischio associato all'esposizione. In realtà, l'approccio descrittivo viene usato come primo livello di conoscenza e ad esso, se si ha sufficiente disponibilità di dati su esposizione, tossicità e tossicocinetica della sostanza, viene poi applicato il secondo approccio per arrivare ad un livello più approfondito di conoscenza. Il criterio di tipo descrittivo prevede la definizione di un intervallo o un valore di riferimento per il contaminante (tramite per esempio l'uso di figure statistiche come i percentili); tale intervallo o valore offre uno strumento di confronto e i soggetti o i sottogruppi della popolazione possono ricadere all'interno di tale intervallo o, nel caso di differente esposizione e/o vulnerabilità, mostrare valori più elevati o più bassi. In presenza di livelli al di sopra dell'intervallo di riferimento è importante identificare e studiare le caratteristiche del soggetto (abitazione, lavoro, stili di vita, ecc.) e i fattori fisiologici (es. polimorfismi genetici) che possono aver dato luogo alla più alta esposizione interna (per gli intervalli e i valori di riferimento si rimanda al paragrafo 5). Anche i valori biologici di riferimento per esposizioni professionali potrebbero rappresentare un altro punto di partenza per descrivere e interpretare i dati di BM nella popolazione generale. Per esempio, il BEI (*Biological Exposure Index*) fornito dalla *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) è uno strumento descrittivo utile per valutare se un lavoratore è sottoposto all'esposizione dell'inquinante al di sopra del livello di sicurezza (ovvero il TLV, *Threshold Limit Value*) dell'inquinante stesso riscontrato in aria. Però, dato che il BEI non prende in considerazione i differenti profili di esposizione al contaminante (es. esposizione continua della popolazione generale vs esposizione delle 8 ore del turno lavorativo) e la differente vulnerabilità della popolazione (es. bambini, anziani, donne in gravidanza) e sebbene siano state proposte estrapolazioni alle basse dosi e fattori di incertezza per passare dal dato di esposizione professionale a quello di esposizione non-professionale, l'uso del BEI per studi di BM sulla popolazione generale tende a generare vari errori interpretativi. La Tabella 5 mostra chiaramente la differenza in termini di concentrazione tra i BEI proposti dall'ACGIH e i VR proposti dal NANHES per alcuni metalli (74).

**Tabella 5. Confronto tra i BEI (proposti dall'ACGIH) e i VR (proposti dal NANHES) per gli stessi metalli**

Metallo	Matrice	BEI (ACGIH)	VR (95° percentile, NANHES)
Cadmio	Urine	5 µg/g creatinina	0,98 µg/g creatinina
	Sangue	5 µg/L	1,6 µg/L
Cobalto	Urine	15 µg/L	1,15 µg/L
Mercurio	Urine <sup>a</sup>	35 µg/g creatinina	3,0 µg/g creatinina
	Sangue	15 µg/L	4,6 µg/L
Piombo	Sangue	300 µg/L	46 µg/L

<sup>a</sup> i BEI sono riferiti solo al mercurio inorganico; i VR sono riferiti alle donne in età fertile (16-49 anni).

Il secondo approccio, che si avvale dei modelli per l'analisi del rischio si basa, in linea generale, sull'integrazione delle informazioni derivanti dal BM, dal MA e dai dati tossicologici e epidemiologici disponibili per arrivare alla gestione del rischio e all'adozione di misure preventive. Nel modello più semplice di analisi del rischio, si combinano i risultati derivanti dalle misurazioni del biomarcatore nelle matrici biologiche (es. cadmio, mercurio e piombo nel sangue) e i dati epidemiologici sulla popolazione per valutare la relazione tra dose del biomarcatore e presenza del danno (risposta tossica) nel gruppo campione. Questo modello ha il

limite di non dare informazioni sulla fonte di esposizione, in quanto non prende in considerazione, per esempio, il campionamento ambientale. Un altro modello, invece, si basa sulla caratterizzazione dell'esposizione attraverso un'analisi delle diverse sorgenti di esposizione per mezzo di monitoraggi in aria, acqua, suolo e alimenti, con il fine ultimo di arrivare a stimare la dose assunta dall'uomo (in mg/kg di peso corporeo, al giorno). Con questa dose si stima quantitativamente il rischio espresso come dose di riferimento (RfD, *Reference Dose*) oppure attraverso altri indici quantitativi (es. gli *slope cancer factors*). Un altro schema, proposto più recentemente, tenta di ricostruire la relazione tra dose del biomarcatore e risposta attraverso modelli di calcolo quali: 1) i modelli di farmacocinetica nell'uomo (*human Pharmacokinetic models*, PK) che permettono di mettere in relazione la concentrazione del biomarcatore e la dose assunta; o, 2) modelli PK su animali che utilizzano direttamente la concentrazione del biomarcatore e non la dose applicata (proveniente da studi di tossicità su animali). Uno schema esemplificativo degli approcci proposti per l'interpretazione di un dato di BM è riportato in Tabella 6.

**Tabella 6. Approcci per l'interpretazione dei dati di BM**

Approccio	Modello	Significato
Descrittivo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Uso di intervalli di riferimento</li> <li>- Uso di indici biologici di esposizione</li> </ul>	Definisce il livello di esposizione individuale e permette il confronto tra individuo singolo, popolazione generale e popolazione professionalmente esposta.
Analisi del rischio	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Integrazione tra dati di BM e dati epidemiologici</li> </ul>	Valuta la relazione tra dose del biomarcatore e effetto, non identifica la fonte dell'esposizione.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Integrazione dei dati di BM nella valutazione "classica" del rischio</li> </ul>	Valuta la dose giornalmente assunta dall'uomo per arrivare ad una stima quantitativa del rischio.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Uso di modelli di farmacocinetica in uomo</li> <li>- Uso di modelli di farmacocinetica in animali</li> </ul>	Valuta la relazione tra concentrazione del biomarcatore e la dose assunta.

I modelli PK sono relativamente semplici: l'organismo è considerato un unico compartimento (o al massimo due) dove il composto chimico può essere accumulato, trasformato e/o escreto. Partono dal presupposto che processi come assorbimento, metabolismo epatico e escrezione renale siano linearmente e direttamente connessi alla presenza della sostanza contaminante nel corpo umano senza considerare per esempio il fenomeno della saturazione. Un semplice esempio di approccio PK è il modello predittivo SHEDS (*Stochastic Human Exposure and Dose Simulation*), sviluppato dall'EPA (75) *National Exposure Research Laboratory* (NERL), in grado di simulare per esempio l'esposizione dell'individuo per inalazione di particolato atmosferico o di un composto tossico presente in aria; tale modello crea profili di esposizione nel tempo al composto chimico per determinati individui combinando l'informazione sugli individui stessi (residenza, attività, ecc.) e la concentrazione del chimico nel microambiente frequentato dagli individui (76). Un modello PK è stato usato per la stima dell'esposizione a metilmercurio sulla base di misure di mercurio effettuate nel sangue e nei capelli dopo esposizione al metilmercurio stesso (77). Il modello è stato poi usato dall'EPA per derivare l'RfD per il metilmercurio (78, 79). Un altro modello che incorpora e espande il modello SHEDS e che utilizza l'approccio *Person Oriented Modeling* (POM) è il modello MENTOR (*Modeling ENvironment for TOrtal Risk Studies*) che considera l'esposizione multipla al composto chimico (inalazione, ingestione, ingestione non-

alimentare, assorbimento dermale). Le simulazioni tipicamente coinvolgono: 1) la caratterizzazione dei livelli di background del contaminante in vari microambienti; 2) la selezione di una popolazione che riproduca gli aspetti demografici più rappresentativi (in termini di età, sesso, occupazione, educazione); 3) il calcolo dell'*intake* del contaminante considerando le differenze fisiologiche e di stili di vita e combinando le esposizioni multiple; 4) la stima della dose al tessuto o organo target (80). Un approccio più avanzato ai modelli PK è rappresentato dai modelli PBPK che descrivono i compartimenti fisiologicamente rilevanti nei quali il composto chimico è assorbito, trasformato o eliminato, sulla base di parametri quali il flusso sanguigno, le proprietà di partizione e i meccanismi di *clearance* (81). Tali modelli sono in grado di simulare la concentrazione della sostanza nei tessuti target (es. cervello, feto e tiroide), la cinetica non-lineare (es. la saturazione metabolica), la formazione di metaboliti primari e secondari, lo scenario di esposizione (via e entità), la variabilità tra specie e la possibilità di interazioni tra composti in miscele. Più recentemente, sono stati proposti modelli PBPK/PD (*Physiologically Based Pharmacokinetic and Pharmacodynamic*) in grado di descrivere tramite equazioni matematiche non solo la distribuzione della sostanza chimica all'interno dell'organismo ma anche come alcuni processi biologici siano alterati come risultato della presenza del composto chimico nel corpo; in ultima analisi, i modelli PBPK/PD sono capaci di predire le dosi tossicologicamente rilevanti. Il modello ERDEM (*Exposure-Related Dose Evaluation Model*) è un modello matematico PBPK/PD, sviluppato dall'EPA-NERL, capace di generare fino a nove differenti profili di esposizione (comprendenti inalazione, ingestione, iniezione e assorbimento dermale) per generare la dose all'organo (umano o animale) (82). Le dosi possono essere un picco di concentrazione, l'area sotto la curva concentrazione-tempo o la misura del composto chimico in un dato organo. L'organo può essere il polmone, il sistema gastroenterico e quello cutaneo, il fegato, i reni, e altri compartimenti a seconda dei casi (in tutto fino a 31 compartimenti). Il modello fornisce anche profili di metabolismo del composto, i processi di legame (es. con le proteine del sangue) e i processi di cinetica enzimatica. Ai modelli precedentemente elencati si affiancano, a completamento delle informazioni necessarie, modelli che possono predire statisticamente il possibile impatto delle strategie di mitigazione adottabili. Uno dei modelli più recenti, sviluppato dal CEAM di Atene (*Center for Exposure Assessment Modeling*) è il FRAMES-3MRA (*Framework for Risk Analysis in Multimedia Environmental Systems-Multimedia, Multipathway, Multireceptor Risk Assessment*) per la valutazione dell'esposizione umana e ecologica e la valutazione del rischio da inquinamento da rifiuti. Maggiori informazioni possono essere ottenute visitando il sito: <http://www.epa.gov/athens/research/modeling/3mra.html>.

## 4.6. Implicazioni etiche e sociali

Un programma di BM presenta alcune implicazioni etiche e sociali per il fatto che vengono raccolti e analizzati campioni umani, utilizzati dati personali e, talvolta, coinvolte fasce sensibili della popolazione quali i bambini. Il processo che porta alla partecipazione di un individuo allo studio è di fondamentale importanza e deve rispettare, ovviamente, la dignità, i diritti, la libertà di scelta dell'individuo, oltre il suo diritto alla privacy anche in base alle normative vigenti. La partecipazione è su base volontaria e sulla piena informazione della persona circa gli obiettivi e le possibili implicazioni dello studio. Solo in presenza di un consenso scritto e firmato da parte del partecipante o di chi ne esercita la potestà legale può avvenire il suo reclutamento. Consenso che deve essere esplicitamente esteso anche alla conservazione dei campioni biologici a lungo termine, se prevista. La libertà di scelta comprende il diritto di rifiuto anche a posteriori di utilizzare il sangue o altri campioni biologici già prelevato sulla base di decisioni che vanno comunque accettate. Dalla loro parte, le istituzioni coinvolte nello studio sono chiamate ad

approvare la ricerca attraverso i propri comitati etici, che ne valuteranno anche il bilancio complessivo in termini di rapporto costo/beneficio (disagio per il partecipante arruolato *vs* rilevanza dei risultati attesi). I campioni dovranno essere etichettati con codici e mai con i nomi dei donatori e l'elenco di corrispondenza codice/paziente dovrà essere conservato in luogo separato. Altra questione etica è l'identificazione degli individui suscettibili che può da un lato aiutare a prevenire la loro esposizione alla sostanza nociva in oggetto ma dall'altro lato può portare alla discriminazione del soggetto soprattutto in ambiente lavorativo. È anche indispensabile considerare il fatto che solo per alcuni biomarcatori di suscettibilità è ben stabilita la loro relazione con la predisposizione al danno, per cui se il paziente non riconosce a pieno questo grado di incertezza, l'informazione fornita può causare preoccupazione superflua.

## 5. I VALORI DI RIFERIMENTO (VR)

### 5.1. Finalità e trasferibilità

Come già accennato all'interno dei paragrafi precedenti, una prima valutazione dei risultati di un BM è resa possibile dal confronto con i VR ottenuti in popolazioni di riferimento. Da tale confronto può scaturire la necessità di intraprendere delle azioni di prevenzione e di rimedio per ridurre l'esposizione e gli effetti sulla salute della popolazione interessata. I VR possono essere considerati un'evoluzione del vecchio concetto di "valore normale", inteso nelle sue tre principali accezioni: clinica ("valori non patologici"), epidemiologica ("valori abituali" più facilmente ritrovati nella popolazione generale) e statistica ("valori distribuiti normalmente"). Con il passare degli anni, l'impiego del termine "valore normale" è stato sostituito dal termine VR dato che non sempre i "valori abituali" di concentrazione di un determinato metallo in una popolazione sono sinonimo di assenza di danno/malattia né presentano una distribuzione Gaussiana (83). Il VR di uno xenobiotico o di un suo metabolita è definito come il valore ottenuto dalla descrizione statistica dei risultati del suo dosaggio in campioni biologici prelevati da una popolazione o da un soggetto di riferimento. A tale VR ci si "riferisce" per interpretare i risultati delle determinazioni dello stesso analita in individui o gruppi di individui esposti o potenzialmente esposti attraverso una qualsiasi via (ambientale, occupazionale, alimentare, ecc.) a tale analita (84). È evidente che i VR testimoniano e misurano quello "scambio" che l'uomo instaura con il comparto ambiente in senso lato e che varia qualitativamente e quantitativamente a seconda delle caratteristiche della popolazione e dell'ambiente stesso. Alla base dei VR viene posto il principio della comparazione, quello per cui il valore biologico osservato in un BM per essere interpretato dal punto di vista tossicologico deve essere confrontato con un idoneo VR. In questo tipo di procedura la dicitura qualitativa "valore normale" perde, quindi, di significato e ciò che conta è la differenza tra le due quantità, quella "osservata" e quella di "riferimento". In pratica, i risultati delle prove effettuate in un laboratorio vengono confrontate con i valori che derivavano da soggetti classificati come "controlli". Questi "controlli" non sono necessariamente sani o appartenenti all'intera popolazione ma soggetti le cui caratteristiche sono ben definite (85). Oggi, i VR stanno acquisendo nel confronto scientifico e normativo importanza e spazio sempre più rilevante, avendo definitivamente assunto la funzione di mezzo per valutare l'assorbimento del contaminante da parte dell'uomo. Sono stati ampiamente riconosciuti come utili strumenti per: a) mettere in osservazione chi presenta un livello del contaminante superiore al VR; b) individuare possibili fonti e modalità di assorbimento del contaminante; c) monitorare la comparsa di eventuali effetti sulla salute umana. Gli scopi specifici dei VR possono, quindi, essere molteplici: 1) esplorare uno stato di salute; 2) studiare significativi cambiamenti fisiologici individuali; 3) studiare gli effetti dell'ambiente sull'uomo; 4) monitorare il paziente/individuo nel tempo, 4) valutare l'efficacia di mezzi di protezione individuale; 5) contribuire a eseguire diagnosi; 6) sperimentare e selezionare terapie, ecc. L'*International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC) ha definito la terminologia relativa, al fine di evitare un utilizzo ambiguo dei termini e permettere una chiara descrizione e interpretazione dei VR affinché possano essere trasferibili e confrontabili universalmente (86-88).

I termini proposti sono i seguenti:

- *individuo di riferimento*: soggetto selezionato per il confronto secondo criteri stabiliti;
- *popolazione di riferimento*: insieme formato da tutti i possibili individui di riferimento;
- *gruppo o campione di riferimento*: adeguato numero di individui selezionati in modo da essere rappresentativo della popolazione di riferimento;

- *valore di riferimento*: valore di un determinato indicatore ottenuto dalla elaborazione statistica dei risultati del suo dosaggio in campioni biologici prelevati da una popolazione o da un gruppo di riferimento;
- *distribuzione di riferimento*: distribuzione statistica del valore di riferimento; è caratterizzata da una forma geometrica (normale o non-normale) e dai corrispondenti parametri;
- *limiti di riferimento*: valori estremi della distribuzione di riferimento che definiscono l'intervallo di riferimento;
- *intervallo di riferimento*: intervallo di valori compreso tra, e che include, due limiti di riferimento;
- *valore osservato*: valore osservato o misurato di un particolare tipo di analita per prendere una decisione medico-sanitaria; può essere comparato con i VR, la distribuzione di riferimento, i limiti di riferimento o gli intervalli di riferimento.

Le classi di composti per le quali è utile produrre VR sono:

- gli elementi chimici assimilabili alle variabili chimico-cliniche quali:
  - metalli essenziali e tossici (cromo, manganese, arsenico, cobalto, nichel, ferro, zinco, rame, alluminio, ecc.);
  - indicatori non specifici di effetto di alcuni metalli quali piombo, cadmio e mercurio (es. ALA-U, ZPP, e  $\beta_2$ -microglobulina dosabili anche quando non vi è esposizione a piombo o cadmio)
- i composti di specifica natura e significato quali:
  - metalli di interesse tossicologico (piombo, cadmio, mercurio, ecc.);
  - metaboliti specifici di metalli tossici;
  - indicatori di reazione o di effetto di specifici metalli tossici.

