

I metodi di analisi statistica per la valutazione degli effetti a breve termine dell'inquinamento atmosferico nel Progetto EpiAir

Methods of statistical analysis to evaluate the short term effects of air pollution for the EpiAir Project

Massimo Stafoggia,¹ Paola Colais,¹ Maria Serinelli,² per il Gruppo collaborativo EpiAir

¹ Dipartimento di epidemiologia del Servizio sanitario regionale, Regione Lazio

² Istituto fisiologia clinica, CNR Lecce

Corrispondenza: Massimo Stafoggia, e-mail: stafoggia@asplazio.it

Riassunto

Il Progetto EpiAir del CCM (Centro nazionale per la prevenzione e il controllo delle malattie) del Ministero del lavoro, della salute e delle politiche sociali, ha coinvolto 10 città italiane per il periodo 2001-2005 con i seguenti obiettivi:

- avviare un sistema di sorveglianza delle caratteristiche ambientali con rilevanza sanitaria nelle città italiane;
- raccogliere in modo sistematico i dati relativi ai fenomeni sanitari rilevanti, quali mortalità e ricoveri ospedalieri, per cui è noto l'impatto dell'inquinamento atmosferico;
- produrre rapporti con le stime degli effetti sanitari attribuibili all'inquinamento atmosferico;
- individuare i gruppi di popolazione particolarmente vulnerabili ai danni dell'inquinamento atmosferico.

Una parte consistente del progetto consiste nella stima dell'associazione tra diversi inquinanti atmosferici (PM₁₀, NO₂,

O₃) ed esiti sanitari avversi, quali la mortalità per grandi gruppi di cause e i ricoveri ospedalieri per singole patologie, o gruppi di patologie. Le analisi sono effettuate per ogni città. In una seconda fase, le stime di associazione congiunte vengono prodotte con una metanalisi a effetti casuali.

Il presente lavoro riporta nel dettaglio la metodologia statistica utilizzata nelle analisi di associazione, con particolare attenzione a: definizione e controllo dei fattori di confondimento in modelli città-specifici, stima dell'associazione tra esiti sanitari e inquinanti a diverse latenze temporali, identificazione dei sottogruppi di popolazione più suscettibili agli effetti avversi del PM₁₀, analisi della eterogeneità dei risultati città-specifici.

(*Epidemiol Prev* 2009; 33(6) suppl 1: 53-63)

Parole chiave: serie temporali, case-crossover, inquinamento

Abstract

The EpiAir Project, which is funded by the Italian Center for disease prevention and control, Ministry of Health, involves 10 Italian cities for the period 2001-2005, and has the following objectives:

- to monitor the environmental characteristics associated with relevant health effects;
- to systematically collect data on relevant health outcomes, such as mortality and hospitalizations, for which the impact of air pollution has been established;
- to report estimates of the health effects attributable to air pollution;
- to identify the subgroups of the population most vulnerable to the effects of air pollution.

An important part of the project deals with estimating the association between several air pollutants (PM₁₀, NO₂, O₃)

and adverse health outcomes, such as mortality for a broad spectrum of causes and hospital admissions for single disease diagnoses or diseases groups.

The analyses are implemented at the city level, and then pooled estimates are calculated with random-effects meta-analyses.

The present paper provides details on the statistical methodology applied, focusing on: the definition of and control for the confounding factors in the city-specific analyses, estimating the association between health outcomes and air pollution at different temporal latencies (lags), identifying population subgroups most vulnerable to PM₁₀, and analysing the heterogeneity of the city-specific results.

(*Epidemiol Prev* 2009; 33(6) suppl 1: 53-63)

Keywords: time-series, case-crossover, air pollution

Introduzione

Negli ultimi decenni studi ecologici applicati alla popolazione generale o studi di panel di pazienti caratterizzati da specifiche condizioni di salute hanno dimostrato gli effetti avversi dell'inquinamento atmosferico sulla salute. Gli esiti sanitari più frequentemente analizzati sono stati la mortalità o il ricorso a prestazioni sanitarie (ricoveri ospedalieri o accessi in pronto soccorso); il disegno di studio più sviluppato è stato quello delle serie temporali.

Nello studio di serie temporali, il numero giornaliero di eventi viene messo in relazione con la concentrazione giornaliera degli inquinanti, tenendo conto in un modello statistico di diversi fattori di confondimento. Poiché la variabile di esposizione è comune a tutti gli individui nello stesso giorno e la variabilità di interesse è quella dell'esposizione nel breve periodo, ne consegue che tutti i fattori individuali di tipo socio-demografico o clinico non sono per definizione confondenti della relazione tra inquinamento ed esito, in quanto variano in misura minima di giorno in giorno, e dunque non devono essere considerati in fase di analisi.

Al contrario, tutte le variabili tempo-dipendenti potenzialmente correlate con l'esito e associate ai livelli giornalieri di inquinamento atmosferico devono essere rilevate e controllate per ottenere stime non distorte dell'associazione. Tra queste variabili, di importanza notevole è il trend temporale di medio e lungo periodo, che include tutti quei fattori ignoti o non rilevati che mostrano un andamento stagionale o secolare in qualche modo collineare con le variazioni di inquinamento e di mortalità/ricoveri.

Gran parte degli sviluppi metodologici degli ultimi anni si è concentrata sulla modellazione del trend temporale. Nei primi approcci di analisi dello studio APHEA¹ gli autori utilizzavano termini di seno e coseno con periodicità annuale, finalizzati a tenere conto dell'andamento ciclico stagionale e di lungo periodo del trend temporale. Successivamente, l'introduzione dei modelli lineari generalizzati (GLM)² e dei modelli additivi generalizzati (GAM)³ ha portato all'utilizzo di funzioni più flessibili, quali le spline di regressione a pesi definiti su finestre mobili (Loess),⁴ le spline di regressione cubiche⁵ e, più recentemente le spline penalizzate.⁶

Tutti questi metodi si distinguono per la modalità con cui vengono selezionati i gradi di libertà, e dunque il livello di curvatura del trend, per il posizionamento dei nodi che definiscono i punti di curvatura e per l'eventuale utilizzo di termini non parametrici finalizzati a evitare un eccessivo adattamento della curva ai dati (*overfitting*).

Sebbene i diversi approcci si siano rivelati pressoché equivalenti per il controllo del confondimento dovuto al trend temporale, nella letteratura scientifica il dibattito sui vantaggi e svantaggi di ognuno di essi, sulle assunzioni a essi soggiacenti e sulla necessità di effettuare analisi di sensibilità con metodologie alternative è rimasto acceso. In que-

sto quadro si è inserito l'approccio *case-crossover* come metodologia alternativa alle analisi di serie temporali.⁷

Il *case-crossover* è un disegno caso-controllo appaiato in cui per ogni esito in studio (decesso o ricovero ospedaliero) si valuta l'esposizione nel giorno in cui l'esito si è verificato e in giorni di controllo in cui l'evento non si è verificato. Poiché ogni caso è appaiato con se stesso in giorni sufficientemente vicini, ne consegue che tutte le variabili fisse, o che variano solo lentamente nel tempo, non sono per definizione confondenti della relazione tra esposizione ed esito. Dunque la selezione dei giorni di controllo consente di aggiustare per il trend temporale con il disegno stesso dello studio, senza dover ricorrere a tecniche sofisticate di modellazione nel modello di regressione.

