

Protocollo

Del 15/07/09

II Indagine epidemiologica nel distretto di Viadana

Associazione tra vivere in prossimità di aziende del comparto del legno, indicatori oggettivi di morbosità e biomarker di danno cellulare precoce nei bambini residenti nel distretto di Viadana: lo studio Viadana II.



Osservatorio Epidemiologico
Azienda Sanitaria Locale
Mantova



Sezione di Epidemiologia &
Statistica Medica
Dipartimento di Medicina e Sanità
Pubblica
Università di Verona



Cattedra di Tossicologia
Sezione di Farmacologia
Dipartimento di Medicina e Sanità
Pubblica
Università di Verona

1. Background

Nello studio di Viadana (<http://biometria.univr.it/viadanastudy>), condotto dalla Sezione di Epidemiologia e Statistica Medica, Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica (DMSP), dell'Università di Verona, in collaborazione con l'Osservatorio Epidemiologico dell'ASL di Mantova, è emerso che i bambini/ragazzi che vivono entro un raggio di 2 km dalle aziende produttrici di pannelli truciolari mostrano eccessi di sintomi respiratori, agli occhi e alle prime vie respiratorie (riportati dai genitori) consistenti e significativamente superiori ai bambini che abitano a più di 2 km da tali fabbriche (relazione ufficiale spedita alla Direzione Sanitaria dell'ASL di Mantova in data 8/02/2008, **allegato 1**). Gli eccessi di sintomi riscontrati potrebbero essere espressione di un processo infiammatorio, più o meno transitorio, associato a una maggior presenza di inquinanti aerei. Infatti, le aziende per la lavorazione del legno, in particolare quelle addette alla produzione di pannelli truciolari, emettono una varietà d'inquinanti aerei, quali formaldeide, polveri di legno (prodotti direttamente nel ciclo produttivo) e altri inquinanti, liberati dalla combustione dei rifiuti di legno per la produzione di energia (NO₂, CO, SO₂, metalli pesanti etc.). Tali inquinanti, pur nel rispetto dei limiti di legge, sono emessi in atmosfera in quantità complessivamente non trascurabili. La contestuale presenza di numerosi inquinanti (aldeidi, polveri sottili, ossidi di azoto, metalli pesanti, vari organo-clorurati, ecc.) può attivare complessi sinergismi in grado di produrre effetti biologici anche a basse dosi (cioè in concentrazioni che, considerando i singoli inquinanti, avrebbero una scarsa valenza tossicologica), soprattutto in presenza di esposizioni continuative e prolungate (1).

Per tale motivo appare necessario uno studio diretto sulla popolazione suscettibile finalizzato a valutare, mediante l'utilizzo di bio-marcatori di esposizione e di effetto, l'esistenza o meno di un effetto biologico indotto dall'esposizione.

L'indagine proposta nel presente progetto (Viadana II) ha lo scopo di approfondire la valutazione degli effetti potenzialmente attribuibili all'esposizione e dello stato di salute della popolazione pediatrica residente nelle prossimità dei poli industriali di Viadana. In particolare verranno valutate, in funzione della prossimità alle industrie del legno: la frequenza e intensità delle alterazioni cellulari (danno genotossico) nelle cellule della mucosa boccale di un campione di bambini (fase I); la frequenza di ricorso ai servizi sanitari tra il 2006 e il 2009 nella coorte dei bambini studiati nella precedente indagine (fase II). Le due fasi, temporalmente parallele, risponderanno ai seguenti quesiti:

Fase I – *la frequenza e l'intensità del danno genotossico variano in funzione della distanza dell'abitazione dei bambini dai poli industriali del legno?*

È noto che gli inquinanti prodotti dalle aziende per la lavorazione del legno, in particolare quelle addette alla produzione di pannelli truciolari, sono in grado di interagire con il DNA delle cellule dei tessuti esposti (2-7). La presenza, l'entità e la persistenza del danno dipendono sia dal tempo di esposizione che dalla dose.