I metalli possono essere, quindi, suddivisi in gruppi; nel primo gruppo rientrano alcuni metalli che presentano contemporaneamente caratteristiche di essenzialità e tossicità (arsenico, cromo, nichel, zinco, ecc.) e alcuni metaboliti non specifici di effetto per i metalli, dosabili anche quando non vi è esposizione al metallo causa dell'effetto. In questo caso i VR sono da intendere o come la risultante della "concentrazione di fondo" determinata dai soli processi fisiologici o come somma della "concentrazione di fondo" e della quota ascrivibile ad un'esposizione di tipo ambientale o professionale. Nel secondo gruppo rientrano invece i metalli, composti e/o sostanze di esclusiva natura e interesse tossicologico, che non dovrebbero essere presenti e misurabili in matrici biologiche e per i quali, in linea di principio, i VR dovrebbero essere pari a "zero" (controllo negativo). Con tale valore "zero" andrebbero quindi confrontati i valori dei dosaggi dei soggetti in qualche modo esposti e pertanto sarebbe automatica la dimostrazione di esposizione-assorbimento superiori a quelli della popolazione di confronto. In realtà, il fenomeno dell'eco-dispersione di un elevato numero di metalli (e altri xenobiotici) ha portato a misurare, quando le tecniche analitiche lo hanno permesso, gli stessi metalli e/o i loro metaboliti nelle matrici biologiche di gruppi sempre più ampi di popolazione, anche in aree remote. A questo proposito, è noto come livelli anche elevati di piombo e mercurio si possano riscontrare in abitanti di zone anche molto distanti dal punto di origine della contaminazione. La produzione di VR per i metalli non è però né semplice né immediata, considerando che esistono delle difficoltà legate alla fase pre-analitica e analitica (contaminazione del campione, livello molto basso dell'analita, ecc.) e alla variabilità dovuta a fattori confondenti quali dieta, stile di vita e luogo di residenza, ecc. (86). Altre conoscenze indispensabili per la produzione di VR sono quelle di tipo tossicocinetico, dal momento che solo conoscendo come uno metallo è assorbito, distribuito, metabolizzato o escreto, sarà possibile attribuire un significato ai livelli dell'indicatore riscontrati in una determinata matrice.

I fattori che influenzano le varie fasi di produzione dei VR possono essere così riassunti: 1) conoscenza tossicologica dello xenobiota; 2) controllo dei fattori confondenti; 3) selezione della popolazione di riferimento; 4) trattamento del campione; 5) metodo analitico; 6) trattamento statistico del dato. In generale, la produzione dei VR non può prescindere da una descrizione chiara: 1) delle condizioni fisiologiche e ambientali del gruppo di riferimento (es. assunzione di alimenti e farmaci, fumo, grado di obesità, stato di gravidanza, ecc.); 2) dei criteri di inclusione e di esclusione utilizzati per definire la popolazione di riferimento; 3) dei criteri di partizione utilizzati per la separazione della popolazione di riferimento in sotto-gruppi in funzione di variabili quali età, sesso, gruppo etnico, fattori socio-economici, ecc.; 4) della procedura di raccolta e preparazione del campione; 5) del metodo analitico impiegato per la quantificazione, incluse le informazioni sulle prestazioni e sull'incertezza della misura; 6) del metodo statistico utilizzato per la stima dei VR.

La diversità delle procedure analitiche nei laboratori per produrre i VR e dei criteri adottati per la selezione della popolazione ha spesso ostacolato la trasferibilità degli stessi. La descrizione dettagliata della popolazione, della metodologia e delle procedure di controllo di qualità impiegate è prerequisite essenziale per la produzione di VR attendibili, per il trasferimento dei VR da un laboratorio all'altro e per la comparabilità del dato finale.

## 5.2. Criteri di qualità

È ormai riconosciuto che errori nella selezione dei soggetti o nel campionamento/trattamento/analisi del campione o nel trattamento statistico del dato sono le fonti di inattendibilità dei VR riscontrati in letteratura. Una valutazione delle recenti pubblicazioni ha mostrato che non sempre vengono rispettati criteri minimi di qualità metodologica o non vengono riportate in dettaglio le variabili che possono essere determinanti nella definizione dei VR. È frequentemente riscontrabile, infatti, la mancanza di un'opportuna descrizione del gruppo di riferimento o la carenza di informazioni sul campionamento, sulle prestazioni analitiche e sul trattamento del dato. Solo negli ultimi anni si sta raggiungendo un accordo comune sulle modalità di produzione dei VR per ottenere dati rappresentativi e confrontabili a livello regionale, nazionale e internazionale. Un approccio sistematico fu intrapreso dal gruppo TRACY (*International project for producing reference values for concentrations of trace elements in human blood and urine*) che definì una procedura per la valutazione delle pubblicazioni scientifiche che riportano dati sul BM (87) e che, quindi, indirettamente definì le linee guida per la conduzione degli studi in materia e la presentazione dei dati di VR. In particolare, il gruppo TRACY suggerisce di applicare a ciascuna pubblicazione un processo di valutazione critica sviluppato in più fasi, da una prima fase esplorativa di scelta dei criteri fondamentali di cui tener conto ad una fase finale di verifica del *consensus* tra gli esperti.

I criteri da adottare per la valutazione dei lavori scientifici che riportano VR possono essere:

- *Campionamento*
  - numero di campioni o di individui
  - criteri di selezione
  - età dei soggetti
  - sesso (se donna, gravidanza e uso di contraccettivi)
  - origine etnica
  - origine geografica (urbana o rurale)
  - domicilio vicino ad aree contaminate (traffico, industrie)

- dieta, incluso il consumo di alcool
  - fumo
  - stato di salute (obesità, diabete, pressione sanguinea, amalgami e protesi)
  - assunzione di farmaci e/o di integratori minerali
  - lavoro
  - esercizio fisico
  - tessuto o fluido campionato
  - tecnica di campionamento (uso di aghi, anticoagulanti, contenitori in plastica, procedure di pulizia ecc.)
  - conservazione dei campioni (temperatura e tempo)
- *Analisi*
- prestazioni (limite di rivelabilità, precisione e accuratezza) della tecnica analitica
  - materiale di riferimento usato
  - praticabilità
  - incertezza della misura
  - possibili punti di criticità per contaminazione o perdita dell'analita
  - partecipazione a circuiti di confronto interlaboratoriale
  - confronto di due o più metodi
- *Trattamento statistico del dato*
- trattamento del dato e presentazione (distribuzione di frequenza, numero di individui e elaborazione statistica)

Ogni pubblicazione che riporta dati sul BM dei metalli può ottenere una classificazione alla luce della “qualità” con cui è stata effettuata la selezione della popolazione di riferimento, il campionamento, l'analisi e il trattamento statistico dei risultati e di come sono presentati i dati. Se la pubblicazione viene considerata di elevato grado di rilevanza, i dati ivi riportati possono essere utilizzati per ulteriori studi e confronti. Se invece la qualità della pubblicazione risulta insufficiente i dati sono inutilizzabili come VR né possono essere considerati in prospettiva di una meta-analisi di VR. In linea generale, un lavoro è considerato utilizzabile se gli Autori hanno dimostrato di avere dato giusto peso ai seguenti aspetti: 1) omogeneità della popolazione studiata; 2) controllo delle possibili contaminazioni anche in fase pre-analitica; 3) presentazione dettagliata della documentazione riguardante il controllo di qualità; 4) verifica della distribuzione statistica dei dati. È evidente che i criteri di qualità analitica e statistica e i fattori critici da considerare possono variare da elemento a elemento e da matrice a matrice, anche in funzione dello scopo finale del lavoro scientifico. Per esempio, per la definizione dei VR per il piombo nel sangue, è importante considerare l'età, il sesso, l'appartenenza etnica, la dieta, l'abitudine al fumo, la stagione e l'età di campionamento, la zona residenziale e la località geografica. Per il cadmio, l'abitudine al fumo influenza notevolmente il contenuto nel sangue, mentre per il selenio esistono importanti differenze annuali a seconda delle fluttuazioni nella dieta. Il consumo di pesce può marcatamente influenzare i livelli di mercurio nel sangue mentre ha un effetto minore sul contenuto del mercurio nel siero/plasma e nelle urine. L'esposizione interna da protesi dentali e amalgami in metallo influenza i VR relativi al mercurio e al cromo, mentre il prelievo del sangue con aghi in acciaio è fonte di errori nella produzione dei VR per nichel, cromo, manganese e ferro nel siero. Utilizzando questo approccio progettuale è possibile considerare i possibili fattori confondenti come criteri di partizione e definire, per lo stesso metallo, VR differenti in funzione dei differenti gruppi di popolazione identificati (per esempio, bambini *vs* adulti, donne *vs* uomini, fumatori *vs* non fumatori, ecc.) (25). Esempi di fattori confondenti che rendono indispensabili successive partizioni della popolazione in sottogruppi sono i seguenti:

Esempi di fattori confondenti i VR in funzione del metallo considerato sono:

- *piombo nel sangue*: età e genere (il piombo è più basso nelle donne negli rispetto agli uomini e nei bambini rispetto agli adulti)
- *cadmio in sangue e urine*: età (il cadmio è maggiore negli adulti)
- *cadmio nel sangue*: fumo (il cadmio è più alto nei fumatori)
- *mercurio in urine*: otturazioni dentarie (il mercurio è maggiore in funzione del numero di otturazioni)
- *mercurio nel sangue*: consumo di pesce (popoli che consumano molto pesce presentano valori più alti di mercurio)

La Tabella 7 mostra le concentrazioni di riferimento nei vari sottogruppi della popolazione ottenuti nelle campagne GerES III (1998) e GerES IV (2003-2006) (89-91).

**Tabella 7. VR per alcuni metalli suddivisi per gruppi di popolazione (da GerES III e GerES IV)**

<b>Metallo/matrice</b>	<b>Popolazione</b>	<b>VR</b>
Antimonio/urine	Bambini (3-14 anni)	0,3 µg/L
Arsenico/urine	Bambini (3-14 anni) e adulti (18-69 anni), nessuna assunzione di pesce nelle ultime 48 ore	15 µg/L
Piombo/sangue	Bambini (3-14 anni)	35 µg/L
	Adulti, donne (18-69 anni)	70 µg/L
	Adulti, uomini (18-69 anni)	90 µg/L
Cadmio/urine	Bambini (3-14 anni), non fumatori	0,2 µg/L
	Adulti (18-69 anni), non fumatori	0,8 µg/L
Cadmio/sangue	Bambini (3-14 anni), non fumatori	0,3 µg/L
	Adulti (18-69 anni), non fumatori	1,0 µg/L
Mercurio/urine	Bambini (3-14 anni), senza amalgami	0,4 µg/L
	Adulti (18-69 anni), senza amalgami	1,0 µg/L
Mercurio/sangue	Bambini (3-14 anni), consumo di pesce ≤3 volte/mese	0,8 µg/L
	Adulti (18-69 anni), consumo di pesce ≤ 3 volte/mese	2,0 µg/L
Nichel/urine	Bambini (3-14 anni)	4,5 µg/L
	Adulti	3,0 µg/L
Platino/urine	Adulti (18-69 anni), senza otturazioni, ponti, corone	10 ng/L
Tallio/urine	Bambini (3-14 anni)	0.6 µg/L
Uranio/urine	Bambini (3-14 anni)	40 ng/L
	Adulti	30-60 ng/L

Di seguito vengono approfonditi alcuni criteri e fornite indicazioni di cui tener conto durante le quattro fasi principali (scelta della popolazione di riferimento, campionamento, analisi e trattamento del dato) del processo di produzione e valutazione dei VR.

### 5.3. La popolazione di riferimento

La popolazione di riferimento può includere soggetti volontari, studenti, donatori di sangue, ma anche lavoratori non professionalmente esposti. Non è possibile asserire quale popolazione sia maggiormente idonea per la produzione di VR, ma è invece indispensabile che le caratteristiche del gruppo siano riportate in dettaglio e che la popolazione selezionata sia

omogenea rispetto a tali caratteristiche (85). Qualora l'esposizione professionale rappresenti il fine del BM, il gruppo di riferimento risulterà da una selezione di soggetti simili per età, sesso, esposizione generale al gruppo in studio ma diversi, ovviamente, per la sola esposizione occupazionale. Analogamente, qualora si voglia verificare una popolazione abitante in un sito con un particolare inquinamento ambientale si utilizzerà un altro gruppo che differisca ipoteticamente per la sola sospetta esposizione. Le caratteristiche minime che devono essere specificate sono: residenza, sesso, età, assunzione di alcool, abitudine al fumo, stato di salute, dieta, professione, hobby, assunzione di farmaci e/o di integratori minerali, esercizio fisico, amalgami, esposizione a impianti metallici (protesi). Anche nella scelta dei criteri di selezione (inclusione e esclusione) viene raccomandato di considerare solo quei criteri effettivamente rilevanti per la definizione della popolazione di riferimento per quel dato analita; tali criteri non devono essere troppo restrittivi dal momento che non è necessario avere una popolazione "ideale" (92). La distinzione tra criteri di selezione e criteri di partizione è essenzialmente funzione dello scopo dei VR. Per esempio sia l'età che il sesso sono criteri di selezione se si necessita di un gruppo di maschi di controllo tra i 21 e i 40 anni, altrimenti età e sesso rientrano tra i criteri di partizione.

I criteri di selezione possono essere:

- *Patologie.* È importante escludere (attraverso dati di anamnesi, esami clinici e dati di laboratorio) tutti i soggetti affetti da malattie e disordini o che stanno seguendo terapie specifiche o che sono sottoposti a medicazioni che possono interferire con la tossicocinetica del metallo in esame.
- *Agenti farmacologici e voluttuari.* Eventuale assunzione di farmaci (tra cui gli agenti contraccettivi riservano particolare attenzione), fumo, consumo di alcool e bevande contenenti caffeina.
- *Stati fisiologici modificati.* Gravidanza, esercizio fisico intenso, consumo recente di un pasto, stress e disordini psicologici.

I criteri di partizione possono essere:

- *Età e sesso.* Vanno considerati in accordo con le conosciute variazioni del metallo in funzione dell'età e del sesso. Per esempio, periodi durante i quali sono osservati rapidi cambiamenti, come infanzia, pubertà e menopausa, richiedono intervalli di età più ristretti.
- *Fattori genetici, socioeconomici e ambientali.* Può essere utile selezionare i soggetti in accordo con alcuni marcatori genetici, pigmentazione della pelle, dieta, ambiente geografico (la possibile esposizione dovuta al luogo di residenza, attività lavorativa e traffico), ecc.
- *Criteri biologici.* Va considerato, per esempio, se la popolazione è ospedalizzata nel caso in cui la postura abbia un effetto sul contenuto del metallo in studio.

Il numero di soggetti da includere nello studio dovrà essere sufficientemente grande per minimizzare possibili fattori di variabilità e aumentare la rappresentatività delle osservazioni, ma non eccessivamente grande perché, seppure aumentando la numerosità del campione i valori osservati tendono ad avvicinarsi ai valori "veri", il carico di lavoro analitico e organizzativo potrebbe essere eccessivo. Altri fattori che condizionano la numerosità del campione sono il tipo e il numero delle partizioni necessarie; è infatti indispensabile garantire un numero sufficiente di casi (e se possibile un numero simile di casi) nei vari strati per eseguire corrette elaborazioni statistiche. È stato raccomandato che il numero minimo di soggetti per strato debba essere pari a 40 (93). Il criterio che può essere seguito per valutare una campagna di BM rispetto alla numerosità dei soggetti per stratificazione è riportato nella Tabella 8 (86). Le pubblicazioni che

riportano dati su meno di 20 individui non sono idonee per essere utilizzate qualora lo scopo del lavoro sia quello di fornire un VR.

**Tabella 8. Classificazione degli articoli sui VR in base alla numerosità del campione per strato**

Numero di individui per strato	Classificazione della pubblicazione
< 10	0
10-20	≤ *
20-40	*, oppure ** se la distribuzione è nota
> 40	≥ **

0: qualità non adeguata per fornire VR (studio non utilizzabile); \*: qualità scarsa (studio non utilizzabile); \*\*: qualità discreta (studio utilizzabile, in mancanza di studi con qualità superiore); ≥\*\*: qualità adeguata per fornire VR

## 5.4. Trattamento del campione

Durante la produzione dei VR per i metalli è indispensabile tenere sotto controllo i fattori pre-analitici che possono influenzare il risultato finale. A tale scopo è necessario, fin dalla fase di pianificazione della campagna, considerare i possibili fattori di variabilità biologica e tecnica lungo la catena analitica e sviluppare procedure idonee a contenerli. In generale, le fasi di campionamento, conservazione e trattamento dei campioni dovrebbero essere effettuate tenendo conto che: 1) il rischio di alterazione dell'informazione analitica è potenzialmente tanto maggiore quanto minori sono le concentrazioni attese del metallo; 2) la raccolta di piccole quantità di campione (ad esempio, i prelievi ematici capillari) può ampliare l'effetto della contaminazione; 3) meno numerose e complesse sono le operazioni pre-analitiche effettuate e minore è il rischio di alterare l'informazione analitica del campione; 4) la durata del periodo di conservazione è proporzionale al rischio di influenzare negativamente l'accuratezza delle determinazioni finali. I fattori di variabilità pre-analitica di cui tener conto e che devono essere adeguatamente descritti sono:

- *fattori biologici*
  - digiuno e diete particolari che influenzano direttamente la concentrazione del metallo;
  - assunzione di sostanze farmacologicamente attive (inclusi etanolo, caffeina, tabacco, integratori);
  - terapie di supplementazione ormonale, uso di farmaci contraccettivi e stress che hanno un effetto sullo stato metabolico dell'individuo;
  - fattori emo-dinamici, inclusa la postura al momento del prelievo;
  - danno cellulare e tissutale dovuto a esercizio fisico, massaggio muscolare, ecc.
- *fattori metodologici*
  - ambiente in cui si esegue il prelievo (ad esempio, nel caso della determinazione di metalli a livello di ultratraccia è consigliabile dotarsi di un laboratorio di Classe 100);
  - tecniche di raccolta (nel caso di prelievi ematici, evitare l'uso del laccio emostatico);
  - strumenti di raccolta (aghi, siringhe);
  - additivi (anticoagulanti, promotori di separazione del siero dal plasma, ecc.);
  - reagenti (verificare l'apporto di metalli);
  - contenitori (fenomeni di assorbimento e/o rilascio del metallo; inerzia chimica nei confronti del campione e dei reagenti);
  - temperatura e durata della conservazione. A temperatura ambiente il materiale biologico va incontro a rapide trasformazioni chimiche, microbiologiche e

enzimatiche. A +4 °C il campione dovrebbe essere analizzato entro una settimana; per periodi più lunghi va conservato tra -5 °C e -80 °C;

- velocità di centrifugazione del sangue;
- tecniche usate per refrigerare, agitare, miscelare il campione.