E' stato recentemente dimostrato⁸ che i due disegni, *case-crossover* e serie temporali, danno luogo a stime di associazione identiche, sotto determinate condizioni. In particolare questo è vero quando l'aggiustamento del trend temporale operato nelle serie temporali all'interno del modello di regressione è analogo all'aggiustamento realizzato nel *case-crossover* tramite opportuna selezione dei giorni di controllo.

Nella progettazione dell'analisi statistica dei dati del Progetto EpiAir ci si è avvalsi della dimostrata equivalenza dei due approcci per adottare entrambi in modo alternativo, sfruttandone i vantaggi reciproci. In particolare sono stati applicati i modelli GAM di serie temporali nell'analisi della relazione tra esposizione ed esito alle diverse latenze temporali (*lag*), mentre sono stati applicati modelli di regressione logistica condizionata nell'ambito dell'approccio *case-crossover* per l'analisi dei fattori individuali di suscettibilità agli effetti del particolato sospeso.

Nel seguito vengono esposti i metodi statistici di analisi adottati nel Progetto EpiAir, con particolare enfasi su:

- la distinzione tra i due disegni di studio;
 - il controllo dei fattori di confondimento tempo-dipendenti;
 - la stima di associazione tra gli inquinanti atmosferici e gli esiti sanitari a diverse latenze temporali;
 - l'analisi della modificazione dell'effetto del PM10 sulla mortalità naturale dovuta alle caratteristiche del soggetto.
- Si è cercato di rendere chiare le tecniche di metanalisi adottate per la stima di effetti congiunti e i problemi nell'interpretazione dei parametri di eterogeneità delle stime delle singole città.

Materiali e metodi

Popolazione di studio

La popolazione in studio è costituita dai soggetti residenti in 10 città (Bologna, Cagliari, Firenze, Mestre-Venezia, Milano, Palermo, Pisa, Roma, Taranto e Torino) e deceduti per cause naturali o ricoverati nella stessa città di residenza, tra il 2001 ed il 2005.

Sono stati raccolti dati su 276,205 decessi (età 35+ anni) e

685,458 ricoveri urgenti (tutte le età). Tutte le unità in studio (soggetti deceduti o episodi di ricovero) sono state inoltre collegate agli archivi ospedalieri per identificare la presenza di condizioni croniche e acute sulla base dei ricoveri precedenti.

Maggiori dettagli sulle popolazioni e gli esiti in studio sono descritti negli articoli di Galassi et al. (pagina 43), Stafoggia et al. (pagina 65), Colais et al. (pagina 77) e relativi, rispettivamente, alla qualità dei dati sanitari, ai risultati delle analisi di mortalità e ai risultati delle analisi dei ricoveri ospedalieri.

Variabili ambientali

Per ogni città, le reti telematiche ufficiali regionali (ARPA) o comunali hanno fornito dati orari di monitoraggio da più centraline localizzate sul territorio cittadino relativamente a: particolato atmosferico con diametro aerodinamico inferiore a 10 micron (PM10), biossido di azoto (NO₂) e ozono (O₃).

L'Aeronautica militare, l'Ente nazionale assistenti di volo (ENAV) e l'Osservatorio meteorologico locale (per la città di Taranto) hanno fornito i dati relativi ai principali parametri meteorologici utili per il controllo del confondimento nell'analisi statistica dei dati, relativamente a temperatura dell'aria (°C), umidità relativa (%), temperatura al punto di rugiada (Dew Point, °C) e pressione barometrica al livello del mare (hPa).

Infine, temperatura dell'aria e temperatura al punto di rugiada sono state combinate in un indicatore di «temperatura apparente». ^{9,10} Maggiori dettagli sulle variabili ambientali sono riportati nell'articolo di Berti et al. (pagina 13).

Metodi di analisi

Disegno dello studio

L'analisi dell'associazione tra inquinamento atmosferico ed esiti sanitari avversi (mortalità, ricoveri ospedalieri) è stata elaborata mediante l'applicazione di due disegni alternativi ed equivalenti: il disegno di serie temporali (per l'analisi della relazione tra inquinamento ed esiti sanitari a diverse latenze temporali) e l'approccio *case-crossover* ⁷ (per l'analisi dei fattori di suscettibilità nella relazione tra particolato sospeso e mortalità naturale).

Il disegno *case-crossover* è un particolare tipo di studio caso-controllo appaiato in cui i controlli, per ogni caso, sono definiti come giorni in cui non si è verificato l'evento in studio. In quanto disegno caso-controllo, la metodologia statistica di analisi consiste in un modello logistico condizionato multivariato ¹¹ in cui la variabile di esito è dicotomica (caso verso controlli), la variabile di esposizione è la concentrazione giornaliera dell'inquinante e lo strato è definito dal singolo soggetto deceduto (per la mortalità) o dal singolo episodio di ricovero ospedaliero (per le ospedalizzazioni).

Tale approccio è stato originariamente utilizzato nello studio della relazione tra attività fisica e insorgenza di infarto

miocardico acuto ⁷ e solo successivamente è stato esteso all'ambito dell'epidemiologia ambientale per studiare gli effetti acuti dell'inquinamento atmosferico e delle temperature estreme su mortalità e ricoveri ospedalieri. ¹²⁻¹⁴

La parte più critica nell'approccio *case-crossover* consiste nella scelta dei giorni di controllo. In letteratura sono stati proposti diversi metodi alternativi, riassumibili nelle seguenti categorie:

- approccio «uni-direzionale» ⁷ (i controlli sono selezionati tutti prima dell'evento in studio);

- approccio «bi-direzionale» ^{12,13} (i controlli sono selezionati in maniera simmetrica prima e dopo l'evento);

- approccio «stratificato per tempo» ¹⁵ (*time-stratified*: i controlli sono selezionati prima e dopo l'evento in studio all'interno di strati temporali definiti a priori).

Il primo dei tre approcci si basa sull'assunzione che solo i periodi antecedenti l'evento siano indipendenti dal verificarsi dell'evento stesso, mentre quelli successivi possono esserne influenzati e dunque modificare la probabilità di esposizione del soggetto. Questo è vero nel caso di esposizioni individuali direttamente collegate all'esito (attività fisica e infarto), ma non si applica in situazioni in cui l'esposizione è di carattere ambientale (concentrazione di un inquinante rilevata da centraline fisse di monitoraggio), dunque non è influenzata dai comportamenti individuali. D'altro canto, è stato dimostrato che se la variabile di esito e quella di esposizione sono caratterizzate da un trend temporale stagionale e di medio-lungo periodo, la sistematica selezione di giorni di controllo tutti antecedenti (o tutti successivi) l'evento stesso può condurre a una marcata distorsione nelle stime di associazione. ^{12,13}

Questo ha motivato l'introduzione dell'approccio bi-direzionale, finalizzato a bilanciare gli effetti del trend temporale tramite una simmetrica selezione dei giorni di controllo prima e dopo l'evento stesso. Tuttavia, poiché requisito fondamentale della regressione logistica condizionata è che il caso (ovvero il giorno in cui si verifica l'evento) sia disposto in maniera casuale all'interno del *risk-set* (il giorno del caso + i giorni di controllo), l'approccio bi-direzionale viola questa condizione in quanto il caso è posto necessariamente al centro. ¹⁵ Ciò impedisce una corretta stima dell'associazione tra esito ed esposizione in quanto la funzione di verosimiglianza è mal formulata.