Nello studio Viadana II sarà confrontato il grado di danno cellulare nelle cellule della mucosa buccale tra i bambini che vivono in prossimità dei poli di produzione del pannello truciolare con quello dei bambini che vivono lontano dalle sorgenti potenzialmente nocive.

Per la misurazione del danno genotossico saranno utilizzati il Comet test e il test dei micronuclei (MN), ampiamente utilizzati in studi nazionali e internazionali (6-14). In particolare, il Comet test è stato impiegato in un recente studio tedesco sulla popolazione generale pediatrica (5-9 anni) per valutare gli effetti biologici precoci del vivere in aree fortemente inquinate (15). Il Comet test è un test valido e sensibile per la rilevazione di danni precoci al DNA. Esso rileva rotture del DNA, in singolo o doppio filamento. Il danno rilevato dal Comet test non è espressione di patogenicità sistemica. Le cellule lesionate, infatti, possono andare incontro ad apoptosi, necrosi o più facilmente riparare il DNA danneggiato (10-13).

Il test dei micronuclei rileva danni di entità maggiore dovuti sia a rottura dei cromosomi durante la divisione cellulare sia alla perdita di materiale cromosomico durante l'anafase. I micronuclei sono piccoli nuclei accessori che si ritrovano nel citoplasma delle cellule che hanno subito un danno al DNA, sia spontaneo che indotto, e questi appaiono morfologicamente identici al nucleo principale ma con dimensioni visibilmente ridotte rispetto al nucleo principale (2-4, 6, 7, 13). I due test sono positivamente correlati ed hanno caratteristiche complementari.

I test verranno eseguiti sulle cellule della mucosa buccale, che sono cellule di sfaldamento e per loro caratteristica presentano un rapido processo di eliminazione e rigenerazione. Quindi i test di genotossicità non sono test di diagnosi precoce di malattia, né di danno per l'intero organismo, ma semplicemente "bio-marcatore" di esposizione che indicano la presenza di un danno del DNA. Nel caso specifico, l'eventuale danno verrebbe rilevato limitatamente alle sole cellule della mucosa orale, le prime ad arrivare in contatto con possibili inquinanti inalati. Si tratta quindi di un danno che coinvolge una popolazione cellulare specifica e comunque sottoposta a un continuo e rapido ricambio per sfaldamento spontaneo.

I test non si prestano a un'interpretazione individuale (a differenza degli usuali test di screening: positivo = probabile malattia preclinica), ma collettiva. Essi permettono di stabilire se un particolare gruppo è maggiormente esposto ad agenti inquinanti in grado di produrre un effetto biologico, e di

conseguenza permettono di individuare sottogruppi di popolazione che possono trarre maggior vantaggio da interventi di prevenzione primaria sulle fonti di rischio.

***Fase II** – I bambini che vivevano in prossimità delle aziende produttrici di pannelli truciolari (nella prima indagine del dicembre 2006) hanno successivamente fatto ricorso a prestazioni sanitarie più frequentemente dei bambini che vivevano lontano?*

Nell'ambito dello studio Viadana II, sarà ricostruita l'esperienza di ospedalizzazione, di ricorso ai servizi sanitari ambulatoriali e di prescrizione di farmaci dal 1/01/2007 ad oggi di tutti i bambini inclusi nello studio di Viadana (n=3854). Saranno valutate le variazioni del tasso di ricorso ai servizi sanitari e del consumo di farmaci in funzione della vicinanza della residenza dei bambini alle aziende del legno. I risultati permetteranno di valutare prospetticamente se i bambini che vivevano a meno di 2 km dalle aziende del pannello truciolare, e che avevano riportato nell'indagine del 2006 una prevalenza di sintomi particolarmente elevata, hanno avuto un maggior consumo di servizi, prestazioni ambulatoriali e farmaci rispetto ai bambini che vivevano a maggiore distanza.

