

esclusivamente per scopi di raccolta e di analisi scientifica. L'accesso ai dati personali sarà possibile solo al Responsabile scientifico e agli operatori informatici da lui autorizzati.

### 3.4 Determinazioni analitiche sui campioni di unghie

I campioni di unghie (provette con la sola etichetta identificativa) saranno inviati a un laboratorio accreditato identificato dalla ASL BAT, presso il quale sarà analizzata la presenza e la concentrazione di una lista di **23 metalli pesanti** per ogni campione: Alluminio (**Al**), Antimonio (**Sb**), Arsenico (**As**), Bario (**Ba**), Berillio (**Be**), Boro (**B**), Cadmio (**Cd**), Cobalto (**Co**), Cromo (**Cr**), Ferro (**Fe**), Manganese (**Mn**), Mercurio (**Hg**), Molibdeno (**Mo**), Nichel (**Ni**), Piombo (**Pb**), Rame (**Cu**), Selenio (**Se**), Tallio (**Tl**), Torio (**Th**), Tungsteno (**W**), Uranio (**U**), Vanadio (**V**), Zinco (**Zn**).

Secondo metodica precedentemente validata<sup>12</sup>, i campioni saranno inizialmente immersi, senza agitare, in una soluzione di etanolo al 70% per 10 minuti per ridurre il rischio di contaminazione microbiologica durante la manipolazione preliminare da parte dell'analista.

La procedura di lavaggio per la rimozione delle impurità di origine esogena sarà eseguita mediante i seguenti passaggi successivi:

- tre lavaggi consecutivi con acetone (ciascuno con agitazione meccanica a 3000 rpm per 1 minuto);
- tre trattamenti consecutivi con Triton X100 al 2% (ciascuno con agitazione meccanica a 3000 rpm per 1 minuto);
- due lavaggi con acqua purificata Milli-Q (ciascuno con agitazione meccanica a 3000 rpm per 20 secondi);
- separazione dei campioni dalla soluzione di lavaggio mediante filtrazione (carta da filtro Whatman 41);
- doppio lavaggio del materiale filtrato con acqua Milli-Q;
- doppio lavaggio con acetone.

La carta da filtro sarà successivamente posizionata insieme al campione ungueale in un disco di Petri e i campioni saranno lasciati asciugare a temperatura ambiente per 24-48 ore.

Le determinazioni analitiche (**Al, Sb, As, Ba, Be, B, Cd, Co, Cr, Fe, Mn, Hg, Mo, Ni, Pb, Cu, Se, Tl, Th, W, U, V, Zn**) saranno eseguite mediante **ICP-MS (spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente)** secondo il metodo EPA 6020A 2007 (<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/epa-6020a.pdf>).

### 3.5 Analisi statistica

I dati ottenuti saranno aggregati, sottoposti ad analisi descrittiva (proporzioni, medie, mediane, range, errori standard) e successivamente a confronti tra gruppi attraverso test statistici (analisi della varianza, Wilcoxon, chi-quadro, laddove appropriati) e ad analisi di correlazione (Spearman, regressione di Tobin).

## **4.0 Analisi, valutazione e diffusione dei risultati**

Come specificato dall'Istituto Superiore di Sanità<sup>13</sup>, “per nessun metallo sono stati ad oggi definiti i valori di riferimento in matrici come capelli e unghie”. Per questo nell'analisi dei dati e nella loro interpretazione non saranno possibili confronti con valori o intervalli di riferimento ma saranno

possibili unicamente confronti interni tra i risultati ottenuti nelle singole macroaree e nella loro aggregazione sull'intero territorio comunale.

I risultati delle analisi saranno aggregati e non saranno forniti per singolo prelievo. I dati dei singoli potranno essere forniti al Medico Curante o al Pediatra di famiglia su loro esplicita richiesta per importanti motivazioni, previa consultazione del Responsabile Scientifico dello studio.

Firmando il modulo di consenso informato, il genitore autorizza l'accesso ai dati da parte di Autorità regolatorie e del personale medico addetto al monitoraggio e alla verifica delle procedure. Questi potranno ispezionare l'archivio senza che però vi sia la possibilità di risalire all'identità personale dei singoli.