Come soluzione al problema è stato proposto l'approccio *time-stratified*, che consiste nel suddividere il periodo in studio in finestre temporali disgiunte e nel selezionare, per ogni caso all'interno di ogni finestra, tutti gli altri giorni, o un campione di essi, come controlli. Questo ovvia ai problemi degli approcci uni-direzionale e bi-direzionale minimizzando la distorsione nella stima di associazione.

E' stato recentemente dimostrato che la stima dell'associazione tra esposizione ed esito ottenuta con il disegno *case-crossover* è identica a quella ottenuta con un approccio di se-

rie-temporale, quando l'esposizione è comune a tutti gli individui nella stessa unità di tempo (per esempio, il giorno).⁸ Questo avviene, nel caso degli studi qui presentati, quando i livelli di inquinamento non sono differenti per ciascun individuo, in quanto sono definiti da centraline urbane come livelli di esposizione uguali per tutti i soggetti in studio.

L'unica differenza tra i due metodi consiste nella modalità di aggiustamento del trend temporale di medio-lungo periodo: qualora il trend temporale venga modellato negli studi di serie temporali in modo analogo all'aggiustamento che il *case-crossover* effettua grazie al disegno dello studio, i due metodi sono equivalenti in quanto hanno identiche funzioni di verosimiglianza e dunque producono la stessa stima puntuale dei coefficienti di regressione e la stessa stima degli errori standard.

In termini formali, definiamo come Y_{it} la variabile di esito, che indica se il soggetto i ha sperimentato l'esito (decesso o ricovero ospedaliero) nel giorno t ($Y_{it}=1$) oppure no ($Y_{it}=0$), e definiamo come X_t l'esposizione (ovvero la concentrazione giornaliera di inquinante) nel giorno t (comune a tutti gli individui, e dunque priva del suffisso «i»). Assumendo che l'esito sia raro, la probabilità che l'individuo i sperimenti l'evento nel giorno t è data da:

$$\lambda_i(t, X_t, C_t) = \lambda_{0it} \exp(\beta X_t + \delta C_t) = \lambda_{0i} \exp(\beta X_t + \delta C_t + \gamma_{it}) \quad (1)$$

dove la componente individuale di rischio di base (*baseline*) λ_{0it} al tempo t è costituita da due parti: λ_{0i} , fattore soggetto-specifico che tiene conto delle caratteristiche dell'individuo non legate al tempo (come la vulnerabilità) ed $\exp(\gamma_{it})$ che rappresenta l'effetto di fattori tempo-dipendenti non misurati o ignoti, sul rischio di base del soggetto stesso.

Si assume che l'esposizione X_t abbia un effetto comune su ogni soggetto, misurata dal log(rischio relativo) β . Infine, C_t rappresenta l'insieme di fattori di confondimento giorno-specifici e δ il relativo vettore di coefficienti.

Disegno case-crossover

L'esposizione del caso nel giorno t viene confrontata con quella dei relativi controlli, per ogni individuo i . Seguendo la notazione di Lu e Zeger,⁸ si denoti con $W(t_i)$ l'insieme dei giorni di controllo per l'individuo i -esimo.

Il disegno *case-crossover* si basa sull'assunzione che i fattori tempo-dipendenti γ_{ij} siano costanti per tutti i valori di j all'interno della finestra temporale $W(t_i)$.

La probabilità di un individuo i di sperimentare l'evento al tempo t può essere espressa come:

$$p_{it} = \frac{\exp(\beta X_t + \delta C_t)}{\sum_{j \in W(t_i)} \exp(\beta X_j + \delta C_j)} \quad (2)$$

dove gli effetti individuali fissi λ_{0i} e tempo-dipendenti γ_{ij} si annullano in virtù della suddetta assunzione. Il parametro di interesse è β , che si stima mediante i consueti metodi di massimizzazione della funzione di verosimiglianza soggiacente al modello di probabilità espresso nell'equazione (2).

Analisi di serie temporali di Poisson

Il numero osservato di eventi nel giorno t può essere espresso da $Y_t = \sum_{i \in I} Y_{it}$ e il numero di eventi attesi (μ_t) da:

$$\mu_t = \sum_{i \in I} \lambda_i(t, X_t, C_t) = \exp(\beta X_t + \delta C_t) \sum_{i \in I} \lambda_{0it} = \exp(\beta X_t + \delta C_t + S_t) \quad (3)$$

dove I rappresenta la popolazione totale in studio, S_t è una funzione di «disturbo» (*nuisance*) pari al logaritmo del rischio *baseline* totale al giorno t , ottenuto dall'integrazione dei rischi *baseline* individuali. Essa viene solitamente modellata come funzione «liscia» del tempo tramite tecniche di regressione parametrica (*spline* di regressione) o non parametrica (*spline* penalizzate).

E' dimostrabile che, qualora la modellazione del termine S_t nell'approccio a serie temporali rifletta la strategia di selezione dei giorni di controllo nel disegno *case-crossover*, le funzioni di verosimiglianza soggiacenti ai modelli (2) e (3) danno luogo a identiche equazioni di stima, e dunque:⁸

$$\beta_{\text{case-crossover}} = \beta_{\text{serie temporali}}$$

La strategia *time-stratified* per la selezione dei controlli adottata nel presente lavoro consiste nella scelta di giorni di controllo appaiati per giorno della settimana con il giorno in cui si è verificato il caso, all'interno dello stesso mese e anno in cui il caso si verifica. Ciò equivale alla definizione di strati mensili disgiunti dell'asse temporale (i mesi di calendario) e alla stima di un rischio *baseline* diverso per ogni giorno della settimana all'interno di ogni strato.

In altri termini, l'aggiustamento per disegno dello studio del *case-crossover* con strategia *time-stratified* equivale a un aggiustamento da modello nell'approccio a serie temporali in cui il trend temporale viene modellato all'interno di un modello lineare generalizzato di Poisson con un'interazione tripla di anno, mese e giorno della settimana dell'evento.^{8,15}

Analisi statistica

L'analisi statistica del progetto si articola in:

- analisi città-specifica per l'aggiustamento dei fattori di confondimento tempo-dipendenti;
- analisi città-specifica dell'associazione tra mortalità (naturale e causa-specifica) o tra ricoveri ospedalieri patologia-specifici, e inquinanti, a diversi lag;
- analisi città-specifica della modificazione d'effetto (per la relazione PM10-mortalità naturale);
- metanalisi dei risultati città-specifici.