2. FASE I – Indagine epidemiologica per la valutazione del danno genotossico

2.1. Obiettivi

Valutare se, nei bambini/ragazzi che hanno partecipato allo studio di Viadana, la frequenza e l'intensità del danno cellulare variano in funzione della distanza della residenza dalle aziende produttrici di pannello truciolare.

2.2. Popolazione e disegno dello studio

Sarà condotta un'indagine di follow-up di un campione casuale dei bambini/ragazzi che hanno preso parte nel dicembre 2006 allo studio di Viadana, stratificato sulla base della distanza della "residenza" (indirizzo nel quale il bambino/ragazzo passa la maggior parte del tempo) dalle fabbriche del legno.

Il campione sarà selezionato escludendo:

- i) i bambini/ragazzi che, al dicembre 2009, avranno 12 anni o più (in modo da rendere minimo il rischio di confondimento dovuto al fumo attivo di sigaretta e al consumo di alcol);
- ii) i bambini/ragazzi che hanno cambiato la loro residenza negli anni che vanno dalla prima alla seconda indagine (2006-2009), che saranno identificati sulla base dei dati dell'anagrafe comunale (in modo da avere un campione di bambini il cui livello di esposizione agli inquinanti è rimasto il più possibile costante nel tempo);
- iii) i bambini/ragazzi per i quali il questionario è stato compilato dai genitori in inglese o francese. Dato il modesto numero di questionari in lingua diversa dall'italiano raccolti nello studio di Viadana (circa l'1%), questa scelta permetterà di accelerare i tempi dell'indagine, evitando di dover preparare un questionario in 3 lingue e renderà più omogenei i gruppi di confronto.

Saranno inoltre identificati, sulla base del cognome e dell'indirizzo di residenza (anagrafe comunale), tutti i bambini appartenenti a uno stesso nucleo familiare. Per garantire l'indipendenza delle osservazioni, si farà attenzione a non includere nel campione più di un bambino per nucleo familiare (utilizzando dei criteri casuali per l'inclusione).

I soggetti eleggibili per lo studio saranno stratificati in funzione della distanza dell'abitazione dalle industrie del legno, nel seguente modo:

- 1) distanza dell'abitazione superiore a 4 km da qualsiasi fabbrica del legno del distretto industriale ("non esposti");
- 2) distanza dell'abitazione inferiore a 4 km da qualsiasi fabbrica e superiore a 2 km dalle industrie di produzione del pannello truciolare ("bassa esposizione");
- 3) distanza dell'abitazione inferiore a 2 km dalle industrie di produzione del pannello truciolare ("alta esposizione").

Da ognuno degli strati precedenti sarà estratto un campione casuale di 200 bambini (vedi anche paragrafo 2.5). Su ogni partecipante sarà effettuato un prelievo di cellule della mucosa buccale per la misurazione del danno genotossico e verrà somministrato un questionario sui sintomi respiratori ed irritativi correnti.

2.2.1. Aspetti logistici

L'indagine sarà preceduta da uno studio pilota, che sarà condotto su 30-40 bambini e avrà l'obiettivo di mettere a punto i flussi informativi, di valutare la percentuale di partecipazione e di approntare le opportune migliorie.

Prima dell'inizio dell'indagine sarà spedita una comunicazione a tutti i medici di medicina generale e pediatri del territorio (**allegato 2**) e ai titolari delle farmacie pubbliche e private (**allegato 3**), che saranno invitati a prenderne parte. Queste lettere conterranno una descrizione dell'indagine, le istruzioni per il prelievo delle cellule dalla mucosa buccale (**allegato 4**) e una scheda tecnica che descrive i test citogenetici (**allegato 5**).

I genitori/tutori dei bambini selezionati per l'indagine saranno invitati a partecipare con una comunicazione postale dall'ASL di Mantova (**allegato 6**), che conterrà informazioni generali sull'indagine e il modulo per il consenso informato (**allegato 7**), che dovrà essere restituito firmato per posta. Il ritorno di questi moduli permetterà inoltre una verifica degli indirizzi dei partecipanti. Una decina di giorni prima di iniziare la fase di consegna del materiale sarà poi inviata una seconda comunicazione ai genitori che avranno indicato la loro disponibilità a partecipare (**allegato 8**), contenente tutte le indicazioni necessarie per recarsi ai punti di consegna del materiale e per la raccolta dei campioni e dei questionari compilati.