Ad esempio, in virtù della facile contaminazione da cromo, nichel e manganese da parte di aghi di acciaio utilizzati nel prelievo di campioni ematici, i dati ottenuti su campioni così prelevati non saranno utilizzabili: per questi e altri metalli si utilizzeranno metodi di raccolta alternativi quali i cateteri di plastica o, pur prelevando con aghi metallici, la prima aliquota di sangue (circa 10 ml) sarà utilizzata per altri scopi analitico-diagnostici. In modo analogo, documentare l'utilizzo di contenitori adeguatamente decontaminati o le prove di rilascio eseguite sul contenitore conferisce maggiore validità all'analisi e al lavoro eseguito. Per quanto riguarda il materiale dei contenitori utilizzati dal prelievo all'analisi la procedura è quella di verificare caso per caso il rilascio dalle pareti del contenitore: la plastica dei contenitori e dei tappi può rilasciare vari metalli come cadmio, nichel, zinco, ecc. Una questione particolarmente discussa è quella riguardante l'uso di anticoagulanti; come regola generale la contaminazione esogena da anticoagulante deve essere misurata per ciascun elemento in studio e il valore deve essere documentato. Si riportano di seguito una serie di informazioni che è necessario annotare e descrivere durante la raccolta di campioni ematici per l'analisi dei metalli; più tali informazioni sono dettagliate e tanto più aumenta l'utilità del lavoro (86):

- *preparazione del paziente*
  - digiuno (durata);
  - farmaci (tipo, quantità, durata della somministrazione);
  - ritmo biologico (sonno, pasti);
  - periodo di riposo prima della raccolta.
- *raccolta del campione*
  - tempo (ora del giorno, data);
  - postura (postura generale e posizione del braccio);
  - tipologia (sangue venoso, arterioso);
  - sito di raccolta e sua preparazione (disinfezione);
  - strumenti (siringhe, aghi, contenitori);
  - additivi (anticoagulanti, conservanti, promotori di separazione);
  - tecnica (puntura, flusso libero).
- *trattamento del campione*
  - trasporto (contenitore, temperatura, durata);
  - coagulazione (tempo, temperatura);
  - separazione del siero dal sangue (forza e tempo di centrifugazione, temperatura);
  - conservazione (contenitore, conservanti, temperatura, durata);
  - preparazione per l'analisi (scongelo, aliquotazione, miscelazione).

## 5.5. Analisi: validazione e incertezza del metodo

Le normative vigenti sottolineano l'importanza della pianificazione di una procedura di validazione del metodo e di identificazione di tutte le possibili fonti di incertezza derivanti dall'intera procedura analitica (94-96). La validazione del metodo è un procedimento di stima di alcuni requisiti di analisi e di conferma che il metodo sviluppato sia conforme agli obiettivi preposti, mentre l'incertezza è un parametro associato al risultato di una misurazione che caratterizza la dispersione dei valori ragionevolmente attribuibili al misurando. In ambito

internazionale è ormai riconosciuto il vincolo dei laboratori di fornire indicazioni sulle prestazioni del metodo nonché una valutazione quantitativa delle incertezze legate ai risultati, in modo che gli utenti possano essere in grado di accertare l'affidabilità dei risultati stessi. Senza queste informazioni i valori delle misurazioni non possono essere confrontati tra loro né con altri risultati simili. La valutazione quantitativa delle diverse componenti di incertezza – esplicitamente richiesta da standard internazionali come la ISO/IEC 17025 – permette anche di identificare gli aspetti del metodo che possono essere migliorati (97). Il procedimento di validazione del metodo comprende la determinazione di: limite di rilevabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ), linearità, specificità, accuratezza (esattezza e precisione) e robustezza. Il LOD è definito dalla ISO come la “minima concentrazione netta rilevabile” (98), mentre per il LOQ l'Eurachem fornisce la seguente definizione “quantità più bassa di analita in un campione che può essere determinato con precisione accettabile e accuratezza nelle condizioni sperimentali indicate” (99). Si parla di linearità di un metodo quando i risultati delle misurazioni sono direttamente, o tramite una trasformazione matematica, proporzionali alla concentrazione dell'analita all'interno di un determinato intervallo di concentrazione (94): l'estremità inferiore dell'intervallo di concentrazione è, ovviamente, delimitata dai valori del LOD e/o LOQ, mentre all'estremità superiore i limiti saranno imposti dalla capacità di risposta dello strumento. La specificità assicura che il metodo risponda in modo univoco all'analita di interesse e non ad altri composti interferenti (94): è prevalentemente una funzione della tecnica di misurazione ma può variare in base alla classe di composti o alla matrice. Nei metodi basati sulla spettrometria di massa per lo studio dei metalli, il calcolo della specificità riguarda il processo di selezione della massa analitica e della risoluzione strumentale e la conferma che, in tali condizioni, le interferenze non sono significative. L'accuratezza di un metodo, vicinanza e dispersione dei risultati ottenuti rispetto al valore stimato vero, è determinata tramite la misurazione dell'esattezza e della precisione. L'esattezza è il grado di concordanza tra il valore medio ottenuto da un'ampia serie di misurazioni e un valore di riferimento (100, 101). Sono riconosciuti due diversi approcci per la valutazione dell'esattezza: 1) confronto con valori certificati forniti dai MRC, oppure, 2) confronto con materiali addizionati con una concentrazione nota dell'analita (in questo caso si usa il termine recupero). La precisione è il grado di concordanza dei risultati ottenuti in misure ripetute nella serie e tra serie diverse; si usa il termine ripetibilità quando la concordanza è tra misure ripetute di aliquote diverse dello stesso campione analizzate con lo stesso strumento, dallo stesso operatore e nelle stesse condizioni operative (temperatura, reagenti, calibranti, ecc.), mentre con riproducibilità si intende la concordanza tra misure effettuate con strumenti diversi, da operatori differenti in condizioni operative diverse. La robustezza è la capacità di un metodo di rimanere inalterato in seguito a variazioni deliberate nel protocollo analitico (94). È necessario individuare le variabili nel metodo che hanno l'effetto più significativo e assicurare che, quando si utilizza il metodo, esse rimangano strettamente sotto controllo. L'incertezza di misura comprende il calcolo di più componenti; talune di queste possono essere valutate dalla distribuzione statistica dei risultati di serie di misure e possono dunque essere caratterizzate mediante scarti tipo sperimentali. Le altre componenti, anch'esse caratterizzabili mediante scarti tipo, sono valutate da distribuzioni di probabilità ipotizzate sulla base dell'esperienza o di informazioni di altro tipo. L'incertezza composta associata al risultato di una misura è ottenuta combinando i valori di tali scarti tipo. Per soddisfare le esigenze di talune applicazioni di carattere industriale e commerciale, così come quelle del settore sanitario e della sicurezza, si ricava poi un'incertezza estesa moltiplicando l'incertezza tipo composta per un fattore di copertura  $k$ , in modo da ottenere un intervallo intorno al risultato di una misurazione comprendente una rilevante porzione della distribuzione dei valori che si possono ragionevolmente attribuire al misurando. La scelta del fattore  $k$ , solitamente compreso tra 2 e 3, è basata sulla probabilità di copertura o livello di fiducia richiesto all'intervallo (99). Nonostante queste procedure operative siano ormai da tempo riportate, il loro utilizzo nei laboratori è

raramente attuato per la variabilità delle matrici di prova, la complessità dei metodi analitici, la mancanza di MRC, i costi elevati e la necessità di personale qualificato e formato. Per questi motivi la validazione e la stima dell'incertezza sono ancora poco utilizzati, soprattutto per le laboriose prove intra-laboratorio o gli esercizi interlaboratoriali richiesti. Per semplificare il processo di validazione ci si può concentrare sulle fonti più rilevanti di incertezza trascurandone alcune e/o includendone altre all'interno dei contributi più significativi (102-106). Per esempio, la guida Eurachem/Citac ha stimato che una componente di incertezza non debba essere valutata in dettaglio quando è pari a meno di un terzo della componente principale (99). La ISO/TS 21748 suggerisce di utilizzare i dati dell'accuratezza (o recupero) e della precisione per stimare l'incertezza estesa del metodo, consentendo con tale approccio di effettuare un numero di prove analitiche molto minore (107). Nonostante gli inviti ad applicare queste norme, spesso le procedure analitiche descritte e pubblicate sui VR per i metalli non riportano informazioni relative alle prestazioni del metodo né una stima dell'incertezza associata al risultato. In questo contesto, l'accesso ad informazioni riguardanti i MRC è di estrema importanza e la presenza di una documentazione relativa ai MRC fornisce già un valore di affidabilità ai risultati dello studio stesso. L'altro parametro che dovrebbe essere descritto in uno studio di VR è la precisione definita su livelli differenti di concentrazione dell'analita di interesse; se viene, invece, definita ad un solo livello di concentrazione tale livello dovrebbe essere almeno simile alla quantità presente nei campioni. Altro aspetto essenziale è la descrizione della procedura di controllo (campioni di controllo, carte di controllo, ecc.) incluse le azioni da intraprendere laddove vi siano situazioni di attenzione e/o fuori controllo.

## 5.6. Trattamento dei dati

Nella valutazione dei dati dei VR la forma della distribuzione dei valori osservati deve essere sempre specificata. Spesso è necessaria la trasformazione logaritmica dei risultati di concentrazione dei metalli per ottenere la normalità della distribuzione. In realtà, poche volte si trovano informazioni sulla distribuzione dei dati a causa del limitato numero di osservazioni disponibili. Ma anche nel caso in cui il numero di osservazioni risulti sufficiente, viene rivolta scarsa attenzione alla verifica della distribuzione dei dati e alla sua descrizione. Altre volte, invece, i dati sono trattati come se fossero distribuiti normalmente ma senza che alcun test di normalità sia stato realmente applicato per verificare tale assunzione. Il numero di individui richiesto per il test di normalità deve essere  $> 40$  e oltre se l'intervallo dei valori misurati è molto ampio (85). Se la distribuzione è scodata può essere normalizzata attraverso trasformazione logaritmica e i dati possono essere descritti dalla media geometrica e dalla deviazione standard della media geometrica. È possibile definire differenti tipi di VR sulla base della forma in cui i dati sono espressi, come riportato di seguito (108, 109):

- intervallo di riferimento, che è la media  $\pm 2$  volte la deviazione standard, che comprende il 95% di un insieme di dati distribuiti normalmente o resi normali per trasformazione;
- limite superiore di riferimento che è la media  $+ 2$  volte la deviazione standard dei risultati (normali);
- limite superiore di riferimento che è il 95° percentile della distribuzione, indipendentemente dal tipo di distribuzione;
- limite di riferimento che è il limite più alto dell'intervallo di confidenza per i limiti sopra descritti.

L'ultima opzione è particolarmente idonea perché prende in considerazione l'incertezza sul limite alto con un definito grado di confidenza (es. il 95%); questo approccio è utile quando si ha a che fare con intervalli unidirezionali come nel caso di metalli non essenziali.

## 6. SITUAZIONE ITALIANA: VR DAL 1990 AL 2009

In ambito nazionale le informazioni sui livelli biologici dei contaminanti ambientali nella popolazione sono poco rappresentate e sono limitate ad alcune campagne di sorveglianza della popolazione svolte nell'ambito della medicina occupazionale o del controllo dell'inquinamento ambientale. Per quanto riguarda i metalli, il panorama attuale dell'esposizione della popolazione italiana appare piuttosto frammentario. Tale disomogeneità è dovuta anche all'assenza di coordinamento delle attività che indichi le priorità e che garantisca la qualità delle procedure adottate (dalla selezione dei soggetti alla valutazione dei dati). Per dare conoscenza dei VR per la popolazione italiana, abbiamo raccolto gli studi pubblicati dal 1990 (ad eccezione di qualche lavoro antecedente a questa data) al 2009 sull'argomento, e criticamente valutato i dati applicando i criteri minimi di qualità descritti nei paragrafi 5.2-5.6 di questo rapporto. A tal fine abbiamo considerato solo gli studi progettati secondo un disegno finalizzato alla produzione dei VR, e solo quegli studi che tenevano conto delle principali criticità alla base della produzione dei VR (per esempio, la numerosità del campione, i criteri di selezione della popolazione, le caratteristiche del metodo analitico, ecc.). Ne è emerso che un numero molto esiguo di articoli, solo 12, rispettavano tali criteri e quindi risultavano effettivamente idonei per definire i VR nella popolazione italiana. Nella Tabella 9 sono riportati i dati di tali lavori e dalla loro analisi possono essere tratte alcune importanti considerazioni. In primo luogo, è da notare che i VR prodotti sono limitati a cinque matrici biologiche, ovvero sangue, siero, urina, fluido cerebrospinale (CSF) e latte materno, mentre per nessun metallo sono stati ad oggi definiti i VR in matrici come capelli e unghie. In secondo luogo, le modalità di calcolo dei VR sono diverse da studio a studio (vedi nota della Tabella 9), e ciò ne limita il confronto. Infine, 6 studi su 12 (105, 110-114) forniscono per qualche metallo i cosiddetti VR informativi che rappresentano non un valore valido in maniera assoluta ma un valore comunque applicabile e accettabile come termine di confronto per particolari situazioni. Un VR viene chiamato informativo quando prodotto su un numero limitato di soggetti o quando non si hanno sufficienti informazioni sulle variabili che influenzano il contenuto del metallo e quindi non vengono applicate le necessarie partizioni. Va inoltre considerato che alcuni lavori riportati in Tabella 9 risalgono agli inizi degli anni '90, anni in cui era sicuramente molto difficile che si rispettassero tutte le precauzioni necessarie per un appropriato campionamento e pre-trattamento del campione o si applicassero le idonee procedure di assicurazione qualità sull'intero processo analitico. Per esempio, basti pensare che in quegli anni pochi laboratori usavano cateteri in plastica o aghi siliconati per il prelievo del sangue al fine di limitare la contaminazione da metallo (es. da cobalto, cromo, manganese e nichel), oppure reagenti ad elevato grado di purezza per mineralizzare il campione evitando il pericolo di un apporto esogeno del metallo. Inoltre, pochi laboratori utilizzavano degli ambienti puliti per la preparazione del campione, per esempio quelli di Classe 100 strettamente necessari per la determinazione dei metalli presenti a livello di ultratraccia. Stessa limitata disponibilità vi era per i MRC di matrice simile al campione analitico e contenenti i metalli di interesse e vi erano numerosi limiti per la messa punto di circuiti interlaboratoriali di qualità. Inoltre, è da tenere in considerazione che alcuni VR sono stati prodotti in anni passati quando le uniche tecniche disponibili erano l'AAS e l'NAAS; analisi comparative impiegando altre tecniche (come l'ICP-MS) per metalli presenti in ultratraccia sono casi assai rari. Altro aspetto importante è la variabilità nel tempo di alcuni VR in funzione della variazione della concentrazione del metallo nell'ambiente. Caso ormai conosciuto è quello del piombo, i cui VR prodotti nel 1990 sono molto più alti di quelli prodotti nel 2005 (105, 110). Per tale motivo almeno per questo elemento è consigliabile fare riferimento a dati più recenti, e tale esempio

conferma l'importanza di produrre periodicamente dati di VR al fine di un loro continuo aggiornamento.