Analisi città-specifica per l'aggiustamento dei fattori di confondimento tempo-dipendenti

Sulla base delle scelte operate nel progetto SISTI,^{16,17} e in coerenza con quanto operato nei progetti MISA¹⁸ e MISA-2,¹⁹ si è definito un modello di aggiustamento per il confondimento comune a tutte le città, in modo da ottenere stime d'effetto confrontabili.

La scelta del *set* di variabili di confondimento si è basata sia sui dati di letteratura sia su criteri statistici di bontà di adattamento del modello. Sono stati così definiti un primo *set* di variabili di aggiustamento, che è stato «forzato» nel modello a prescindere dalla significatività statistica nelle situazioni in studio, e un *set* minore di variabili, che è stato inserito dopo valutazione statistica in ogni città. Il primo *set* comprende il trend temporale di medio-lungo periodo, il decremento estivo di popolazione, i giorni di festa, le epidemie influenzali, le basse temperature e le elevate temperature. Il secondo *set* comprende solo la pressione barometrica.

Controllo del confondimento temporale di medio-lungo periodo - Il controllo del confondimento legato all'andamento temporale di medio-lungo periodo è stato effettuato selezionando all'interno di ogni mese gli stessi giorni della settimana del caso come giorni di controllo (seguendo l'approccio *time-stratified* del disegno *case-crossover*), ovvero nell'approccio a serie temporali inserendo nel modello di regressione di Poisson un'interazione tripla di anno, mese e giorno della settimana.

Dunque, poiché il periodo in studio è di 5 anni, sono state aggiunte $5 \times 12 \times 7 = 420$ variabili indicatrici.

Controllo del confondimento legato al decremento estivo di popolazione e ai giorni di festa - Per poter tener conto delle fluttuazioni nei decessi e nei ricoveri, che possono comportare una sottostima dell'effetto sulla mortalità/morbosità, sono state definite tre variabili:

- la variabile «decremento estivo di popolazione», a tre livelli, che assume valore 2 nelle due settimane intorno a Ferragosto (dal sabato precedente alla domenica successiva, per un totale di 16 giorni/anno); valore 1 dal 16 luglio al 31 agosto (con eccezione dei giorni in cui assume valore 2); valore 0 per i restanti giorni dell'anno; tale variabile è stata utilizzata sia nell'analisi della mortalità sia nell'analisi dei ricoveri ospedalieri;
- una variabile a due livelli che assume il valore 1 per tutte le festività, comprese le feste patronali delle singole città (escluse quelle che cadono di domenica) e 0 altrimenti; tale variabile è stata utilizzata solo nell'analisi della mortalità;
- una variabile a quattro livelli che assume il valore 3 nei dintorni di Natale e Pasqua, valore 2 nei giorni di Natale e di Pasqua, valore 1 per tutte le altre festività, comprese le feste patronali delle singole città (escluse quelle che cadono di

domenica) e 0 altrimenti; tale variabile è stata utilizzata solo nell'analisi dei ricoveri ospedalieri.

Controllo per le epidemie influenzali - Nel periodo in studio (2001-2005) era attivo il sistema di sorveglianza della sindrome influenzale Influnet, promosso dal Ministero della salute che si avvale della collaborazione dell'Istituto superiore di sanità (ISS), del Centro interuniversitario per la ricerca sull'influenza (CIRI), dei medici di medicina generale e pediatri di libera scelta, dei laboratori di riferimento per l'influenza e degli assessorati regionali alla sanità. L'obiettivo è registrare i casi di influenza per stimare l'incidenza settimanale della sindrome influenzale durante la stagione invernale, in modo da stimare durata e intensità dell'epidemia.

Nel presente studio, il controllo per le epidemie influenzali è stato modellato con una variabile dicotomica che assume valore 1 nel periodo tri-settimanale di picco annuale delle epidemie invernali di influenza (come definito dall'ISS) e 0 nei restanti giorni dell'anno. La **tabella 1** riporta per ogni città e anno i giorni di epidemia influenzale.

Controllo del confondimento legato alla temperatura - Molteplici evidenze di letteratura mostrano una forte associazione tra le temperature estreme e gli esiti sanitari avversi, quali la mortalità^{14,20} e i ricoveri ospedalieri.²¹ Le basse temperature hanno un effetto prolungato che si manifesta fino a diverse settimane dopo l'esposizione e una relazione esposizione-risposta di tipo pressoché lineare. L'effetto delle elevate temperature è invece più immediato, con una forma della relazione di tipo esponenziale, che cresce sempre più velocemente all'aumentare delle temperature. Per queste ragioni, e in coerenza con le scelte operate nel progetto SISTI,^{16,17} nel presente studio:

- il confondimento dovuto alle basse temperature è stato aggiustato con una *spline* penalizzata per la temperatura (lag 1-6), nei giorni in cui la stessa è inferiore al suo valore mediano (sulla base delle distribuzioni città-specifiche);
- il confondimento dovuto alle alte temperature è stato aggiustato con una *spline* penalizzata della temperatura apparente (lag 0-1), nei giorni in cui la stessa è superiore al suo valore mediano (sulla base delle distribuzioni città-specifiche).

Le *spline* penalizzate sono curve semi-parametriche in cui il numero di gradi di libertà, e quindi il livello di curvatura, viene stimato in modo tale da cogliere le principali fluttuazioni della relazione funzionale tra le variabili in studio (temperatura e mortalità/ricoveri in questo caso), senza tuttavia approssimare eccessivamente i dati (*overfitting*).^{3,6}

Controllo del confondimento legato alla pressione barometrica - Il confondimento dovuto alla pressione barometrica è stato aggiustato con una *spline* penalizzata.

Città	Giorni di epidemia influenzale				
	2001	2002	2003	2004	2005
Milano	5/02-25/02	21/01-10/02	17/02-9/03	2/02-22/02	31/01-20/02
Mestre-Venezia	5/02-25/02	28/01-17/02	17/02-9/03	19/01-8/02	31/01-20/02
Torino	29/01-18/02	21/01-10/02	17/02-9/03	26/01-8/02 16/02-22/02	31/01-20/02
Bologna	5/02-25/02	21/01-10/02	17/02-9/03	26/01-8/02 16/02-22/02	31/01-20/02
Firenze	5/02-25/02	21/01-10/02	17/02-9/03	26/01-15/02	31/01-20/02
Pisa	5/02-25/02	21/01-10/02	17/02-9/03	26/01-15/02	31/01-20/02
Roma	5/02-25/02	21/01-10/02	10/02-2/03	9/02-29/02	24/01-30/01 7/02-20/02
Taranto	5/02-25/02	21/01-10/02	17/02-9/03	8/03-28/03	24/01-13/02
Cagliari		24/02-16/03	24/02-16/03	19/01-25/01 2/02-8/02 16/02-22/02	7/02-27/02
Palermo		21/01-10/02	17/02-9/03	2/02-8/02 16/02-29/02	7/02-27/02

Tabella 1. Giorni di epidemia influenzale, per anno e città.

Table 1. Days of influenza epidemics, by year and city.