I risultati dello studio saranno oggetto di pubblicazioni a carattere divulgativo e scientifico ma l'identità dei singoli rimarrà, comunque, sempre segreta. L'esposizione dei risultati sarà in forma aggregata per macroaree e non per singoli soggetti, nel rispetto della normativa sulla privacy.

I risultati potranno essere utilizzati per confronti fra le diverse zone del territorio in esame previa georeferenziazione dei soggetti arruolati, con la possibilità di eventuali confronti con altre aree geografiche nelle quali siano stati condotti studi con metodologia comparabile.

I risultati delle determinazioni analitiche potranno essere incrociati con dati derivanti da determinazioni degli inquinanti ambientali resi disponibili dalla locale agenzia regionale per l'ambiente (ARPA) e/o con dati epidemiologici resi disponibili, su richiesta del responsabile scientifico dello studio, dalla ASL BAT.

#### **5.0 Durata prevista dello studio**

Un anno a partire dal prelievo dei campioni.

## Bibliografia

1. Hughes MF. Biomarkers of exposure: a case study with inorganic arsenic. *Environmental health perspectives* 2006; **114**(11): 1790-6.
2. Adair BM, Hudgens EE, Schmitt MT, Calderon RL, Thomas DJ. Total arsenic concentrations in toenails quantified by two techniques provide a useful biomarker of chronic arsenic exposure in drinking water. *Environmental research* 2006; **101**(2): 213-20.
3. Daniel CR, 3rd, Piraccini BM, Tosti A. The nail and hair in forensic science. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2004; **50**(2): 258-61.
4. Gonzalez A, Peters U, Lampe JW, Satia JA, White E. Correlates of toenail zinc in a free-living U.S. population. *Ann Epidemiol* 2008; **18**(1): 74-7.
5. Carneiro MF, Grotto D, Batista BL, Rhoden CR, Barbosa F, Jr. Background values for essential and toxic elements in children's nails and correlation with hair levels. *Biological trace element research* 2011; **144**(1-3): 339-50.
6. Gouille JP, Saussereau E, Mahieu L, et al. Application of inductively coupled plasma mass spectrometry multielement analysis in fingernail and toenail as a biomarker of metal exposure. *Journal of analytical toxicology* 2009; **33**(2): 92-8.
7. He K. Trace elements in nails as biomarkers in clinical research. *European journal of clinical investigation* 2011; **41**(1): 98-102.
8. Rodrigues JLG, Bandeira MJ, Araujo CFS, et al. Manganese and lead levels in settled dust in elementary schools are correlated with biomarkers of exposure in school-aged children. *Environmental pollution* 2018; **236**: 1004-13.
9. Ohlander J, Huber SM, Schomaker M, et al. Mercury and neuromotor function among children in a rural town in Chile. *International journal of occupational and environmental health* 2016; **22**(1): 27-35.
10. Loh MM, Sugeng A, Lothrop N, et al. Multimedia exposures to arsenic and lead for children near an inactive mine tailings and smelter site. *Environmental research* 2016; **146**: 331-9.
11. Uricchio V, Calabrese A, Massarelli C, et al. Protocollo d'intesa per la realizzazione di un monitoraggio ambientale nel territorio della città di Barletta - Report sintentico non tecnico. Versione 2.0.: IRSA-CNR, 2017.
12. Sanches TP, Saiki M. Establishing a protocol for element determinations in human nail clippings by neutron activation analysis. 2011 International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2011. Belo Horizonte, MG, Brazil. October 24-28: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENERGIA NUCLEAR - ABEN; 2011.
13. Alimonti A, Bocca B, Mattei D, Pino A. Biomonitoraggio della popolazione italiana per l'esposizione ai metalli: valori di riferimento 1990-2009. Roma: Istituto Superiore di Sanità, 2010.

## **Elenco degli allegati**

- **Allegato 1.** Protocollo di intese sottoscritto da International Society of Doctors for Environment (ISDE), Comune di Barletta, ASL BAT, Ordine dei Medici della provincia BAT, Dirigenti scolastici delle scuole presenti nel Comune di Barletta e associazioni ambientaliste locali (“Forum ambiente e salute”, Legambiente, GEPA guardie eco zoofile)
- **Allegato 2.** Modulo di consenso informato
- **Allegato 3.** Questionario di raccolta dati
- **Allegato 4.** Curriculum vitae del responsabile scientifico dello studio