Data l'esigua quantità di VR prodotti nel corso degli ultimi due decenni e nell'intento, invece, di dare un quadro più ampio della situazione italiana, abbiamo provato a non utilizzare criteri troppo restrittivi e accettare anche: 1) i lavori non propriamente finalizzati alla produzione dei VR ma che prevedevano un sottogruppo di controllo comunque ben definito; 2) i lavori con una casistica molto esigua laddove venivano studiati metalli ancora poco analizzati e dove venivano trattate matrici di difficile reperibilità (es. il CSF e le unghie). Su questa base, il totale degli studi prodotti in Italia fino ad oggi è risultato essere pari a 36. Considerando che in uno stesso lavoro venivano analizzate più matrici, il numero degli studi disponibili per ciascuna matrice è risultato il seguente: 6 per il sangue, 7 per il siero, 12 per l'urina, 4 per i capelli, 2 per il CSF, 4 per le unghie, e 8 per il latte materno. I dati pubblicati in questi 36 studi Italiani sono stati riportati nelle Tabelle 10-16. Come già detto, anche se la maggior parte di tali dati non rappresentano propriamente dei VR per i metalli, essi sono comunque utili per acquisire informazioni sui livelli presenti nei fluidi e tessuti. Dalle Tabelle emerge che l'urina, com'era da attendersi, è stato il fluido maggiormente studiato grazie alla non invasività del campionamento e al fatto che è la via principale di eliminazione per molti metalli; il sangue è stato oggetto di un buon numero di ricerche probabilmente perché le misure in tale matrice sono rappresentative dell'effettivo carico corporeo del metallo permettendo anche di trarre le prime indicazioni cliniche; anche il latte materno è stato oggetto di numerosi studi essendo l'unica fonte di alimentazione (e quindi di trasferimento del contaminante) per il neonato. Per gli altri fluidi e tessuti la letteratura disponibile è molto limitata, per le ovvie difficoltà di campionamento (CSF, unghie) e di analisi (capelli) (vedi paragrafo 5.2).

In conclusione, la valutazione dei dati esistenti, ha evidenziato ancora una volta come siano molte le criticità che si incontrano nella produzione dei VR e innumerevoli i fattori di variabilità legati ai singoli metalli. La produzione così circoscritta di VR per i metalli è risultata chiaramente subordinata alla mancanza di standardizzazione e armonizzazione delle procedure, di campagne periodiche di BM sulla popolazione e di coordinazione a livello internazionale delle singole esperienze nazionali.

**Tabella 9. Valori di riferimento ( $\mu\text{g/L}$ ) per i metalli proposto per la popolazione italiana nel periodo 1990-2009**

<b>Metallo</b>	<b>Sangue (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>Siero (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>Urina (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>CSF (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>Latte materno (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>	<b>[Bibliografia] Data</b>
Ag	0,13-0,61	0,06-0,3	0,04-0,88	0,03-0,5		[110] 1990 [112] 1992
Al	5,93-33,3	0,3-7,5 0,43-5,29	2,3-19,5		0,09-0,19	[114] 1990 [110] 1990 [115] 2005
As	0,4-11,9		2,3-31,1	0,05-0,5		[110] 1990 [112] 1992
Au			0,001-0,60	0,09-1,25		[110] 1990 [112] 1992
B			490-3.290			[110] 1990
Ba	0,50-2,40	0,32-1,37	0,67-3,68	4,0-39	0,009-0,03	[114] 1990 [112] 1992 [115] 2005 [105] 2005
Be	0,10-0,75	0,03-0,27 0,06-0,43	0,04-0,76			[110] 1990 [115] 2005
Bi	0,12-0,8 0,02-0,06	0,01-0,03	0,8-1,6			[110] 1990 [115] 2005
Br				205-310		[112] 1992
Ca	52.028-87.258	52.577-70.632				[115] 2005
Cd	0,1-1,7 0,14-1,82 0,25-1,97	0,04-0,36 0,03-0,20	0,38-1,34	0,5-2,5	0,001-0,005	[114] 1990 [110] 1990 [112] 1992 [111] 1995 [115] 2005
Ce				0,03-3,4		[112] 1992
Co	0,01-0,91 0,03-0,24	0,08-0,4 0,06-0,42	0,18-0,96	0,1-2,56		[110] 1990 [112] 1992 [115] 2005
Cr	0,01-0,45 0,12-1,07	0,04-0,41 0,07-0,28	0,04-1,50 <0,05-0,24	0,1-0,55	0,007-0,035	[114] 1990 [110] 1990 [112] 1992 [117] 1997 [115] 2005
Cs	0,5-7,0		0,1-17,5 2,00-6,82	0,05-2,0		[110] 1990 [112] 1992 [105] 2005
Cu	807-1.643 686-1.157	601-1.373 648-1.301	4,20-50	13,5-60	0,26-0,54	[114] 1990 [110] 1990 [112] 1992 [115] 2005
Fe	453.519-646.491	886-2.455		100-720	0,58-0,99	[114] 1990 [112] 1992 [115] 2005
Hf				0,015-0,05		[112] 1992
Hg	1,7-9,9	0,6-3,8	0,1-6,9	0,15-2,2		[110] 1990 [112] 1992
			0,12-5,02a 0,21-3,20a			[118] 2002 [119] 2003
	1,97-14,5	0,32-2,75				[115] 2005
La				0,04-0,22		[112] 1992

*segue*

continua

Metallo	Sangue (µg/L)	Siero (µg/L)	Urina (µg/L)	CSF (µg/L)	Latte materno (µg/g)	[Bibliografia] Data
Li	0,20-1,87	0,36-2,20			0,003-0,005	[114] 1990 [115] 2005
Lu	0,0002-0,5			0,02-0,7		[110] 1990 [112] 1992
Mg	32.824-49.276	14.643-20.255			24,3-34,8	[114] 1990 [115] 2005
Mn	7,1-10,5 1,53-13,2	0,3-0,9 0,31-1,02	0,12-1,90		0,006-0,011	[114] 1990 [110] 1990 [115] 2005
Mo	1,02-6,03	0,19-1,69		1,0-7,5		[112] 1992 [115] 2005
Nd				1,0-4,0		[112] 1992
Ni	0,14-2,13	0,24-2,8 0,10-1,25 0,26-0,75	0,06-1,74		0,02-0,61	[114] 1990 [110] 1990 [115] 2005 [113] 2006
Pb	39,7-276 50,1-110,0 12,8-79,5	0,1-0,5 0,20-0,98	12-27		0,006-0,025	[114] 1990 [110] 1990 [120] 1991 [115] 2005
Rb	900-4.145	78-317	284-4.096	33,5-75		[110] 1990 [112] 1992
Sb	0,07-0,94	0,02-0,22	0,19-1,10 0,02-0,12	0,15-0,75		[110] 1990 [112] 1992 [115] 2005 [105] 2005
Sc	0,002-0,12			0,005-0,08		[110] 1990 [112] 1992
Se	76-140	56-105	2,1-30,9	0,2-5,0		[110] 1990 [112] 1992
Si	85,4-277	46,9-245	2.900-12.100			[110] 1990 [115] 2005
Sm				0,002-0,09		[112] 1992
Sn	0,63-2,61	0,27-1,69		7-38		[112] 1992 [115] 2005
Sr	10,1-50,3	23,0-61,5		11-68		[112] 1992 [115] 2005
Ta				0,03-0,3		[112] 1992
Tb				0,02-0,06		[112] 1992
Th				0,03-0,15		[112] 1992
Tl	0,15-0,63 0,01-0,19 0,03-0,15	0,02-0,34 0,02-0,09	0,07-0,7 0,02-0,17			[110] 1990 [121] 1994 [115] 2005
V	0,09-0,75 0,03-0,18	0,07-1,1 0,03-0,11	0,2-1,0			[110] 1990 [115] 2005
W	0,03-0,14	0,01-0,06	0,015-0,15			[115] 2005 [105] 2005
Yb				0,01-0,022		[112] 1992
Zn	4.076-7.594 5.189-8.337	587-1.215 597-1.028	266-846	8,0-85	1,53-4,63	[114] 1990 [110] 1990 [112] 1992 [115] 2005
Zr	0,20-0,95	0,04-0,19				[115] 2005

<sup>a</sup>: µg/g creatinina. **Simboli dei metalli:** Ag (argento), Al (alluminio), As (arsenico), Au (oro), B (boro), Ba (bario), Be (berillio), Bi (bismuto), Br (bromo), Ca (calcio), Cd (cadmio), Ce (cerio), Co (cobalto), Cr (cromo), Cs (cesio), Cu (rame), Fe (ferro), Hf (afnio), Hg (mercurio), La (lantanio), Li (litio), Lu (lutezio), Mg (magnesio), Mn (manganese), Mo

(molibdeno), Nd (neodimio), Ni (nicel), Pb (piombo), Rb (rubidio), Sb (antimonio), Sc (scandio), Se (selenio), Si (silicio), Sm (samario), Sn (stagno), Sr (stronzio), Ta (tantalio), Tb (terbio), Th (torio), Tl (tallio), V (vanadio), W (tungsteno), Yb (itterbio), Zn (zinco), Zr (zirconio). **Informazioni sulle fonti bibliografiche:** [105]: VR informativi (n. di soggetti 50); regione: Emilia Romagna; modalità di calcolo: 10°-90° percentile. [110]: VR informativi per Cs, Lu, Mn, Rb, Sc e V (n. di soggetti < 67); regione: Lombardia; modalità di calcolo: media  $\pm$  2 ds. [111]: regione: Lombardia; modalità di calcolo: MG diviso la DSMG al quadrato ( $DSMG^2$ ) (per il limite inferiore) e la MG x  $DSMG^2$  (per il limite superiore). [112]: VR informativi (n. dei soggetti < 23); regione: Lombardia; modalità di calcolo: media  $\pm$  2 ds. [113]: VR informativi (n. di soggetti 50); regione: Emilia Romagna; modalità di calcolo: 5°-95° percentile. [114]: VR informativi (n. dei soggetti 36); modalità di calcolo: 25°-75° percentile. [115]: regione: Lazio; modalità di calcolo: 5°-95° percentile. [117]: regioni: Friuli Venezia Giulia, Puglia, Toscana, Trentino Alto Adige, Umbria, Veneto; modalità di calcolo: 5°-95° percentile. [118]: regione: Liguria, Lombardia, Puglia, Toscana; modalità di calcolo: 5°-95° percentile. [119]: regioni: Liguria, Lombardia, Puglia, Toscana; modalità di calcolo: 5°-95° percentile. [120]: regione: Puglia; modalità di calcolo: 25°-75° percentile. [121]: VR informativi (n. dei soggetti 123); regione: Marche; modalità di calcolo: media geometrica (MG)  $\pm$  ds sulla MG (DSMG).

Tabella 10. Concentrazione dei metalli nel sangue

Metallo	N. soggetti	Media $\pm$ ds ( $\mu\text{g/L}$ )	Percentili ( $\mu\text{g/L}$ )		Tecnica analitica	[Bibliografia] Data
			25°	75°		
Ag	437	0,37 $\pm$ 0,07			AAS, ICP-AES, NAA	[110] 1990
Al	110	17,0 $\pm$ 9,37	9,68	21,2	ICP-MS	[115] 2005
	52	15,6 $\pm$ 6,6			ICP-MS	[122] 2009
As	470	7,9 $\pm$ 1,75			AAS, ICP-AES, NAA	[110] 1990
Au	35	0,045 $\pm$ 0,001	9,25	19,7	NAA	[110] 1990
Ba	110	1,25 $\pm$ 0,61	0,80	1,66	ICP-MS	[115] 2005
	52	0,84 $\pm$ 0,56			ICP-MS	[122] 2009
Be	110	0,42 $\pm$ 0,19	0,28	0,51	ICP-MS	[115] 2005
Bi	358	0,49 $\pm$ 0,023			AAS	[110] 1990
	110	0,03 $\pm$ 0,02	0,02	0,04		[115] 2005
Ca	110	66.332 $\pm$ 10.817	59.028	72.193	ICP-AES	[115] 2005
	52	56.800 $\pm$ 8.920			ICP-MS	[122] 2009
Cd	900	0,6 $\pm$ 0,3			AAS, ICP-AES, NAA	[110] 1990
	514	0,62 $\pm$ 0,48			AAS	[111] 1995
	110	0,99 $\pm$ 0,51	0,59	1,32	ICP-MS	[115] 2005
	52	1,09 $\pm$ 0,71			ICP-MS	[122] 2009
Ce	12	3,1 $\pm$ 2,15			NAA	[110] 1990
Co	441	0,39 $\pm$ 0,13			AAS, NAA	[110] 1990
	110	0,12 $\pm$ 0,08	0,06	0,15	ICP-MS	[115] 2005
	52	0,23 $\pm$ 0,13			ICP-MS	[122] 2009
Cr	519	0,23 $\pm$ 0,01			AAS	[110] 1990
	110	0,44 $\pm$ 0,27	0,26	0,55	ICP-MS	[115] 2005
	52	0,78 $\pm$ 0,56			ICP-MS	[122] 2009
Cs	62	3,0 $\pm$ 0,52			NAA	[110] 1990
	52	11,6 $\pm$ 5,8			ICP-MS	[122] 2009
Cu	475	1.225 $\pm$ 64,3			AAS, ICP-AES, NAA	[110] 1990
	110	938 $\pm$ 141	854	1.025	ICP-AES	[115] 2005
	52	943 $\pm$ 5,8			ICP-MS	[122] 2009
Eu	15	0,21 $\pm$ 0,08			NAA	[110] 1990
Fe	110	549.839 $\pm$ 60.937	510.018	583.334	ICP-AES	[115] 2005
	52	532.000 $\pm$ 63.000			ICP-MS	[122] 2009
Ga	5	0,26 $\pm$ 0,16			NAA	[110] 1990
Hf	29	0,21 $\pm$ 0,06			NAA	[110] 1990
Hg	368	5,3 $\pm$ 0,395			AAS, ICP-AES, NAA	[110] 1990
	110	6,36 $\pm$ 4,11	3,33	8,75	ICP-MS	[115] 2005
	52	3,49 $\pm$ 1,53			ICP-MS	[122] 2009
Ir	22	0,0074 $\pm$ 0,004			NAA	[110] 1990
La	21	1,42 $\pm$ 0,71			NAA	[110] 1990
Li	110	0,86 $\pm$ 0,54	0,46	1,19	ICP-MS	[115] 2005
	52	0,55 $\pm$ 0,28			ICP-MS	[122] 2009
Lu	42	0,2 $\pm$ 0,09			NAA	[110] 1990
Mg	110	40.420 $\pm$ 5.309	36.951	43.276	ICP-AES	[115] 2005
	52	40.200 $\pm$ 6.040			ICP-MS	[122] 2009
Mn	88	8,8 $\pm$ 0,2			AAS, ICP-AES	[110] 1990
	110	7,70 $\pm$ 3,13	5,93	9,50	ICP-MS	[115] 2005
	52	7,63 $\pm$ 2,41			ICP-MS	[122] 2009
Mo	110	3,06 $\pm$ 1,57	1,83	4,11	ICP-MS	[115] 2005
	52	2,90 $\pm$ 1,29			ICP-MS	[122] 2009
Nd	13	1,39 $\pm$ 0,82			NAA	[110] 1990
Ni	110	0,89 $\pm$ 0,61	0,43	1,21	ICP-MS	[115] 2005
	52	0,75 $\pm$ 0,73			ICP-MS	[122] 2009

segue

continua

Metallo	N. soggetti	Media $\pm$ ds ( $\mu\text{g/L}$ )	Percentili ( $\mu\text{g/L}$ )		Tecnica analitica	[Bibliografia] Data
			25°	75°		
Pb	959	157,7 $\pm$ 9,9			AAS, ICP-AES	[110] 1990
	720	84 $\pm$ 45			AAS	[120] 1991
	110	39,5 $\pm$ 20,2	25,3	50,5	ICP-MS	[115] 2005
	52	26,4 $\pm$ 14,5			ICP-MS	[122] 2009
Rb	67	2.805 $\pm$ 408			NAA	[110] 1990
Sb	110	0,47 $\pm$ 0,26	0,29	0,66	ICP-MS	[115] 2005
Sc	40	0,06 $\pm$ 0,015			NAA	[110] 1990
Se	455	107 $\pm$ 6,4			AAS, ICP-AES, NAA	[110] 1990
	52	91,3 $\pm$ 30,6			ICP-MS	[122] 2009
Si	110	160 $\pm$ 68	112	197	ICP-MS	[115] 2005
Sm	10	0,26 $\pm$ 0,14			NAA	[110] 1990
Sn	110	1,51 $\pm$ 0,60	1,10	1,82	ICP-MS	[115] 2005
	52	0,99 $\pm$ 0,42			ICP-MS	[122] 2009
Sr	110	27,3 $\pm$ 11,8	19,6	34,9	ICP-MS	[115] 2005
	52	26,6 $\pm$ 7,73			ICP-MS	[122] 2009
Ta	20	0,23 $\pm$ 0,09			NAA	[110] 1990
Th	17	0,21 $\pm$ 0,1			NAA	[110] 1990
Tl	418	0,39 $\pm$ 0,05			AAS	[110] 1990
	123	0,06 $\pm$ 0,036			ICP-MS	[121] 1994
	110	0,07 $\pm$ 0,04	0,05	0,10	ICP-MS	[115] 2005
U	17	< 0,1			NAA	[110] 1990
V	65	0,35 $\pm$ 0,11			NAA	[110] 1990
	110	0,09 $\pm$ 0,05	0,05	0,11	ICP-MS	[115] 2005
	52	0,15 $\pm$ 0,07			ICP-MS	[122] 2009
W	110	0,07 $\pm$ 0,03	0,04	0,09	ICP-MS	[115] 2005
Yb	7	0,15 $\pm$ 0,08			NAA	[110] 1990
Zn	502	6.340 $\pm$ 210			AAS, ICP-AES, NAA	[110] 1990
	110	6.717 $\pm$ 924	6.134	7.365	ICP-AES	[115] 2005
	52	5.955 $\pm$ 807			ICP-MS	[122] 2009
Zr	110	0,49 $\pm$ 0,24	0,32	0,62	ICP-MS	[115] 2005

Simboli dei metalli: vedi Tabella 9; Eu (europio), Ga (gallio), Ir (iridio), U (uranio).