Analisi città-specifica dell'associazione tra mortalità/ricoveri ospedalieri e inquinanti, a diversi lag

Una volta identificato il set comune di variabili di confondimento, si è proceduto alla stima dell'associazione tra inquinanti atmosferici (PM10, NO₂, O₃) e:

■ mortalità per gruppi di cause (cause naturali, ICD9-CM: 1-799; cause cardiache, ICD9-CM: 390-429; cause cerebrovascolari, ICD9-CM: 430-438; cause respiratorie, ICD9-CM: 460-519);

■ ricoveri per gruppi di malattie (malattie cardiache, ICD9-CM: 393-429; malattie cerebrovascolari, ICD9-CM: 430-438; flebiti e tromboflebiti, ICD9-CM: 451-453; embolia polmonare, ICD9-CM: 415.1; malattie respiratorie, ICD9-CM: 460-519; diabete complicato, ICD9-CM: 250.1-250.9; cause accidentali, ICD9-CM: 800-999).

Sono stati implementati modelli additivi generalizzati (GAM)³ città-specifici a lag distribuiti vincolati e non vincolati.^{22,23}

Lo scopo principale dei modelli a lag distribuiti vincolati consiste nell'esplorazione grafica dell'associazione tra l'inquinante e l'esito a diversi giorni dall'esposizione (latenze temporali o lag), al fine di discriminare tra effetti immediati (effetti elevati all'inizio e tendenti a zero nei giorni successivi), ritardati (effetti prossimi allo zero all'inizio e crescenti nei giorni successivi), o prolungati (effetti apprezzabili per più giorni consecutivi).

Da un punto di vista operativo, il modello a lag distribuiti vincolati consiste nell'inserire nel modello GAM tanti termini dell'inquinante quanti sono i giorni che si vogliono valutare, nello stimare i coefficienti, e nell'imporre a tali coefficienti di seguire una forma scelta a priori (sulla base di evidenze di letteratura o considerazioni teoriche), generalmente di tipo polinomiale.

La scelta di vincolare l'andamento temporale dell'associazione

ne tra concentrazione dell'inquinante ed esiti sanitari a seguire un andamento polinomiale deriva dalla considerazione che esiste una sostanziale correlazione tra le concentrazioni rilevate in giorni vicini che potrebbe rendere instabili le stime ottenute dal modello non vincolato.

Nel presente studio abbiamo scelto di esplorare la relazione tra inquinante e mortalità/morbidità fino a lag 6, scegliendo un contrasto polinomiale di terzo grado, ritenuto sufficiente a cogliere eventuali non linearità nella forma dell'associazione. A partire dalla formulazione in (3), il termine βX_t è stato espanso in:

$$\beta_0 X_t + \beta_1 X_{t-1} + \beta_2 X_{t-2} + \beta_3 X_{t-3} + \beta_4 X_{t-4} + \beta_5 X_{t-5} + \beta_6 X_{t-6} \quad (4)$$

dove i termini $X_t, X_{t-1}, \dots, X_{t-6}$ rappresentano i livelli di concentrazione giornaliera dell'inquinante nel giorno dell'evento, nel giorno precedente, e così via, fino a 6 giorni precedenti l'evento stesso e i coefficienti $\beta_k, k = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6$ sono stati vincolati a seguire l'andamento polinomiale cubico:

$$\beta_k = \eta_0 k^0 + \eta_1 k^1 + \eta_2 k^2 + \eta_3 k^3 \quad (5)$$

in cui i coefficienti di interesse da stimare diventano i parametri $\eta_0, \eta_1, \eta_2, \eta_3$ e i corrispondenti parametri β_k si ottengono per trasformazione inversa.²⁴

Una volta esplorata la relazione inquinante-esito con i modelli a lag distribuiti vincolati, si è proceduto a implementare dei modelli a lag distribuiti non vincolati allo scopo di fornire stime di associazione non distorte per esposizioni cumulate di più giorni. Come anticipato, i modelli non vincolati consistono nell'aggiunta dei termini dell'inquinante ai diversi lag, come da modello (4), stimandone i coefficienti senza imporre alcun vincolo alla forma funzionale.

Sebbene i singoli coefficienti abbiano andamenti molto instabili per la forte correlazione dei livelli di inquinamento relativi a giorni contigui, è stato dimostrato che la somma di tali coefficienti (e la somma dei corrispondenti termini di varianza e covarianza) fornisce una stima non distorta della associazione tra esposizione ed esito (e della varianza), cumulata ai diversi giorni inseriti nel modello.

L'associazione fra i tre inquinanti e i diversi esiti (mortalità e ricoveri) è stata stimata per intervalli temporali scelti a priori che permettessero di descrivere un effetto immediato (lag 0-1), ritardato (lag 2-5) e prolungato (lag 0-5). In aggiunta, per i soli ricoveri ospedalieri sono stati stimati anche modelli al lag 0.

L'analisi dell'associazione tra esiti sanitari e ozono è stata ristretta al solo semestre «caldo», definito a priori come quello da aprile a settembre, perché in questo periodo l'ozono presenta concentrazioni apprezzabili.

I risultati sono espressi come incrementi percentuali del rischio di morire o di essere ricoverati, e relativi intervalli di confidenza al 95%, per incrementi di 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ della concentrazione di ciascun inquinante.

Analisi città-specifica della modificazione d'effetto

L'analisi della modificazione di effetto dovuta a caratteristiche individuali è stata eseguita con modalità analoghe a quanto riportato nello studio SISTI.^{16,17} In particolare, le caratteristiche individuali demografiche (età e genere), il luogo del decesso e le condizioni croniche sono stati valutati come potenziali modificatori dell'associazione tra PM10 e mortalità naturale, mentre l'analisi dei modificatori di effetto sulla mortalità relativa all' NO_2 e all' O_3 è oggetto di lavori scientifici in preparazione.

In termini operativi, la modificazione d'effetto relativa (REM) è stata analizzata valutando la differenza tra il coefficiente dell'associazione tra inquinante e mortalità in uno strato del presunto modificatore d'effetto e il coefficiente dello strato di riferimento della stessa variabile (nel caso delle variabili relative alle condizioni croniche, si è confrontata la presenza delle patologie rispetto all'assenza, considerata come categoria di riferimento).

Il relativo valore di probabilità (p-value) è stato determinato assumendo che la differenza dei coefficienti si distribuisce secondo una legge di probabilità Normale con valore centrale zero, e con varianza pari alla somma delle varianze dei coefficienti dei due strati:

$$\beta_{DIFF} = \beta_{STRATO} - \beta_{REF} \quad (6)$$

$$\text{var}(\beta_{DIFF}) = \text{var}(\beta_{STRATO}) + \text{var}(\beta_{REF}) \quad (7)$$

$$\beta_{DIFF} \sim N(0, \text{var}(\beta_{DIFF})) \quad (8)$$

Nell'interpretare i risultati dei test di modificazione di effetto sono stati stabiliti i seguenti criteri:

■ qualora il p-value di modificazione relativa di effetto (p-REM) fosse inferiore a 0.05 si è concluso per la presenza di modificazione d'effetto, a prescindere dalla forza della associazione strato-specifica;

■ qualora il p-value fosse compreso tra 0.05 e 0.20, si è concluso per un risultato suggestivo di modificazione d'effetto in presenza di una stima puntuale dell'associazione nello strato almeno doppia rispetto a quella dello strato di riferimento, oppure in presenza di una stima dello strato statisticamente significativa;

■ nel caso di un possibile modificatore d'effetto a più strati, il trend dose-risposta tra gli strati è stato considerato come ulteriore criterio di conferma della modificazione d'effetto (come nel caso del numero di condizioni croniche).