Tabella 11. Concentrazione dei metalli nel siero

Metallo	N. soggetti	Media $\pm$ ds ( $\mu\text{g/L}$ )	Percentili ( $\mu\text{g/L}$ )		Tecnica analitica	[Bibliografia] Data
			25°	75°		
Ag	394	0,18 $\pm$ 0,04			AAS, ICP-AES, NAA	[110] 1990
Al	916	6,01 $\pm$ 0,36			AAS, ICP-AES	[110] 1990
	110	2,33 $\pm$ 1,51	1,17	3,09	ICP-MS	[115] 2005
	52	4,55 $\pm$ 1,73			ICP-MS	[122] 2009
Au	22	0,01 $\pm$ 0,003			NAA	[110] 1990
Ba	110	0,67 $\pm$ 0,33	0,43	0,87	ICP-MS	[115] 2005
	52	0,61 $\pm$ 0,27			ICP-MS	[122] 2009
Be	398	0,15 $\pm$ 0,006			AAS, ICP-AES	[110] 1990
	110	0,21 $\pm$ 0,12	0,13	0,31	ICP-MS	[115] 2005
Bi	110	0,02 $\pm$ 0,01	0,01	0,02	ICP-MS	[115] 2005
Ca	110	63.055 $\pm$ 5.858	59.035	67.702	ICP-AES	[115] 2005
	52	88.300 $\pm$ 10.740			ICP-MS	[122] 2009
Cd	360	0,2 $\pm$ 0,008			AAS, ICP-AES	[110] 1990
	45 ♀	0,12 $\pm$ 0,075			AAS	[123] 2002
	110	0,10 $\pm$ 0,05	0,06	0,12	ICP-MS	[115] 2005
	52	0,07 $\pm$ 0,03			ICP-MS	[122] 2009
Co	405	0,21 $\pm$ 0,01			AAS, NAA	[110] 1990
	110	0,19 $\pm$ 0,11	0,10	0,25	ICP-MS	[115] 2005
	52	0,14 $\pm$ 0,08			ICP-MS	[122] 2009
Cr	530	0,17 $\pm$ 0,01			AAS, NAA	[110] 1990
	110	0,16 $\pm$ 0,07	0,11	0,19	ICP-MS	[115] 2005
	52	0,17 $\pm$ 0,09			ICP-MS	[122] 2009
Cs	25	1,5 $\pm$ 0,12			NAA	[110] 1990
	52	3,47 $\pm$ 1,92			ICP-MS	[122] 2009
Cu	901	985 $\pm$ 36			AAS, ICP-AES, NAA	[110] 1990
	107	1.060 $\pm$ 270			AAS	[124] 1991
	110	947 $\pm$ 238	776	1.072	ICP-AES	[115] 2005
	52	1.088 $\pm$ 230			ICP-MS	[122] 2009
Fe	110	1.688 $\pm$ 493	1.396	2.087	ICP-AES	[115] 2005
	52	1.418 $\pm$ 537			ICP-MS	[122] 2009
Hg	349	2,1 $\pm$ 0,082			AAS, ICP-AES, NAA	[110] 1990
	110	1,32 $\pm$ 0,72	0,80	1,70	ICP-MS	[115] 2005
	52	1,33 $\pm$ 0,65			ICP-MS	[122] 2009
Ir	8	0,005 $\pm$ 0,001			NAA	[110] 1990
La	12	< 1			NAA	[110] 1990
Li	110	1,09 $\pm$ 0,63	0,62	1,54	ICP-MS	[115] 2005
	52	0,79 $\pm$ 0,6			ICP-MS	[122] 2009
Lu	14	< 0,05			NAA	[110] 1990
Mg	110	17.603 $\pm$ 1.779	16.485	19.030	ICP-AES	[115] 2005
	52	19.300 $\pm$ 2.740			ICP-MS	[122] 2009
Mn	414	0,6 $\pm$ 0,014			AAS, ICP-AES	[110] 1990
	110	0,62 $\pm$ 0,23	0,46	0,71	ICP-MS	[115] 2005
	52	0,59 $\pm$ 0,17			ICP-MS	[122] 2009
Mo	110	0,86 $\pm$ 0,46	0,50	1,15	ICP-MS	[115] 2005
	52	0,85 $\pm$ 0,27			ICP-MS	[122] 2009
Ni	385	1,2 $\pm$ 0,079			AAS, ICP-AES	[110] 1990
	110	0,46 $\pm$ 0,36	0,17	0,63	ICP-MS	[115] 2005
	50	0,47 $\pm$ 0,16			ICP-MS	[113] 2006
	52	0,68 $\pm$ 0,39			ICP-MS	[122] 2009
Pb	228	0,3 $\pm$ 0,023			AAS, ICP-AES	[110] 1990
	110	0,54 $\pm$ 0,25	0,34	0,69	ICP-MS	[115] 2005
	52	0,24 $\pm$ 0,15			ICP-MS	[122] 2009

segue

continua

Metallo	N. soggetti	Media $\pm$ ds ( $\mu\text{g/L}$ )	Percentili ( $\mu\text{g/L}$ )		Tecnica analitica	[Bibliografia] Data
			25°	75°		
Rb	57	230 $\pm$ 48			NAA	[110] 1990
	75	350 $\pm$ 74			AAS	[126] 2001
Sb	22	0,5 $\pm$ 0,1			AAS, ICP-AES	[110] 1990
	110	0,10 $\pm$ 0,07	0,06	0,14	ICP-MS	[115] 2005
Sc	24	0,04 $\pm$ 0,01			NAA	[110] 1990
Se	441	81 $\pm$ 1,12			AAS, ICP-AES, NAA	[110] 1990
	52	106 $\pm$ 33			ICP-MS	[122] 2009
Si	110	132 $\pm$ 63	82,2	160	ICP-AES	[115] 2005
Sn	52	2,34 $\pm$ 1,31			ICP-MS	[122] 2009
	110	0,69 $\pm$ 0,43	0,35	0,94	ICP-MS	[115] 2005
Sr	110	39,4 $\pm$ 13,1	28,7	46,2	ICP-MS	[115] 2005
	52	37,6 $\pm$ 12,9			ICP-MS	[122] 2009
Ta	16	< 0,1			NAA	[110] 1990
Th	13	< 0,1			NAA	[110] 1990
Tl	360	0,18 $\pm$ 0,009			AAS	[110] 1990
	110	0,04 $\pm$ 0,02	0,03	0,06	ICP-MS	[115] 2005
V	415	0,62 $\pm$ 0,03			AAS, ICP-AES	[110] 1990
	110	0,06 $\pm$ 0,03	0,04	0,08	ICP-MS	[115] 2005
	52	0,08 $\pm$ 0,05			ICP-MS	[122] 2009
W	10	0,045 $\pm$ 0,01			NAA	[110] 1990
	110	0,03 $\pm$ 0,02	0,02	0,05	ICP-MS	[115] 2005
Zn	682	922 $\pm$ 68			AAS, ICP-AES, NAA	[110] 1990
	107	1.110 $\pm$ 380			AAS	[124] 1991
	110	812 $\pm$ 131	717	899	ICP-AES	[115] 2005
	52	1.107 $\pm$ 267			ICP-MS	[122] 2009
Zr	110	0,11 $\pm$ 0,05	0,08	0,14	ICP-MS	[115] 2005

Simboli dei metalli: vedi Tabelle 9 e 10.

Tabella 12. Concentrazione dei metalli in urina

Metallo	N. soggetti	Media $\pm$ ds ( $\mu\text{g/L}$ )	Percentili ( $\mu\text{g/L}$ )		Tecnica analitica	[Bibliografia] Data
			25°	75°		
Ag	472	0,46 $\pm$ 0,12			AAS, ICP-AES, NAA	[110] 1990
Al	766	10,9 $\pm$ 1,06			AAS, ICP-AES	[110] 1990
	52	5,36 $\pm$ 3,76			ICP-MS	[122] 2009
As	540	16,7 $\pm$ 1,9			AAS, ICP-AES, NAA	[110] 1990
Au	43	0,07 $\pm$ 0,068			NAA	[110] 1990
B	119	1.890 $\pm$ 126			ICP-AES	[110] 1990
Ba	35	2,7 $\pm$ 0,5			AAS, ICP-AES, NAA	[110] 1990
	50	1,77 $\pm$ 1,30			ICP-MS	[105] 2005
	52	1,24 $\pm$ 0,78			ICP-MS	[122] 2009
Be	579	0,4 $\pm$ 0,09			AAS, ICP-AES	[110] 1990
Bi	368	1,2 $\pm$ 0,02			AAS, ICP-AES	[110] 1990
Ca	52	99.400 $\pm$ 68.000			ICP-MS	[122] 2009
Cd	392	0,86 $\pm$ 0,06			AAS, ICP-AES	[110] 1990
	52	0,81 $\pm$ 0,53			ICP-MS	[122] 2009
Ce	23	3,1 $\pm$ 1,95			NAA	[110] 1990
Co	468	0,57 $\pm$ 0,1			AAS, ICP-AES, NAA	[110] 1990
	52	0,24 $\pm$ 0,18			ICP-MS	[122] 2009
Cr	879	0,61 $\pm$ 0,11			AAS, ICP-AES, NAA	[110] 1990
	233	0,06 $\pm$ 1,94 <sup>a</sup>	<0,05	0,09	AAS	[117] 1997
	657	0,08 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	<0,05	0,13	AAS	[117] 1997
	52	0,21 $\pm$ 0,11			ICP-MS	[122] 2009
Cs	70	8,1 $\pm$ 1,5			NAA	[110] 1990
	50	4,52 $\pm$ 2,24			ICP-MS	[105] 2005
	52	12,9 $\pm$ 8,3			ICP-MS	[122] 2009
Cu	507	23 $\pm$ 6,9			AAS, ICP-AES, NAA	[110] 1990
	52	12,9 $\pm$ 7,0			ICP-MS	[122] 2009
Eu	13	0,11 $\pm$ 0,08			NAA	[110] 1990
Ga	10	< 0,5			NAA	[110] 1990
Gd	26	< 1			AAS, ICP-AES	[110] 1990
Fe	52	8,70 $\pm$ 6,27			ICP-MS	[122] 2009
Hf	16	0,49 $\pm$ 0,22			NAA	[110] 1990
Hg	380	3,5 $\pm$ 0,2			AAS, ICP-AES, NAA	[110] 1990
	374	1,15 $\pm$ 1,03b			AAS	[119] 2003
	400	1,25 $\pm$ 1,50b			HG-AAS	[118] 2002
	400	1,38 $\pm$ 2,06b			FI-ICP-MS	[118] 2002
	52	1,92 $\pm$ 1,60			ICP-MS	[122] 2009
In	42	< 0,15			NAA	[110] 1990
Ir	17	0,02 $\pm$ 0,01			NAA	[110] 1990
	118 ♂	0,01 $\pm$ 0,01b	0,004b	0,01b	ICP-MS	[127] 2006
La	28	0,73 $\pm$ 0,55			NAA	[110] 1990
Li	52	17,3 $\pm$ 13,6			ICP-MS	[122] 2009
Lu	16	0,05 $\pm$ 0,04			NAA	[110] 1990
Mg	52	54.900 $\pm$ 27.400			ICP-MS	[122] 2009
Mn	777	1,02 $\pm$ 0,05			AAS, ICP-AES	[110] 1990
	52	0,22 $\pm$ 0,10			ICP-MS	[122] 2009
Mo	52	36,9 $\pm$ 16,9			ICP-MS	[122] 2009
Nd	15	3,84 $\pm$ 1,9			NAA	[110] 1990
Ni	878	0,9 $\pm$ 0,11			AAS, ICP-AES	[110] 1990
	52	0,87 $\pm$ 0,50			ICP-MS	[122] 2009
Pb	456	17 $\pm$ 0,46			AAS, ICP-AES	[110] 1990
	852	1,80 $\pm$ 1,40			ICP-MS	[122] 2009

segue

continua

Metallo	N. soggetti	Media $\pm$ ds ( $\mu\text{g/L}$ )	Percentili ( $\mu\text{g/L}$ )		Tecnica analitica	[Bibliografia] Data
			25°	75°		
Pd	136	< 0,15			AAS, ICP-AES	[110] 1990
	58 ♂	0,012 $\pm$ 0,007b	0,006b	0,02b	ICP-MS	[128] 2007
	157	0,008 $\pm$ 0,005			ICP-MS	[68] 2004
Pt	25	< 1			AAS, ICP-AES	[110] 1990
	58	0,005 $\pm$ 0,003			ICP-MS	[129] 2004
	50	0,005 $\pm$ 0,005			ICP-MS	[73] 2005
	58 ♂	0,002 $\pm$ 0,003b	0,0005b	0,002b	ICP-MS	[128] 2007
	157	0,002 $\pm$ 0,003			ICP-MS	[68] 2004
Rb	87	2.190 $\pm$ 203			NAA	[110] 1990
Rh	58 ♂	0,01 $\pm$ 0,009b	0,005b	0,02b	ICP-MS	[128] 2007
	157	0,015 $\pm$ 0,01			ICP-MS	[68] 2004
Sb	360	0,79 $\pm$ 0,07			AAS, ICP-AES, NAA	[110] 1990
	50	0,07 $\pm$ 0,04			ICP-MS	[105] 2005
Sc	28	0,04 $\pm$ 0,18			NAA	[110] 1990
Se	484	22,1 $\pm$ 2,4			AAS, ICP-AES, NAA	[110] 1990
	52	33,5 $\pm$ 15,0			ICP-MS	[122] 2009
Si	92	7.500 $\pm$ 470			AAS, ICP-AES	[110] 1990
Sm	19	0,05 $\pm$ 0,04			NAA	[110] 1990
Sn	52	0,90 $\pm$ 0,64			ICP-MS	[122] 2009
Sr	52	154 $\pm$ 91			ICP-MS	[122] 2009
Ta	16	0,16 $\pm$ 0,12			NAA	[110] 1990
Te	20	< 1			AAS, ICP-AES	[110] 1990
Th	25	0,085 $\pm$ 0,04			NAA	[110] 1990
Ti	18	2,1 $\pm$ 0,19			AAS, ICP-AES	[110] 1990
Tl	496	0,42 $\pm$ 0,09			AAS	[110] 1990
	123	0,07 $\pm$ 0,03			ICP-MS	[121] 1994
U	14	< 0,1			NAA	[110] 1990
V	382	0,8 $\pm$ 0,08			AAS, ICP-AES	[110] 1990
	52	0,14 $\pm$ 0,11			ICP-MS	[122] 2009
W	11	0,32 $\pm$ 0,19			NAA	[110] 1990
	50	0,08 $\pm$ 0,08			ICP-MS	[105] 2005
Yb	6	0,03 $\pm$ 0,02			NAA	[110] 1990
Zn	683	456 $\pm$ 58			AAS, ICP-AES, NAA	[110] 1990
	52	356 $\pm$ 236			ICP-MS	[122] 2009
Zr	30	< 2			AAS, ICP-AES	[110] 1990

<sup>a</sup>: media geometrica  $\pm$  ds della media geometrica; <sup>b</sup>:  $\mu\text{g/g}$  di creatinina. **Simboli dei metalli:** vedi Tabelle 9 e 10; Pd (palladio), Pt (platino); Rh (rodio); Te (tellurio); Ti (titanio).

Tabella 13. Concentrazione dei metalli nei capelli

Metallo	N. soggetti	Media $\pm$ ds ( $\mu\text{g/L}$ )	Min ( $\mu\text{g/g}$ )	Max ( $\mu\text{g/g}$ )	Tecnica analitica	[Bibliografia] Data
Al	18	3,24 $\pm$ 1,32			ICP-MS	[125] 2006
As	40	0,08 <sup>a</sup>	0,003	0,52	ICP-MS	[130] 1994
Ca	8 ♀	512 $\pm$ 212			ICP-MS	[125] 2006
	10 ♂	356 $\pm$ 227			ICP-MS	[125] 2006
Cd	40	0,05 <sup>a</sup>	0,004	0,40	ICP-MS	[130] 1994
Co	40	0,01 <sup>a</sup>	0,001	0,28	ICP-MS	[130] 1994
Cr	40	0,68 <sup>a</sup>	0,43	1,77	ICP-MS	[130] 1994
Cu	168 ♂ <sup>b</sup>	15,4 $\pm$ 0,88			AAS	[131] 1996
	174 ♀ <sup>b</sup>	15,7 $\pm$ 0,67			AAS	[131] 1996
	107	15,9 $\pm$ 13,1			AAS	[124] 1991
	18	7,48 $\pm$ 3,41			ICP-MS	[125] 2006
Fe	18	13,1 $\pm$ 7,11			ICP-MS	[125] 2006
Mg	18	43,3 $\pm$ 29,1			ICP-AES	[125] 2006
Mn	18	0,28 $\pm$ 0,20			ICP-MS	[125] 2006
Ni	40	0,38 <sup>a</sup>	0,03	4,94	ICP-MS	[130] 1994
Pb	40	1,92 <sup>a</sup>	0,26	24,4	ICP-MS	[130] 1994
Zn	18	131 $\pm$ 47			ICP-AES	[125] 2006
	168 ♂ <sup>b</sup>	221 $\pm$ 8,19			AAS	[124] 1996
	174 ♀ <sup>b</sup>	223 $\pm$ 8,51			AAS	[124] 1996
	77	166 $\pm$ 32,8			AAS	[124] 1991

<sup>a</sup>: media geometrica; <sup>b</sup>: soggetti tra 20 e 40 anni. **Simboli dei metalli**: vedi Tabella 9.