In tutti gli altri casi, non si è ritenuto di poter concludere per una modificazione di effetto.

Tra le caratteristiche individuali del soggetto, l'età è un forte determinante della mortalità ed è inoltre associata a gran parte degli altri modificatori d'effetto studiati.

I risultati dell'analisi per gli altri fattori individuali sono stati quindi standardizzati per età, con pesi pari alla distribuzione per età della popolazione totale di tutte le 10 città. In altri termini, nell'analisi dell'effetto in uno specifico sottogruppo (per esempio i maschi), l'effetto dell'inquinante è stato stimato come media pesata dell'effetto nei maschi di 35-64, 65-74, 75-84, e 85+ anni, con pesi pari alla frequenza relativa di gruppi di età 35-64, 65-74, 75-84, e 85+ anni nella popolazione (sia maschile sia femminile) delle 10 città complessivamente. Lo stesso è stato realizzato per tutti gli altri sottogruppi.

In termini formali, le stime standardizzate per età sono state ottenute secondo le seguenti formule:

$$\beta_{STD}^M = \frac{\omega_{35-64}\beta_{35-64}^M + \omega_{65-74}\beta_{65-74}^M + \omega_{75-84}\beta_{75-84}^M + \omega_{85+}\beta_{85+}^M}{\omega_{35-64} + \omega_{65-74} + \omega_{75-84} + \omega_{85+}} \quad (9)$$

dove β_{STD}^M rappresenta il coefficiente standardizzato per età dello strato M del modificatore in esame (per esempio, i maschi per il genere), i termini β rappresentano le stime età-specifiche per quella categoria, e i coefficienti ω sono i pesi, pari alle frequenze relative di soggetti deceduti delle 4 classi di età sul totale dei deceduti nelle 9 città in studio (le 10 originali meno Cagliari).

Metanalisi dei risultati città-specifici

I risultati delle singole città sono stati utilizzati in una metanalisi a effetti casuali, usando il metodo della massima verosimiglianza.²⁵

Si indichino con $\hat{\beta}_1, \hat{\beta}_2, \dots, \hat{\beta}_{10}$ le stime dei coefficienti di regressione relativi all'associazione tra un inquinante e l'esito

to in studio (mortalità o ricoveri ospedalieri) nelle 10 città partecipanti al progetto, e siano $\hat{\sigma}_1, \hat{\sigma}_2, \dots, \hat{\sigma}_{10}$ le stime dei rispettivi errori standard. I metodi di metanalisi si distinguono in due classi: il metodo a effetti fissi e il metodo a effetti casuali.

Metanalisi a effetti fissi - Il metodo a effetti fissi si basa sull'assunzione che l'effetto dell'inquinante sia omogeneo nelle varie città, e che dunque non vi sia variabilità tra città in quanto le uniche differenze fra esse sono ascrivibili al caso. Una stima globale dell'associazione in studio può essere dunque ottenuta come media pesata delle stime città-specifiche, dove i pesi sono funzione esclusivamente dalla variabilità delle singole stime. Diverse formulazioni dei pesi conducono a stime diverse. Il metodo più comunemente adottato è quello della massima verosimiglianza:

$$\hat{\beta}_{FE}^{ML} = \frac{\sum_{j=1}^{10} \omega_j \hat{\beta}_j}{\sum_{j=1}^{10} \omega_j} \quad (10)$$

in cui il termine $\hat{\beta}_{FE}^{ML}$ rappresenta la stima congiunta a effetti fissi (*fixed effects*, FE) ottenuta con il metodo della massima verosimiglianza (*maximum likelihood*, ML), e i pesi ω_j sono pari a $1/\sigma_j^2$, l'inverso della varianza stimata città-specifica. La varianza dello stimatore a effetti fissi è data:

$$\left[\sum_{j=1}^{10} \omega_j \right]^{-1} \quad (11)$$

Metanalisi a effetti casuali - Il metodo a effetti casuali assume che l'effetto dell'inquinante sia eterogeneo tra le varie città, e che dunque oltre alle differenze casuali nelle stime città-specifiche (variabilità entro città) vi sia una fonte aggiuntiva di variabilità data dalla eterogeneità dell'associazione (variabilità tra città). Dunque l'effetto congiunto dell'inquinante sull'esito e la sua varianza sono analoghi a quelli in (10) e (11), ma la definizione dei pesi tiene conto della variabilità tra città:

$$\omega_j = \frac{1}{\hat{\sigma}_j^2 + \hat{\tau}^2}$$

dove il termine $\hat{\tau}^2$ è una stima dell'eterogeneità tra città: più elevato il valore, più le stime città-specifiche sono diverse e la stima congiunta a effetti casuali diverge dalla stima a effetti fissi; più basso $\hat{\tau}^2$, più le stime di associazione tra inquinante ed esito delle diverse città sono omogenee e la stima a effetti casuali si avvicina a quella a effetti fissi.

Nel presente studio, per stimare la varianza tra città è stato

adottato il metodo di DerSimonian e Laird,²⁶ che si basa sulla statistica test Q di omogeneità:

$$Q = \sum_{j=1}^{10} \omega_j (\hat{\beta}_j - \hat{\beta}_{FE}^{ML})^2 \sim \chi^2_{10-1} \quad (12)$$

$$\hat{\tau}^2 = \max \left\{ 0, \frac{Q - (10 - 1)}{\sum_{j=1}^{10} \omega_j - \frac{(\sum_{j=1}^{10} \omega_j)^2}{\sum_{j=1}^{10} \omega_j}} \right\} \quad (13)$$

La statistica test Q riportata nella formula (12) è stata utilizzata per testare l'ipotesi nulla di omogeneità delle stime città-specifiche, e i relativi p-value sono stati calcolati sulla base della distribuzione χ^2 di Q .

Interpretazione dell'eterogeneità - La statistica Q è una misura dell'eterogeneità delle stime delle diverse città: essa quantifica il grado di scostamento delle stime di associazione città-specifiche dalla stima congiunta a effetti fissi, ovvero quella che si ottiene in caso di perfetta omogeneità. Sotto l'ipotesi nulla di uguaglianza delle stime delle diverse città, la statistica Q segue una legge di probabilità χ^2 con numero di gradi di libertà pari al numero delle città meno 1 (9 nel presente caso).