Tabella 14. Concentrazione dei metalli nel fluido cerebrospinale (CSF)

Metallo	N. soggetti	Media $\pm$ ds ( $\mu\text{g/L}$ )	Min ( $\mu\text{g/L}$ )	Max ( $\mu\text{g/L}$ )	Tecnica analitica	[Bibliografia] Data
Ag	14	0,09 $\pm$ 0,05	0,03	0,05	NAA	[112] 1992
Al	20	2,64 $\pm$ 0,51			ICP-MS	[132] 2007
As	4	0,21 $\pm$ 0,15	0,05	0,5	NAA	[112] 1992
Au	4	0,55 $\pm$ 0,46	0,09	1,25	NAA	[112] 1992
Ba	12	18 $\pm$ 7	4	39	AAS	[112] 1992
	20	0,35 $\pm$ 0,15			ICP-MS	[132] 2007
Be	20	0,70 $\pm$ 0,37			ICP-MS	[132] 2007
Bi	20	0,10 $\pm$ 0,07			ICP-MS	[132] 2007
Br	4	259 $\pm$ 61	205	310	NAA	[112] 1992
Ca	20	26.956 $\pm$ 5.515			ICP-MS	[132] 2007
Cd	11	1,7 $\pm$ 0,8	0,5	2,5	RNAA	[112] 1992
	20	0,05 $\pm$ 0,03			ICP-MS	[132] 2007
Ce	8	1,6 $\pm$ 0,7	0,03	3,4	NAA	[112] 1992
Co	15	0,81 $\pm$ 0,3	0,1	2,56	NAA	[112] 1992
	20	0,13 $\pm$ 0,05			ICP-MS	[132] 2007
Cr	12	0,31 $\pm$ 0,15	0,1	0,55	NAA	[112] 1992
	20	1,28 $\pm$ 0,59			ICP-MS	[132] 2007
Cs	15	0,84 $\pm$ 0,31	0,05	2	NAA	[112] 1992
Cu	9	36,7 $\pm$ 18	13,5	60	NAA	[112] 1992
	20	21,9 $\pm$ 4,77			ICP-MS	[132] 2007
Eu	7	<0,24			NAA	[112] 1992
Fe	14	318 $\pm$ 96	100	720	NAA	[112] 1992
	20	35,5 $\pm$ 5,03			ICP-MS	[132] 2007
Ga	4	< 0,1			NAA	[112] 1992
Hf	7	0,035 $\pm$ 0,015	0,015	0,05	NAA	[112] 1992
Hg	11	0,82 $\pm$ 0,43	0,15	2,2	NAA	[112] 1992
	20	1,05 $\pm$ 0,46			ICP-MS	[132] 2007
Ir	10	> 0,007			NAA	[112] 1992
La	4	0,1 $\pm$ 0,06	0,04	0,22	NAA	[112] 1992
Li	20	0,52 $\pm$ 0,13			ICP-MS	[132] 2007
Lu	7	0,02 $\pm$ 0,01	0,02	0,07	NAA	[112] 1992
Mg	20	21.868 $\pm$ 3.509			ICP-MS	[132] 2007
Mn	18	0,95 $\pm$ 0,39			ICP-MS	[132] 2007
Mo	6	3,3 $\pm$ 2	1	7,5	NAA	[112] 1992
	20	0,45 $\pm$ 0,27			ICP-MS	[132] 2007
Nd	5	1,3 $\pm$ 0,2	1	4	NAA	[112] 1992
Ni	4	< 0,25			NAA	[112] 1992
	20	5,40 $\pm$ 3,33			ICP-MS	[132] 2007
Pb	20	0,91 $\pm$ 0,36			ICP-MS	[132] 2007
Rb	21	52,7 $\pm$ 10,8	33,5	75	NAA	[112] 1992
Sb	16	0,44 $\pm$ 0,2	0,15	0,75	NAA, AAS	[112] 1992
	20	0,08 $\pm$ 0,02			ICP-MS	[132] 2007
Sc	11	0,026 $\pm$ 0,01	0,005	0,08	NAA	[112] 1992
Se	8	1,7 $\pm$ 1,2	0,2	5	NAA	[112] 1992
Si	20	0,08 $\pm$ 0,02			ICP-MS	[132] 2007
Sm	8	0,05 $\pm$ 0,03	0,002	0,09	NAA	[112] 1992
Sn	4	11 $\pm$ 3	7	38	AAS	[112] 1992
	20	0,32 $\pm$ 0,07			ICP-MS	[132] 2007
Sr	8	47 $\pm$ 7	11	68	AAS	[112] 1992
	20	30 $\pm$ 8,69			ICP-MS	[132] 2007
Ta	15	0,11 $\pm$ 0,09	0,035	0,3	NAA	[112] 1992
Tb	4	0,035 $\pm$ 0,03	0,02	0,06	NAA	[112] 1992

segue

*continua*

<b>Metallo</b>	<b>N. soggetti</b>	<b>Media <math>\pm</math> ds (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>Min (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>Max (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>Tecnica analitica</b>	<b>[Bibliografia] Data</b>
Th	8	0,08 $\pm$ 0,03	0,03	0,15	NAA	[112] 1992
Tl	20	0,01 $\pm$ 0,01			ICP-MS	[132] 2007
U	8	< 1,5			NAA	[112] 1992
	20	26.956 $\pm$ 5.515			ICP-MS	[132] 2007
W	4	> 1			NAA	[112] 1992
	20	0,04 $\pm$ 0,02			ICP-MS	[132] 2007
Yb	4	0,015 $\pm$ 0,05	0,01	0,022	NAA	[112] 1992
Zn	23	42,4 $\pm$ 13,2	8	85	NAA, AAS	[112] 1992
	20	32,3 $\pm$ 11,4			ICP-MS	[132] 2007
Zr	4	< 25			NAA	[112] 1992
	20	0,06 $\pm$ 0,05			ICP-MS	[132] 2007

**Simboli dei metalli:** vedi Tabelle 9 e 10.

Tabella 15. Concentrazione dei metalli nelle unghie

Metallo	N. soggetti	Media $\pm$ ds ( $\mu\text{g/g}$ )	Percentili ( $\mu\text{g/g}$ )		Tecnica analitica	[Bibliografia] Data
			25°	75°		
Al	40	37,5 <sup>a</sup>	22,0	87,0	NAA	[133] 2002
Cd	40	0,05 <sup>a</sup>	0,05	0,05	ICP-AES	[133] 2002
	58	0,02 <sup>a</sup>	0,01	0,41	ICP-AES	[134] 2005
	58	0,041 $\pm$ 0,10			ICP-AES	[135] 2005
Co	40	18 <sup>a</sup>	9	41	NAA	[133] 2002
Cr	40	1,23 <sup>a</sup>	0,58	3,14	NAA	[133] 2002
	58	3,23 $\pm$ 5,27			ICP-AES	[135] 2005
	58	1,40 <sup>a</sup>	0,53	3,78	NAA	[134] 2005
Cu	40	4,24 <sup>a</sup>	3,57	6,84	ICP-AES	[133] 2002
	58	3,20 $\pm$ 2,84			ICP-AES	[135] 2005
	57	2,80 <sup>a</sup>	1,10	4,19	ICP-AES	[134] 2005
Fe	40	22 <sup>a</sup>	16	72	NAA	[133] 2002
	58	32,4 $\pm$ 34,9			ICP-AES	[135] 2005
	57	23 <sup>a</sup>	18	32	NAA	[134] 2005
Mn	40	0,8 <sup>a</sup>	0,42	1,72	NAA	[133] 2002
Pb	40	1,22 <sup>a</sup>			ICP-AES	[133] 2002
	58	0,74 $\pm$ 0,81			ICP-AES	[135] 2005
	50	0,51 <sup>a</sup>	0,20	1,08	ICP-AES	[134] 2005
Se	40	0,59 <sup>a</sup>	0,53	0,70	NAA	[133] 2002
	80 ♀	0,61 $\pm$ 0,59 <sup>b</sup>			AAS	[136] 2003
	58	0,66 $\pm$ 0,12			ICP-AES	[135] 2005
	58	0,65 <sup>a</sup>	0,57	0,73	NAA	[134] 2005
Zn	40	102 <sup>a</sup>	92	123	NAA	[133] 2002
	58	119 $\pm$ 28,2			ICP-AES	[135] 2005
	58	112 <sup>a</sup>	103	127	NAA	[134] 2005

<sup>a</sup>: mediana; <sup>b</sup>: media geometrica  $\pm$  ds della media geometrica. **Simboli dei metalli:** vedi Tabella 9.

Tabella 16. Concentrazione dei metalli nel latte materno

Metallo	N. soggetti	Media $\pm$ ds ( $\mu\text{g/g}$ )	Percentili ( $\mu\text{g/L}$ )		Tecnica analitica	[Bibliografia] Data
			25°	75°		
Al	18	0,19 <sup>a</sup>	0,09 <sup>a</sup>	0,19 <sup>a</sup>	ICP-AES	[114] 1990
B	14	1,3 $\pm$ 0,2			ICP-AES	[137] 1996
Ba	18	0,035 <sup>a</sup>	0,009 <sup>a</sup>	0,03 <sup>a</sup>	ICP-AES	[114] 1990
Br	26	2,5 $\pm$ 0,3 <sup>a,b</sup>			PIXE	[138] 1994
Cd	18	0,006 <sup>a</sup>	0,001 <sup>a</sup>	0,005 <sup>a</sup>	ICP-AES	[114] 1990
	143	< 1,0 <sup>c</sup>			AAS	[139] 2004
Co	12	3,4 $\pm$ 0,6 <sup>d</sup>			Spettrometria $\gamma$	[140] 1982
	7	0,97 $\pm$ 0,2 <sup>d</sup>			Spettrometria $\gamma$	[140] 1982
Cr	21	$\leq$ 3,0 <sup>c,d</sup>			Spettrometria $\gamma$	[140] 1982
	18	0,027 <sup>a</sup>	0,007 <sup>a</sup>	0,035 <sup>a</sup>	ICP-AES	[114] 1990
	14	1,2 $\pm$ 0,5			ICP-AES	[137] 1996
Cs	12	73,5 $\pm$ 5,9 <sup>d</sup>			Spettrometria $\gamma$	[140] 1982
	7	1,5 $\pm$ 0,1 <sup>d</sup>			Spettrometria $\gamma$	[140] 1982
Cu	18	0,43 <sup>a</sup>	0,26 <sup>a</sup>	0,54 <sup>a</sup>	ICP-AES	[114] 1990
	26	2,7 $\pm$ 0,3 <sup>a,b</sup>			PIXE	[138] 1994
	14	261 $\pm$ 16			ICP-AES	[137] 1996
	11	510 $\pm$ 120			ICP-MS	[141] 1999
F	14	12,7 $\pm$ 2,0			ICP-AES	[137] 1996
Fe	21	1,5 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>			Spettrometria $\gamma$	[140] 1982
	18	0,89 <sup>a</sup>	0,58 <sup>a</sup>	0,99 <sup>a</sup>	ICP-AES	[114] 1990
	26	3,2 $\pm$ 0,4 <sup>a,b</sup>			PIXE	[138] 1994
Hg	21	$\leq$ 0,5 <sup>c,d</sup>			Spettrometria $\gamma$	[140] 1982
	33	13,9 $\pm$ 12,9			AAS	[142] 1989
I	10	150 $\pm$ 90			ICP-MS	[141] 1999
Li	18	0,005 <sup>a</sup>	0,003 <sup>a</sup>	0,005 <sup>a</sup>	ICP-AES	[114] 1990
Mg	18	29,9 <sup>a</sup>	24,3 <sup>a</sup>	34,8 <sup>a</sup>	ICP-AES	[114] 1990
Mn	18	0,015 <sup>a</sup>	0,006 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>	ICP-AES	[114] 1990
	14	4,1 $\pm$ 0,1			ICP-AES	[137] 1996
Mo	14	3,6 $\pm$ 1,4			ICP-AES	[137] 1996
Ni	18	0,43 <sup>a</sup>	0,02 <sup>a</sup>	0,61 <sup>a</sup>	ICP-AES	[114] 1990
	14	10,8 $\pm$ 0,7			ICP-AES	[137] 1996
Pb	18	0,02 <sup>a</sup>	0,006 <sup>a</sup>	0,025 <sup>a</sup>	ICP-AES	[114] 1990
	20	126,5			AAS	[143] 1992
	26	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>a,b</sup>			PIXE	[138] 1994
	143	7,75 <sup>c</sup>	4,20	14,3	AAS	[139] 2004
Rb	12	5,8 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>			Spettrometria $\gamma$	[140] 1982
	7	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>			Spettrometria $\gamma$	[140] 1982
	26	8,9 $\pm$ 0,6 <sup>a,b</sup>			PIXE	[138] 1994
Sb	21	3,0 $\pm$ 0,4 <sup>d</sup>			Spettrometria $\gamma$	[140] 1982
Sc	21	$\leq$ 0,01 <sup>c,d</sup>			Spettrometria $\gamma$	[140] 1982
Se	21	13,3 $\pm$ 0,9 <sup>d</sup>			Spettrometria $\gamma$	[140] 1982
	26	0,32 $\pm$ 0,04 <sup>a,b</sup>			PIXE	[138] 1994
	14	17,3 $\pm$ 1,1			ICP-OES	[137] 1996
Sr	26	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>a,b</sup>			PIXE	[138] 1994
Zn	21	3,0 $\pm$ 0,2 <sup>d</sup>			Spettrometria $\gamma$	[140] 1982
	18	3,42 <sup>a</sup>	1,53 <sup>a</sup>	4,63 <sup>a</sup>	ICP-AES	[114] 1990
	26	21,7 $\pm$ 1,4 <sup>a,b</sup>			PIXE	[138] 1994
	14	2.300 $\pm$ 400			ICP-AES	[137] 1996
	11	3.990 $\pm$ 1.010			ICP-MS	[141] 1999

<sup>a</sup>:  $\mu\text{g/g}$ ; <sup>b</sup>: mediana  $\pm$  ds della mediana; <sup>c</sup>: mediana; <sup>d</sup>: ng/g. **Simboli dei metalli:** vedi Tabella 9 e 10; F (fluoro); I (iodio).

## 7. IL PROGETTO PROBE: OBIETTIVI E AZIONI

La frammentarietà e l'incompletezza emerse dall'indagine da noi effettuata nell'ambito dei VR per i metalli in Italia ha quindi portato alla necessità di intraprendere una campagna di BM ad ampio raggio sulla popolazione italiana: il progetto PROBE, acronimo di *PROgram for the Biomonitoring of the Exposure of the population* (2008-2010), finanziato dal Centro Nazionale per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali. Il progetto si propone l'obiettivo di fornire alle istituzioni una base di dati di VR affidabile per quel che concerne il grado di esposizione della popolazione generale ai metalli. L'insieme degli interventi che PROBE intende realizzare rientra, quindi, nella generale ottica di fornire elementi conoscitivi per la valutazione del rischio per la popolazione italiana come risultato dell'esposizione a particolari inquinanti durante i vari periodi della vita. In una prima fase PROBE si propone di valutare criticamente i dati pregressi di letteratura sull'argomento per dare un primo quadro nazionale dell'esposizione e per identificare i biomarcatori (coppia metallo-matrice) da considerare come priorità. Il risultato di questa prima fase è quanto riportato in questo rapporto e in particolare nelle Tabelle 9-16 del paragrafo 6. Contemporaneamente PROBE realizza una prima campagna pilota di campionamenti in varie Regioni (Piemonte, Emilia Romagna, Lazio, Umbria e Calabria) arruolando gruppi di popolazione che rappresentano realtà di esposizioni generali ma ben definite. In ogni Regione il gruppo raccolto consta di circa 300 soggetti, selezionati in base a questionari specificatamente sviluppati al fine di ottenere gruppi omogenei in base a età, tipo di residenza, abitudini alimentari (dieta mista o vegetariana, consumo di pesce, ecc.), eventuale esposizione di tipo ambientale ai metalli (traffico, vicinanza a inceneritori, industrie, ecc.). Il programma ha individuato le competenze presenti sul territorio e ne ha stimolato la partecipazione e il miglioramento organizzativo formando così una rete che collabora alla realizzazione delle campagne di BM. Il programma ha necessariamente spiccato carattere multicentrico e si avvale per la selezione e i prelievi di sedi comunali e/o provinciali dell'associazione nazionale donatori di sangue (AVIS). Inoltre partecipano al progetto la Fondazione Salvatore Maugeri (Pavia) e il Centro di Ricerca Studi per lo Sviluppo (SPES, Sapienza Università di Roma) per le attività di sviluppo metodi e il Reparto di Epidemiologia Genetica del Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute (CNESPS) dell'Istituto Superiore di Sanità per la valutazione statistico-epidemiologica dei dati. Il prodotto finale del programma conterà di una serie di schede dei VR per i metalli nella popolazione italiana come conclusione delle varie campagne di BM. Gli obiettivi correlati sono quelli di evidenziare situazioni/aree di particolare rischio per la popolazione a seguito di esposizione ai metalli al di sopra della media nazionale e di dimostrare l'utilità e l'efficacia delle eventuali azioni normative prese per diminuire i livelli ambientali di metalli tossici attraverso la diminuzione della loro dose interna nel corso degli anni. Le fasi operative di PROBE possono essere così schematizzate: 1) valutazione critica dei dati presenti in letteratura per l'individuazione di quelli idonei e utilizzabili per la definizione dei VR della popolazione italiana (Tabelle 9-16, paragrafo 6); 2) definizione delle metodologie di selezione della popolazione, dei metodi analitici e statistico-epidemiologici necessari allo svolgimento del programma; 3) individuazione delle competenze locali in grado di partecipare a PROBE; 4) realizzazione di campagne di BM su parte del territorio nazionale. I metalli che si analizzano sono quelli riportati anche nell'ultimo *National Report on Human Exposure to Environmental Chemical* dei CDC americani e cioè: antimonio (Sb), cadmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), mercurio (Hg), molibdeno (Mo), piombo (Pb), platino (Pt), tallio (Tl), tungsteno (W) e uranio (U). A questi undici metalli si è ritenuto opportuno aggiungere altri nove:

arsenico (As), berillio (Be), iridio (Ir), manganese (Mn), nichel (Ni), palladio (Pd), rodio (Rh), stagno (Sn) e vanadio (V) in quanto elementi che rappresentano note e/o emergenti problematiche tossicologiche e che, per la maggior parte, sono stati inseriti dagli stessi CDC in liste di priorità. Le campagne di BM ripetute nel tempo potranno dare evidenza dei risultati – in termini di maggiore o minore esposizione – e della bontà delle misure intraprese per diminuire l'esposizione in specifiche situazioni di rischio.