Se Q è maggiore del $100 \times (1 - \alpha)$ percentile della distribuzione χ^2 , l'ipotesi di uguaglianza delle stime viene rigettata. In tal caso si conclude che le stime città-specifiche hanno origine da due o più distinte popolazioni, e dunque la stima congiunta non ha altro significato se non quello di effetto medio di realtà diverse tra di loro. Il comportamento da adottare consiste, allora, nell'esplorare le fonti dell'eterogeneità oppure limitarsi a fornire una stima congiunta a effetti casuali, che tiene conto della componente di variabilità dovuta alle differenze tra le città. Nel presente progetto è stato adottato questo secondo approccio, senza approfondire l'analisi delle fonti di eterogeneità in quanto l'esiguo numero di città coinvolte non garantiva una potenza sufficiente a identificare fattori esplicativi.

Viceversa, se Q è minore del $100 \times (1 - \alpha)$ percentile, l'ipotesi di omogeneità delle stime non può essere rigettata, dunque si assume che le stime città-specifiche provengono da un'unica popolazione e condividono un effetto comune, fornito dalla stima metanalitica a effetti fissi. In questo caso la stima metanalitica rappresenta davvero una sintesi degli effetti città-specifici, che possono differire da essa solo per oscillazioni casuali.

Negli articoli analitici di questo supplemento, per tutte le stime metanalitiche è riportato il p-value di eterogeneità (p-het) ottenuto dalla distribuzione della statistica Q : valori bassi di p-het (inferiori a 0.05) supportano l'ipotesi al-

Città	PM10			NO ₂			O ₃ *		
	media giornaliera	IQR (s-t)	IQR (c-c)	media giornaliera	IQR (s-t)	IQR (c-c)	media giornaliera	IQR (s-t)	IQR (c-c)
Milano	51.5	36.6	36.4	59.2	29.9	26.1	91.1	42.8	47.6
Mestre-Venezia	48.0	35.2	45.0	38.2	17.7	17.5	91.4	37.0	36.9
Torino	53.9	46.0	37.0	66.0	24.6	23.2	115.4	53.0	54.5
Bologna	42.5	27.6	28.4	51.7	24.8	20.4	90.8	36.2	42.9
Firenze	38.2	20.1	25.3	46.1	22.3	23.6	95.9	30.2	38.1
Pisa	34.2	16.1	21.1	29.8	15.4	15.0	99.0	27.3	34.2
Roma	39.4	19.1	24.3	62.4	21.9	22.1	105.1	31.2	37.2
Taranto	50.3	28.1	31.7	26.3	13.8	12.7	77.9	30.1	26.8
Cagliari	30.3	14.5	16.4	35.0	22.4	22.4	80.8	26.3	31.5
Palermo	34.8	15.5	20.6	52.1	21.4	26.1	88.3	23.4	26.2

*periodo aprile-settembre

Tabella 2. Inquinamento atmosferico e mortalità naturale: media giornaliera delle concentrazioni degli inquinanti, range interquartile delle serie temporali degli inquinanti (IQR s-t) e range interquartile della variabile «differenza casi-controlli» da disegno case-crossover (IQR c-c), per inquinante e città, 2001-2005.

Table 2. Air pollution and natural mortality: daily mean of air pollutants concentrations, interquartile range of air pollutants time-series (IQR s-t) and interquartile range of the variable «case-controls difference» from the case-crossover design (IQR c-c), by air pollutant and city, 2001-2005.

ternativa di eterogeneità delle stime città-specifiche, mentre valori elevati di p-het supportano l'ipotesi nulla di uguaglianza delle singole stime (omogeneità).

Interpretazione dei risultati

Tutti i risultati riportati negli articoli analitici del presente supplemento sono espressi come incrementi percentuali di rischio, e intervalli di confidenza al 95%, per variazioni delle concentrazioni di inquinanti pari a 10 µg/m³. In termini formali, è stata assunta una relazione di tipo lineare tra inquinante ed esito sanitario; il coefficiente stimato metanalitico $\hat{\beta}^{ML}$ e l'errore standard $\hat{\sigma}^{ML}$ sono stati combinati nelle seguenti formule:

$$\text{Incremento \%} = (\exp(\hat{\beta}^{ML} * 10) - 1) * 100 \quad (14)$$

$$\text{IC 95\%} = \{(\exp((\hat{\beta}^{ML} - 1.96 * \hat{\sigma}^{ML}) * 10) - 1) * 100 ; \\ (\exp((\hat{\beta}^{ML} + 1.96 * \hat{\sigma}^{ML}) * 10) - 1) * 100\} \quad (15)$$

per ottenere l'incremento percentuale di rischio e l'intervallo di confidenza al 95%, rispettivamente.

Occorre tuttavia cautela nell'interpretazione dei risultati, in quanto i diversi inquinanti possono avere valori medi giornalieri e distribuzioni nel periodo in studio molto diversi, cosicché la scala comune di 10 µg/m³ può corrispondere a livelli di esposizione diversi tra inquinante e inquinante. Per questa ragione, in diversi studi passati è stato proposto di esprimere gli effetti di inquinanti diversi per range interquartile dei singoli inquinanti, ovvero la differenza tra il 75° e il 25° percentile della distribuzione dell'inquinante nel periodo in studio, in modo tale da tenere conto della diversa variabilità nelle concentrazioni medie degli inquinanti e degli effettivi livelli di esposizione dei soggetti.

Inoltre, Kunzli e Schindler hanno recentemente osservato²⁷ che per il disegno *case-crossover* il termine di esposizione rilevante non è la concentrazione giornaliera dell'inquinante ma la differenza tra la concentrazione a cui è stato esposto il caso e la media delle concentrazioni nei giorni di controllo. Gli autori dello studio concludono che la distribuzione di queste differenze è una caratteristica fondamentale per valutare la potenza dello studio, l'interpretazione dei risultati e il confronto tra le città.

La **tabella 2** riporta, a titolo esemplificativo per l'esito «mortalità naturale», per le 10 città aderenti al Progetto EpiAir e per i tre inquinanti PM10, NO₂ e O₃, la media giornaliera, il range interquartile delle concentrazioni medie giornaliere della serie temporale 2001-2005 (IQR s-t) e il range interquartile della variabile differenza nell'approccio *case-crossover*, costruita come suggerito da Kunzli e Schindler²⁷ (IQR c-c).

Si osserva che i due IQR sono molto coerenti tra loro nelle diverse città, con differenze trascurabili per l'NO₂ e un po' più elevate per PM10 e ozono. Dunque, sebbene i due disegni abbiano diverse variabili di esposizione, esse mostrano una variabilità analoga che giustifica il confronto tra le stime ottenute con i due approcci. Inoltre, i valori degli IQR dipendono dalla media giornaliera degli inquinanti, e sono simili per PM10 e NO₂, e maggiori per l'O₃. Quindi, nel paragonare le stime di effetto dei tre inquinanti espresse per 10 µg/m³ può essere utile considerare che la popolazione delle 10 città italiane è mediamente esposta alla stessa variabilità nelle concentrazioni di PM10 e NO₂, mentre è esposta a una variabilità più elevata per quanto riguarda l'ozono.

Software statistici

Tre software statistici sono stati utilizzati per le diverse fasi di costruzione dei database città-specifici e di analisi statistica dei dati.

Il software SAS²⁸ (Statistical Analysis System, versione 8.0)

è stato utilizzato per la selezione dei casi in studio e per l'applicazione delle procedure di *record linkage* con gli archivi amministrativi di dati per attribuire le informazioni individuali socio-demografiche e cliniche pregresse.

Il software R²⁹ (versione 2.6.1) è stato utilizzato per l'implementazione dei modelli GAM all'interno delle singole città finalizzati al controllo del confondimento ed alla stima dell'associazione tra inquinanti ed esiti sanitari.

Il software STATA³⁰ (versione 10.0) è stato utilizzato per l'implementazione delle tecniche di metanalisi finalizzate alla produzione delle stime di associazione congiunte e alla analisi dell'eterogeneità.

Conclusioni

In questo articolo sono stati presentati i metodi di analisi statistica dei dati applicati nel Progetto EpiAir. In particolare, è stato dato ampio risalto al disegno di studio *case-crossover* e alla sua corrispondenza con l'approccio di serie temporali, in quanto l'equivalenza dei due ha permesso di sfruttare i vantaggi di entrambi e di usarli in modo alternativo a seconda degli obiettivi dello studio.

Sono stati inoltre sottolineati gli aspetti relativi al controllo del confondimento, elementi cruciali nello studio degli effetti sanitari dell'inquinamento atmosferico. Soprattutto la modellazione flessibile del trend temporale e dei fattori meteorologici è stata oggetto di ampia discussione in passato, e nel presente progetto sono state adottate le tecniche più avanzate per il loro aggiustamento.

L'analisi della latenza temporale degli effetti dei diversi inquinanti sulla mortalità e sui ricoveri ospedalieri è stata approfondita, in quanto una comprensione adeguata di tali latenze in relazione a diverse cause del decesso o patologie di ricovero può aiutare a chiarire i possibili meccanismi biologici di azione soggiacenti.

In modo analogo, l'identificazione di sottogruppi di popolazione maggiormente vulnerabili agli effetti dell'inquinamento atmosferico è un tema di grande attualità nell'ambito dell'epidemiologia ambientale; una corretta interpretazione della modificazione d'effetto risulta dunque decisiva.

Infine, la produzione di stime congiunte di associazione e una corretta interpretazione di esse in presenza di eventuali differenze tra le città sono di estrema importanza negli studi multicentrici. Per questa ragione, in questo lavoro è stato dato ampio spazio alle tecniche metanalitiche applicate e al calcolo dell'eterogeneità delle stime città-specifiche.

Conflitti di interesse: nessuno.

Bibliografia

1. Katsouyanni K, Zmirou D, Spix C et al. Short-term effects of air pollution on health: a European approach using epidemiological

time-series data. The APHEA project: background, objectives, design. *Eur Respir J* 1995; 8: 1030-38.

2. McCullagh P, Nelder JA. Generalized linear models (2nd edition). London, Chapman and Hall 1989.
3. Hastie TJ, Tibshirani RJ. Generalized additive models. New York, Chapman and Hall 1990.
4. Cleveland WS. Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *J Amer Statist Assoc* 1979; 74: 829-36.
5. Samet JM, Zeger SL, Dominici F et al. The national morbidity, mortality, and air pollution study. Part II: morbidity and mortality from air pollution in the United States. *Res Rep Health Eff Inst* 2000; c94(pt 2): 5-70; discussion 71-9.
6. Wood SN. Thin plate regression splines. *J R Stat Soc (B)* 2003; 65: 95-114.
7. Maclure M. The case-crossover design: a method for studying transient effects on the risk of acute events. *Am J Epidemiol* 1991; 133: 144-53.
8. Lu Y, Zeger SL. On the equivalence of case-crossover and time series methods in environmental epidemiology. *Biostatistics* 2007; 8: 337-44.
9. Steadman RG. The assessment of sultriness. Part I: a temperature-humidity index based on human physiology and clothing science. *J Applied Meteorol* 1979; 18: 861-73.
10. Kalkstein LS, Valimont KM. An evaluation of summer discomfort in the United States using a relative climatological index. *Bull Am Meteorol Soc* 1986; 67: 842-48.
11. Hosmer DW and Lemeshow S. Applied logistic regression. New York, Wiley 2000.
12. Bateson TF, Schwartz J. Control for seasonal variation and time trend in case-crossover studies of acute effects of environmental exposures. *Epidemiology* 1999; 10: 539-44.
13. Bateson TF, Schwartz J. Selection bias and confounding in case-crossover analyses of environmental time-series data. *Epidemiology* 2001; 12: 654-61.
14. Stafoggia M, Forastiere F, Agostini D et al. Vulnerability to heat-related mortality: a multicity, population-based, case-crossover analysis. *Epidemiology* 2006; 17: 315-23.
15. Levy D, Lumley T, Sheppard L et al. Referent selection in case-crossover analyses of acute health effects of air pollution. *Epidemiology* 2001; 12: 186-92.
16. Forastiere F, Stafoggia M, Berti G et al; SISTI Group. Particulate matter and daily mortality: a case-crossover analysis of individual effect modifiers. *Epidemiology* 2008; 19: 571-80.
17. Stafoggia M, Schwartz J, Forastiere F, Perucci CA; SISTI Group. Does temperature modify the association between air pollution and mortality? A multicity case-crossover analysis in Italy. *Am J Epidemiol* 2008; 167: 1476-85.
18. Biggeri A, Bellini P, Terracini B; Italian MISA Group. [Meta-analysis of the Italian studies on short-term effects of air pollution]. *Epidemiol Prev* 2001; 2 (Suppl): 1-71.
19. Biggeri A, Bellini P, Terracini B. [Meta-analysis of the Italian studies on short-term effects of air pollution--MISA 1996-2002]. *Epidemiol Prev* 2004; 4-5 (Suppl): 4-100.
20. Michelozzi P, de Donato F, Bisanti L et al. The impact of the summer 2003 heat waves on mortality in four Italian cities. *Euro Surveill* 2005; 10: 161-65.
21. Michelozzi P, Accetta G, De Sario M et al; PHEWE collaborative group. High temperature and hospitalizations for cardiovascular and respiratory causes in 12 European cities. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179: 383-89. Epub 2008 Dec 5.
22. Schwartz J. The distributed lag between air pollution and daily deaths. *Epidemiology* 2000; 11: 320-26.
23. Zanobetti A, Wand MP, Schwartz J, Ryan LM. Generalized additive distributed lag models: quantifying mortality displacement. *Biostatistics* 2000; 1: 279-92.
24. Almon S. The distributed lag between capital appropriations and expenditures. *Econometrica* 1965; 33: 178-96.

25. Normand SL. Meta-analysis: formulating, evaluating, combining, and reporting. *Stat Med* 1999; 18: 321-59.
26. DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials* 1986; 7: 177-88.
27. Künzli N, Schindler C. A call for reporting the relevant exposure term in air pollution case-crossover studies. *J Epidemiol Community Health* 2005; 59: 527-30.
28. SAS Institute, Inc. SAS/STAT software, version 8. Cary, NC: SAS Institute, Inc, 1999.
29. R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. (ISBN 3-900051-00-3). Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2004. (World Wide Web URL: <http://www.R-project.org>).
30. StataCorp LP. Stata software, version 10.0. College Station, TX, 2007.