## 8. CONCLUSIONI E RICERCA FUTURA

Negli ultimi due decenni, soltanto pochi studi di BM sono stati adeguatamente realizzati e, quindi, risultano utili per la definizione dei VR dei metalli nella popolazione italiana. Di questi, inoltre, la maggior parte sono limitati ad uno o pochi elementi chimici e ad un sola matrice biologica analizzata; in pratica, solo due/tre gruppi di lavoro hanno cercato negli anni di intraprendere campagne di BM con una certa continuità. Per questo, il quadro che ne emerge è frammentario e limitato ad alcune zone geografiche quali Lazio e Lombardia. Tale mancanza di dati non permette di descrivere un panorama della situazione italiana, di delineare né tendenze future né specifici scenari di esposizione verso cui far convergere azioni di ripristino dei livelli accettabili di contaminazione. Si riafferma la necessità di campagne di BM coordinate a livello nazionale, anche per poter adeguatamente confrontare la situazione italiana con quella degli altri Paesi e, in particolare, con gli altri Stati Membri. L'Unione Europea, infatti, sollecita di condividere tra gli Stati Membri le conoscenze derivanti dal BM per poter ricavare un'immagine globale quanto più vicina alla situazione di esposizione e poter così intraprendere e sostenere le necessarie azioni normative.

Sulla base della situazione riscontrata in Italia e riportata in questo rapporto, si evidenziano alcune necessità di cui le future attività in questo campo dovranno tener conto e che si possono così riassumere: 1) standardizzazione dei protocolli operativi e validazione dei biomarcatori a vari livelli; 2) integrazione di biomarcatori diversi (dose, effetto, suscettibilità) per aver un quadro più completo della relazione salute/ambiente; 3) ottimizzazione progettuale delle campagne di BM per valutare meglio la variabilità intra- e inter-individuale al fine di rilevare variabili predittive utili all'identificazione di sottopopolazioni a maggior rischio; 4) implementazione di studi sui bambini e su coorti madri/bambini.

Recentemente, stanno acquisendo attenzione le tecniche cosiddette "omiche", quali la genomica (analisi ed espressione del gene), la proteomica (analisi ed espressione delle proteine in cellule, tessuti o organismi), la metabolomica (profilo metabolico in urine, plasma o tessuti) quali strumenti per valutare l'effetto a partire dall'esposizione (116). Ma queste tecniche richiedono ancora molta ricerca per arrivare ad essere riproducibili, specifiche e standardizzate.

In conclusione, per conoscere lo stato di salute della popolazione dipendente dall'interazione ambientale e prendere decisioni normative in merito, è stringente il bisogno non solo di produrre dati di BM (in modo particolare in Italia dove sono ancora pochi) ma anche di saperli interpretare e di saperli integrare con i dati degli effetti sulla salute e con i dati di monitoraggio ambientale. È nell'ambito di tale quadro che nasce e si sviluppa il progetto PROBE il quale ha messo a punto procedure validate mirate al trattamento e all'analisi dei metalli in regime di qualità e realizzerà una banca dati (informatizzata) dei VR per un vasto numero di metalli nel sangue e nel siero della popolazione italiana. L'informazione prodotta dal progetto permetterà alle autorità competenti in materia di: 1) stabilire le priorità in tale settore; 2) valutare l'efficacia delle esistenti attività di sanità pubblica volte a ridurre l'esposizione della popolazione italiana ai metalli; 3) programmare interventi, anche locali, mirati alla prevenzione della salute della popolazione esposta.

## BIBLIOGRAFIA

1. Patz JA, Engelberg D, Last J. The effects of changing weather on public health. *Annu Rev Public Health* 2000;21:271-307.
2. Zielhuis RL. Biological monitoring: confusion in terminology. *Am J Ind Med* 1985;8(6):515-6.
3. WHO. *Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. Environmental Health Criteria 222*. Geneva, Switzerland: WHO; 2001. p. 238.
4. Metcalf SW, Orloff KG. Biomarkers of exposure in community settings. *J Toxicol Environ Health A* 2004;67(8-10):715-26.
5. Schulz C, Conrad A, Becker K, Kolossa-Gehring K, Seiwert M. 20 years of German Environmental Survey (GerES): human biomonitoring and trends over time. *Int J Hyg Environ Health* 2007;210:271-97.
6. Wittsiepe J, Schrey P, Ewers U, Selenka F, Wilhelm M. Decrease of PCDD/F levels in human blood from Germany over the past ten years (1989-1998). *Chemosphere* 2000;40:1103-11.
7. Becker K, Conrad A, Kirsch N, Kolossa-Gehring M. German Environmental Survey (GerES): Human biomonitoring as a tool to identify exposure pathways. *Int J Hyg Environ Health* 2007;210:267-9.
8. Koch HM, Preuss R, Angerer J. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure - an update and latest results. *Int J Androl* 2006;29:155-65.
9. Kehoe RA, Thamann F, Cholak J. Lead Absorption and excretion in relation to the diagnosis of \ lead poisoning. *J Ind Hyg Toxicol* 1933;15(5):320-40.
10. Schrenk HH, Yant WP, Sayers RR. A new procedure for the control of benzene exposure. *J Amer Med Ass* 1936;107(11):849-52.
11. National Research Council (NRC). *Monitoring Human Tissues for Toxic Substances*. Washington:National Academy Press; 1991.
12. Schober S. National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES): environmental biomonitoring measures, interpretation of results. Second meeting on human biomonitoring for environmental toxicants, Washington DC, USA, April 28 2005.
13. Needham LL. Biomonitoring in NHANES and other programs. Second meeting on human biomonitoring for environmental toxicants, Washington DC, USA, April 28 2005.
14. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals*. Atlanta (GA), USA; 2005. p. 1-467.
15. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals*. Atlanta (GA), USA; 2009. p. 1-529.
16. US EPA. *National Human Exposure Assessment Survey*. 2004. Disponibile all'indirizzo: <http://www.epa.gov/nerl/research/nhexas/nhexas.htm>; ultima consultazione 30/06/2010.
17. NIEHS. *Centers for Children's Environmental Health and Disease Prevention Research*. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. 2003. Disponibile all'indirizzo: <http://www.niehs.nih.gov/>; ultima consultazione 30/06/2010.
18. Wong SL, Lye EJD. *Lead, mercury and cadmium levels in Canadians*. 2006. Disponibile all'indirizzo: [www.statcan.gc.ca](http://www.statcan.gc.ca); ultima consultazione 30/06/2010.
19. COM 338. 2003. Disponibile all'indirizzo: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2003:0338:FIN:IT:PDF>; ultima consultazione 30/06/2010.
20. COM 416. 2004. Disponibile all'indirizzo: [http://www.eu-humanbiomonitoring.org/doc/ta\\_vol2.pdf](http://www.eu-humanbiomonitoring.org/doc/ta_vol2.pdf); ultima consultazione 30/06/2010.

21. WWF. Bad Blood? A Survey of Chemicals in the Blood of European Ministers. Brussels:World Wildlife Fund. 2004. Disponibile all'indirizzo: <http://www.worldwildlife.org/who/media/press/2004/WWFpresitem754.html>; ultima consultazione 30/06/2010.
22. ECETOC. *Guidance for the Interpretation of Biomonitoring Data. Document No. 44.* Brussels:European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, 2005.
23. Angerer J, Ewers U, Wilhelm M. Human Biomonitoring. State of the art. *Int J Hyg Environ Health* 2007;210:201-28.
24. Schulz C, Angerer J, Ewers U, Kolossa-Gehring M. The German Human Biomonitoring Commission. *Int J Hyg Environ Health* 2007;210:375-84.
25. Ewers H, Krause C, Schulz C, Wilhelm M. Reference values and human biological monitoring values for environmental toxins. *Int Arch Occup Environ Health* 1999;72:255-60.
26. Koppen G, Schoeters G. Flemish biomonitoring: from pilot study (1999) to biomonitoring campaign (2002-2006) and follow-up. The European Environment and Health Action Plan 2004-2010, Egmond aan Zee, The Netherlands, December 2-3 2004. Disponibile all'indirizzo: <http://www.milieu-en-gezondheid.be>; ultima consultazione 30/06/2010.
27. Černá M, Spěváčková V, Batářiiová A, Šmíd J, Čejchanová M, Očadlíková D, Bavorová H, Beneš B, Kubínová R. Monitoring system in the Czech Republic. *Int J Hyg Environ Health* 2007;210(3-4):495-9.
28. Jakubowski M. Biological monitoring of environmental exposure to lead-an example from Poland. The European Environment and Health Action Plan 2004-2010, Egmond aan Zee, The Netherlands, December 2-3 2004. Disponibile all'indirizzo: <http://www.milieu-en-gezondheid.be>; ultima consultazione 30/06/2010.
29. Reis MF, Sampaio C, Melim M, Miguel JP. Environmental Health Survey Programs (ProVEpAs) in Portugal. The European Environment and Health Action Plan 2004-2010, Egmond aan Zee, The Netherlands, December 2-3 2004. Disponibile all'indirizzo: <http://www.milieu-en-gezondheid.be>; ultima consultazione 30/06/2010.
30. Needham LL, Calafat AM, Barr D. Uses and issues of Biomonitoring. *Int J Hyg Environ Health* 2007;210:229-38.
31. Esteban M, Castano A. Non-invasive matrices in human biomonitoring: A review. *Environ Internat* 2009;35:438-49.
32. Barr DB, Wang RY, Needham LL. Biologic monitoring of exposure to environmental chemicals throughout the life stages: requirements and issues for consideration for the National Children's Study. *Environ Health Perspect* 2005;113:1083-91.
33. Barr DB, Wilder LC, Caudill SP, Gonzalez AJ, Needham LL, Pirkle JL. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: Implications for urinary biological monitoring measurements. *Environ Health Perspect* 2005;113:192-200.
34. Polkowska Z, Kozłowska K, Namiesnik J, Przyjazny A. Biological fluids as a source of information on the exposure of man to environmental chemical agents. *Crit Rev Anal Chem* 2004;35:105-19.
35. WHO. *Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace.* Geneva, Switzerland: WHO; 1996. Vol. 1.
36. Kommission-Human Biomonitoring des Umweltbundesamtes. Haaranalysen in der Umweltmedizin. Stellungnahme der Kommission „Human-Biomonitoring“ des Umweltbundesamtes. *Bundesgesetzblatt Gesundheitsforsch Gesundheitschutz* 2005;48:246-50.
37. Harkins DK, Susten AS. Hair analysis: exploring the state of the science. *Environ Health Perspect* 2001;111:576-8.
38. Choi AL, Grandjean P: Methylmercury exposure and health effects in humans. *Environ Chem* 2008, 5:112-20.

39. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *Hair Analysis Panel Discussion: Exploring the State of the Science*. Atlanta, GA; 2001. Disponibile all'indirizzo: [http://www.atsdr.cdc.gov/HAC/hair\\_analysis](http://www.atsdr.cdc.gov/HAC/hair_analysis); ultima consultazione 30/06/2010.
40. LaKind JS, Wilkins AA, Berlin CM. Environmental chemicals in human milk: a review of levels, infant exposures and health, and guidance for future research. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;198:184-208.
41. Gulson BL. Nails: concern over their use in lead exposure assessment. *Sci Total Environ* 1996;177, 323-7.
42. Van Wijngaarden E, Beck C, Shamlaye CF, Cernichiari E, Davidson PW, Myers GJ, Clarkson TW. Benchmark concentrations for methyl mercury obtained from the 9-year follow-up of the Seychelles Child Development Study. *Neurotoxicology* 2006;27:702-9.
43. Wilhelm M, Ewers U, Schulz C. Revised and new reference values for some trace elements in blood and urine for human biomonitoring in environmental medicine. *Inter J Hyg Environ Health* 2004;207:69-73.
44. Wilhelm M, Pesch A, Rostek U, Begerow J, Schmitz N, Idel H, Ranft U. Concentrations of lead in blood, hair and saliva of German children living in three different areas of traffic density. *Sci Total Environ* 2002;297(1-3):109-18.
45. Timchalk C, Poet TS, Kousba AA, Campbell JA, Lin Y. Noninvasive biomonitoring approaches to determine dosimetry and risk following acute chemical exposure: Analysis of lead or organophosphate insecticide in saliva. *J Toxicol Environ Health A* 2004;67:635-50.
46. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva - a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:197-212.
47. Silva MJ, Reidy JA, Samandar E, Herbert AR, Needham LL, Calafat AM. Detection of phthalate metabolites in human saliva. *Arch Toxicol* 2005;79:647-52.
48. Aps JKM, Martens LC. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int* 2005;150:119-31.
49. Wallace L, Buckley T, Pellizzari E, Gordon S. Breath measurements as volatile organic compound biomarkers. *Environ Health Perspect* 1996;104(Suppl 5):861-9.
50. Goldoni M, Catalani S, De Palma G, Manini P, Acampa O, Corradi M, Begonzi R, Apostoli P, Mutti A. Exhaled breath condensate as a suitable matrix to assess lung dose and effects in workers exposed to cobalt and tungsten. *Environ Health Perspect* 2004;112:1293-8.
51. Mutti A, Corradi M, Goldoni M, Vettori MV, Bernard A, Apostoli P. Exhaled metallic elements and serum pneumoproteins in asymptomatic smokers and patients with COPD or asthma. *Chest* 2006;129(5):1288-97.
52. Iyengar GV, Rapp A: Human placenta as a 'dual' biomarker for monitoring fetal and maternal environment with special reference to potentially toxic trace elements. Part 1: Physiology, function and sampling of placenta for elemental characterisation. *Sci Total Environ* 2001;280:195-206.
53. Iyengar GV, Rapp A. Human placenta as a 'dual' biomarker for monitoring fetal and maternal environment with special reference to potentially toxic trace elements. Part 3: Toxic trace elements in placenta and placenta as a biomarker for these elements. *Sci Total Environ* 2001;280:221-38.
54. Apostoli P, Fenga C, Sarnico M, Germanò D. Cute, suoi annessi e secreti come matrici per il monitoraggio biologico di elementi tossici. *G Ital Med Lav Erg* 2002;24:188-99.
55. Hu H, Rabinowitz M, Smith S. Bone lead as a biological marker in epidemiologic studies of chronic toxicity: conceptual paradigms. *Environ Health Perspect* 1998;106:1-8.
56. Nowak B, Chmielnicka J. Relationships of lead and cadmium to essential elements in hair, teeth, and nails of environmental exposed people. *Ecotoxicol Environ Saf* 2000;46:265-74.

57. Kikuchi Y, Nomiya T, Kumagai N, Dekio F, Uemura T, Takebayashi T, et al. Uptake of cadmium in meals from the digestive tract of young non-smoking Japanese female volunteers. *J Occup Health* 2003;45:43-52.
58. Alimonti A, Mattei D. Biomarkers for human biomonitoring. In: Conti ME (Ed.). *Biological Monitoring: Theory and Applications*. Ashurst, Southampton, SO40 7AA, UK: WIT Press; 2008. p. 163-212.
59. Merian E, Anke M, Ihnat M., Stoeppler M. (Ed.). *Elements and their Compounds in the Environment. Occurrence, Analysis and Biological Relevance*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2004. Vol. 3.
60. Kentner M, Leinemann M, Schaller KH, Weltle D, Lenert G. External and internal antimony exposure in starter battery production. *Int Arch Occup Environ Health* 1995;67:119-23.
61. Zorn HR, Stiefel TW, Beuers J, Schlegelmilch R. Beryllium. In: Seiler HG, Sigel H (Ed.). *Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds*. New York, NY, USA: Marcel Dekker Inc; 1998. p. 105-15.
62. Lindberg E, Vesterberg O. Urinary excretion of chromium in chromeplaters after discontinued exposure. *Am J Ind Med* 1989;16:485.
63. Angerer J, Schaller KH (Ed.). *Analysis of Hazardous substances in biological materials -Biomonitoring Methods*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 1985-2006. Vol. 1-10.
64. Alimonti A, Petrucci F, Krachler M, Bocca B, Caroli S. Reference values for chromium, nickel and vanadium in urine of youngsters from the urban area of Rome. *J Environ Monit* 2000;2:351-4.
65. Bocca B, Alimonti A, Coni E, Di Pasquale M, Giglio L, Piccioli Bocca A, Caroli S. Determination of the total content and binding pattern of elements in human milk by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Talanta* 2000;53:295-303.
66. Bocca B, Alimonti A, Forte G, Petrucci F, Pirola C, Senofonte O, Violante N. High-throughput microwave-digestion procedures to monitor neurotoxic elements in body fluids by means of inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2003;377(1):65-70.
67. Bocca B, Alimonti A, Petrucci F, Violante N, Sancesario G, Forte G, Senofonte O. Quantification of trace elements by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry in urine, serum, blood and cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Spectrochim Acta B* 2004;59(4):559-66.
68. Bocca B, Alimonti A, Cristaudo A, Cristallini E, Petrucci F, Caroli S. Monitoring of the exposure to platinum-group elements for two Italian population groups through urine analysis. *Anal Chim Acta* 2004;512(1):19-25.
69. Bocca B, Forte G, Petrucci F, Senofonte O, Violante N, Alimonti A. Development of methods for the quantification of essential and toxic elements in human biomonitoring. *Ann Ist Super Sanità* 2005;41(02):165-70.
70. Bocca B, Conti ME, Pino A, Mattei D, Forte G, Alimonti A. Simple, fast and low contamination microwave-assisted digestion procedures for the determination of chemical elements in biological and environmental matrices by sector field ICP-MS. *Int J Environ Anal Chem* 2007;87(15):1111-23.
71. Bocca B, Lamazza A, Pino A, De Masi E, Iacomino M, Mattei D, Rahimi S, Fiori E, Schillaci A, Alimonti A, Forte G. Determination of 30 elements in colorectal biopsies by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry: method development and preliminary baseline levels. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007;21(11):1776-82.
72. Petrucci F, Bocca B, Alimonti A. Spettrometria di massa nelle analisi di elementi in tracce in matrici complesse. In: Alimonti A, Violante N. (Ed.). *Determinazione di elementi inorganici di interesse tossicologico in matrici ambientali, biologiche e alimentari*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2003 (Rapporti ISTISAN 03/45). p. 77-87.
73. Spezia S, Bocca B, Forte G, Gatti A, Mincione G, Ronchi A, Bavazzano P, Alimonti A, Minoia C. Comparison of inductively coupled plasma mass spectrometry techniques in the determination of platinum in urine: quadrupole vs sector field. *Rapid Comm Mass Spectrom* 2005;19:1551-6.

74. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). *TLVs and BEIs: Based on the Documentation of the Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents & Biological Exposure Indices*. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, OH; CDC. 2005.
75. US EPA. *Stochastic Human Exposure and Dose Simulation*. 2006. Disponibile all'indirizzo: [http://cfpub.epa.gov/si/si\\_public\\_record\\_Report.cfm?dirEntryID=63055](http://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_Report.cfm?dirEntryID=63055); ultima consultazione 30/06/2010.
76. Furtaw EJ. An overview of human exposure modeling activities at the USEPA's National Exposure Research Laboratory. *Toxicol Ind Health* 2001;17(5-10):302-14.
77. Stern AH. Estimation of the Interindividual Variability in the One-Compartment Pharmacokinetic Model for Methylmercury: Implications for the Derivation of a Reference. *Reg Toxicol Pharmacol* 1997;25(3):277-288.
78. US EPA. *Exposure-Related Dose Evaluation Model modeling system*. 2006. Disponibile all'indirizzo: <http://www.epa.gov/heads/products/erdem/erdem.html>; ultima consultazione 30/06/2010.
79. Rice DC, Schoeny R, Mahaffey K. Methods and rationale for derivation of a reference dose for methylmercury by the US EPA. *Risk Anal* 2003;23:107-15.
80. Georgopoulos PG, Lioy PJ. From a theoretical framework of human exposure and dose assessment to computational system implementation: the Modeling ENvironment for TOrtal Risk Studies (MENTOR). *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2006;9(6):457-83.
81. Blancato JN. Pharmacokinetics, chemical interactions, and toxicological risk assessment in perspective. *Environ Health Perspect* 1994;102(Suppl 9):133-7.
82. Blancato JN, Power FW, Brown RN, Dary CC. Exposure Related Dose Estimating Model (ERDEM): A Physiologically-Based Pharmacokinetic and Pharmacodynamic (PBPK/PD) Model for Assessing Human Exposure and Risk. 2006. Disponibile all'indirizzo: <http://www.epa.gov/heads/products/erdem/erdem.html>; ultima consultazione 30/06/2010.
83. Grasbeck R, Saris ME. Establishment and use of reference values. *Scand J Clin Invest* 1969;26:62-3.
84. Apostoli P, Minoia C. I valori di riferimento in Medicina occupazionale e ambientale. *G Ital Med Lav Erg* 1999;21:25-39.
85. Solberg HE, Grasbeck R. Reference values. *Adv Clin Chem* 1989;27:1-79.
86. Solberg HE. Approved recommendation on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:337-42.
87. Vesterberg O, Alessio L, Brune D, Gerhardsson L, Herber R, Kazantzis G, Nordberg G, Sabbioni E. International project for producing reference values for concentrations of trace elements in human blood and urine - TRACY. *Scand J Work Environ Health* 1993;19(Suppl.1):19-26.
88. Solberg HE. Approved recommendation on the theory of reference values. Part 4. Control of analytical variation in the production, transfer and application of reference values. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991;29:531-5.
89. Becker K, Kaus S, Krause C, Lepom P, Schulz C, Seiwert M, Seifert B. German Environmental Survey 1998 (GerESIII): environmental pollutants in blood of the German population. *Int J Hyg Environ Health* 2002;205:297-308.
90. Becker K, Schulz C, Kaus S, Seiwert M, Seifert B. German Environmental Survey 1998 (GerESIII): environmental pollutants in urine of the German population. *Int J Hyg Environ Health* 2003;206:15-24.
91. Becker K, Müssig-Zufika M, Conrad A, Lüdecke A, Schulz C, Seiwert M, Kolossa-Gehring M. *German Environmental Survey for Children 2003/06 (GerES IV)*. Dessau-Roßlau; Federal Environment Agency, WaBoLu-Hefte 01/08. 2008.
92. PetitClerc C, Wilding P. The theory of reference values. Part 2. Selection of individuals for the production of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1984;22:203-8.

93. Duca PG. Elementi di statistica per il monitoraggio biologico. In: Bertazzi PA, Alessio L, Duca P, Marubini E (Ed.). *Monitoraggio Biologico negli Ambienti di Lavoro*. Milano: Franco Angeli Editore;1984. p. 95-115.
94. Eurachem. *The fitness for purpose of analytical methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. Teddington, Middlesex, UK: LGC; 1998. p. 1-61.
95. ISO Guide 98. *Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM)*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 1995.
96. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eu Com* 2002;L221.
97. ISO/IEC 17025. *General competence for the competence of testing and calibration laboratories*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2005.
98. ISO 11843-1. *Capability of detection - Part 1 Terms and definitions*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 1997.
99. Ellison SLR, Rösslein M, Williams A. *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 2<sup>nd</sup> ed.* EURACHEM/CITAC; 2000. p. 25.
100. ISO 5725. *Accuracy, Trueness and Precision of Measurement Methods and Results*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2004.
101. ISO 3534-1. *Statistics - Vocabulary and symbols - Part 1: General statistical terms and terms used in probability*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2006.
102. Linsinger TPJ. Use of recovery and bias information in analytical chemistry and estimation of its uncertainty contribution. *TrAC Trends Anal Chem* 2008;27:916-23.
103. Frazzoli C, Bocca B. Validation, uncertainty estimation and application of a sector field ICP MS-based method for As, Cd and Pb in cow's milk and infant formulas. *Microchim Acta* 2008;162(1-2):43-50.
104. Forte G, Bocca B. Quantification of cadmium and lead in offal by SF-ICP-MS: method development and uncertainty estimate. *Food Chem* 2007;105(4):1591-8.
105. Alimonti A, Forte G, Spezia S, Gatti A, Mincione G, Ronchi A, Bavazzano P, Bocca B, Minoia C. Uncertainty of inductive coupled plasma mass spectrometry based measurements: an application to the analysis of urinary barium, cesium, antimony and tungsten. *Rapid Comm Mass Spectrom* 2005;19:3131-8.
106. Frazzoli C, D'Ilio S, Bocca B. Determination of Cd and Pb in honey by SF-ICP-MS: validation figures and uncertainty of results. *Anal Lett* 2007;40:1992-2004.
107. ISO/DTS 21748. *Guide to the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurements uncertainty estimation*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2004.
108. Duca PG. Statistical aspects of the estimation of reference limits. *Sci Total Environ* 1992; 120:155-71.
109. Holst E, Molin Christensen J. Intervals or the description of the biological level of a trace metal in a reference population. *Statistician* 1992;41:233-42.
110. Minoia C, Sabbioni E, Apostoli P, Pietra R, Pozzoli L, Gallorini M, Nicolaou G, Alessio L, Capodaglio E. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Community. I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects. *Sci Total Environ* 1990;95:89-105.
111. Roggi C, Sabbioni E, Minoia C, Ronchi A, Gatti A, Hansen B, Silva S, Maccarini L. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Union. IX. Harmonization of statistical treatment: blood cadmium in Italian subjects. *Sci Total Environ* 1995;166:235-43.
112. Sabbioni E, Minoia C, Pietra R, Fortaner S, Gallorini M, Saltelli A. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Community. II. Examples of strategy adopted and trace

- element analysis of blood, lymph nodes and cerebrospinal fluid of Italian subjects. *Sci Total Environ* 1992;120:39-62.
113. Bocca B, Forte G, Ronchi A, Gaggeri R, Alimonti A, Minoia C. Nickel quantification in serum by a validated sector-field inductively coupled plasma mass spectrometry method: Assessment of tentative reference values for an Italian population. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006;20:3289-94.
  114. Coni E, Falconieri P, Ferrante E, Semeraro P, Beccaloni E, Stacchini A, Caroli S. Reference values for essential and toxic elements in human milk. *Ann Ist Super Sanità* 1990;26(2):119-30.
  115. Alimonti A, Bocca B, Mannella E, Petrucci F, Zennaro F, Cotichini R, D'Ippolito C, Agresti A, Caimi S, Forte G. Assessment of reference values for selected elements in a healthy urban population. *Ann Ist Super Sanità* 2005;41(2):181-7.
  116. Schwartz DA, Weis B, Wilson SH. The need for exposure health sciences. *Environ Health Perspect* 2005;113(10):A650-A652.
  117. Apostolili P, Maranelli G, Duca PG, Bavazzano P, Bortoli A, Cruciatti A, Elia G, Minoia C, Piccinini R, Sabbioni E, Sciarra G, Soave C. Reference value of urinary chromium in Italy. *Int Arch Occup Environ Health* 1997;70:173-9.
  118. Apostoli P, Cortesi I, Mangili A, Elia G, Drago I, Gagliardi T, Soleo L, Valente T, Sciarra GF, Aprea C, Ronchi A, Minoia C. Assessment of reference values for mercury in urine: the results of an Italian polycentric study. *Sci Total Environ* 2002-a;289(1-3):13-24.
  119. Soleo L, Elia G, Russo A, Schiavulli N, Lasorsa G, Mangili A, Gilberti E, Ronchi A, Balducci C, Minoia C, Aprea C, Sciarra GF, Valente T, Fenga C. Valori di riferimento del mercurio urinario nella popolazione italiana. *G Ital Med Lav Erg* 2003;25(1):107-13.
  120. L'Abbate N, Cassano F, Rana F, Gagliardi T, Giacomantonio A. Blood lead and erythrocyte protoporphyrin levels in the general population of an area in southern Italy. *Med Lav* 1991;82(4):336-40.
  121. Sabbioni E, Minoia C, Ronchi A, Hansen BG, Pietra R, Balducci C. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Union. VIII. Thallium in the Italian population. *Sci Total Environ* 1994;158(1-3):227-36.
  122. Alimonti A, Bocca B, Mattei D, Lamazza A, Fiori E, De Masi E, Pino A, Forte G. Composition of essential and non-essential elements in tissues and body fluids of healthy subjects and patients with colorectal polyps. *Int J Environ Health* 2009;3(2):224-37.
  123. Salpietro CD, Gangemi S, Minciullo PL, Briuglia S, Merlino MV, Stelitano A, Cristani M, Teombetta D, Saija A. Cadmium concentration in maternal and cord blood and infant birth weight: a study on healthy non-smoking woman. *J Perinatal Med* 2002;30:395-9.
  124. Folin M, Contiero E, Vaselli GM. Trace element determination in humans. The use of blood and hair. *Biol Trace Elem Res* 1991;31:147-58.
  125. Bocca B, Alimonti A, Senofonte O, Pino A, Violante N, Petrucci F, Sancesario G, Forte G. Metal changes in CSF and peripheral compartments of parkinsonian patients. *J Neurol Sci* 2006;248(1-2):23-30.
  126. Canavese C, De Costanzi E, Branciforte L, Caropreso A, Nonnato A, Pietra R, Fortaner S, Jacono F, Angelini G, Gallieni M, Fop F, Sabbioni E. Rubidium deficiency in dialysis patients. *J Nephrol* 2001;14(3):169-75.
  127. Iavicoli I, Bocca B, Caimi S, Alimonti A, Carelli G, Bergamaschi A. Biological monitoring of iridium in an Urban population. *G Ital Med Lav Erg* 2006;28(2):202-3.
  128. Iavicoli I, Bocca B, Carelli G, Caroli S, Caimi S, Alimonti A, Fontana L. Biomonitoring of tram drivers exposed to airborne platinum, rhodium and palladium. *Int Arch Occup Environ Health* 2007;81(1):109-14.
  129. Iavicoli I, Bocca B, Petrucci F, Senofonte O, Carelli G, Alimonti A, Caroli S. Biomonitoring of traffic police officers exposed to airborne platinum. *Occup Environ Med* 2004;61(7):636-9.

130. Wolfsperger M, Hauser G, Gößler W, Schlagenhauen C. Heavy metals in human hair samples from Austria and Italy: influence of sex and smoking habits. *Sci Total Environ* 1994;156:235-42.
131. Bertazzo A, Costa C, Biasiolo M, Allegri G, Cirrincione G, Presti G. Determination of copper and zinc levels in human hair. Influence of sex, age, and hair pigmentation. *Biol Trace Elem Res* 1996;52:37-53.
132. Alimonti A, Bocca B, Pino A, Ruggieri F, Forte G, Sancesario G. Elemental profile of cerebrospinal fluid in patients with Parkinson's disease. *J Trace Elem Med Biol* 2007;21:234-41.
133. Bergomi M, Vinceti M, Nacci G, Pietrini V, Bratter P, Alber A. Environmental exposure to trace elements and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a population-based case-control study *Environ Res* 2002;89:116-23.
134. Vinceti M, Bassissi S, Malagoli C, Pellacani G, Alber D, Bergomi M, Seidenari S. Environmental exposure to trace elements and risk of cutaneous melanoma. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2005;15:458-62.
135. Bergomi M, Pellacani G, Vinceti M, Bassissi S, Malagoli C, D Alber, Sieri S, Vescovi L, Seidenari S, Vivoli R. Trace elements and melanoma. *J Trace Elem Med Biol* 2005;19:69-73.
136. Krogh V, Pala V, Vinceti M, Berrino F, Ganzi A, Micheli A, Muti P, Vescovi L, Ferrari A, Fortini A, Sieri S, Vivoli G. Toenail selenium as biomarker: reproducibility over a one-year period and factors influencing reproducibility. *J Trace Elem Med Biol* 2003;17:31-6.
137. Aquilio E, Spagnoli R, Seri S, Bottone G, Spennati G. Trace element content in human milk during lactation of preterm newborns. *Biol Trace Element Res* 1996;51:63-9.
138. Perrone L, Di Palma L, Di Toro R, Gialanella G, Moro R. Interaction of trace elements in longitudinal study of human milk from full-term and preterm mothers. *Biol Trace Element Res* 1994;41:321-30.
139. Turconi G, Guarcello M, Livieri C, Comizzoli S, Maccarini L, Castellazzi AM, Pietri A, Piva G, Roggi C. Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by the newborn: An epidemiological survey in Lombardy (Northern Italy). *Eur J Nutr* 2004;43:191-7.
140. Clemente GF, Ingraio G, Santaroni GP. The concentration of some trace elements in human milk from Italy. *Sci Total Environ* 1982;24:255-65.
141. Chierici R, Saccomandi D, Vigi V. Dietary supplements for the lactating mother: influence on the trace element content of milk. *Acta Paediatr Suppl* 1999;430:7-13.
142. Paccagnella B, Riolfatti M. Livelli di mercurio totale nel latte umano di madri italiane senza particolare esposizione al metal-mercurio. *Ann Ig Med Prev Comun* 1989;1:661-71.
143. Guidi B, Ronchi S, Ori E, Varni PF, Cassinadri T, Tripodi A, Borghi A, Mattei F, Demaria F, Galavotti E, Benatti C. Concentrazione del piombo nel latte materno di donne residenti in aree urbane rispetto a donne residenti in aree rurali. *Ped Med Chir* 1992;14:611-6.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN  
deve essere preventivamente autorizzata.  
Le richieste possono essere inviate a: [pubblicazioni@iss.it](mailto:pubblicazioni@iss.it).*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl  
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

*Roma, luglio-settembre 2010 (n. 3) 6° Suppl.*