La consegna ai genitori/tutori del kit per il prelievo, delle istruzioni per l'esecuzione del prelievo, di un ulteriore modulo per il consenso informato (da compilarsi nel caso non fosse stato già consegnato in precedenza) e del questionario (**allegato 9**) sarà effettuata avvalendosi della collaborazione delle farmacie pubbliche e private sul territorio. Una volta effettuato il prelievo, i campioni potranno essere conservati in frigorifero per un massimo di 3 giorni (adeguate istruzioni

saranno fornite per minimizzare questo tempo e standardizzare il più possibile modi e tempi di raccolta e conservazione dei campioni, si veda l'**allegato 8**).

La successiva raccolta dei campioni e del questionario avverrà in giorni prefissati in modo che, ogni settimana, sia possibile spedire circa 40 campioni al laboratorio che si occuperà dell'analisi del danno genotossico (laboratorio di Tossicologia della Sezione di Farmacologia, DMSP, Università di Verona).

2.3. Misura del danno genotossico

Un campione di cellule della mucosa buccale dei partecipanti sarà sottoposto alla misurazione del danno genotossico. Il prelievo cellulare sarà effettuato direttamente dal genitore/tutore del bambino/ragazzo, mediante l'utilizzo di un apposito kit (spazzolino citologico, abbassalingua e provetta contenente 5 ml di terreno di mantenimento sterile). Il prelievo sarà eseguito spazzolando delicatamente la parte interna della guancia destra e sinistra con uno spazzolino citologico, dopo aver sciacquato ripetutamente la bocca diverse volte con acqua a temperatura ambiente e aver passato delicatamente l'abbassa lingua sull'interno della guancia per rimuovere lo strato superficiale di cellule esfoliate. La procedura potrà essere visionata dai genitori/tutori dei partecipanti in un video, visionabile sul sito www.aslmn.it.

Il rilevamento del danno di base del DNA sarà effettuato mediante "Comet test" in cellule epiteliali della mucosa buccale (10). La tecnica consiste nello stratificare le cellule prelevate dal cavo orale e sospese in agarosio, su un vetrino, utilizzando la tecnica a "sandwich". Le cellule vengono lisate, quindi sottoposte ad elettroforesi submerse. Le condizioni alcaline utilizzate rompono i legami tra le due catene del DNA, i filamenti si separano e durante l'elettroforesi i frammenti di DNA generati da eventuali danni migrano nel campo elettroforetico, formando la caratteristica "coda della cometa". L'analisi dei vetrini viene fatta dopo marcatura fluorescente del DNA e la valutazione del danno viene effettuata con un microscopio a fluorescenza, dotato di telecamera ad alta risoluzione collegata con un sistema computerizzato per l'analisi delle immagini.

Per ogni partecipante saranno esaminate 100 cellule (2 replicati di 50 cellule) scelte casualmente. Il danno al DNA sarà valutato come i) percentuale del DNA nella coda della cometa (% DNA), ii) lunghezza della coda (μm), misurata dal centro della testa della cometa, e iii) momento della coda, definito come prodotto integrato dei due precedenti parametri (16).

La valutazione della presenza di micronuclei sarà condotta su una sospensione cellulare strisciata su tutta la superficie del vetrino portaoggetti. Il preparato viene fissato in metanolo freddo (80%) per 30 min, lasciato asciugare a temperatura ambiente per una notte, ed eventualmente stoccato a -20°C fino al momento dell'analisi. Per la lettura, il vetrino viene colorato con 100 μl di un colorante

specifico per il DNA: 4,6-di-amino 2-fenilindolo cloruro (DAPI alla concentrazione di 1 mg/ml). Per ogni soggetto saranno lette al microscopio in fluorescenza (Olympus BX50) 1000 cellule. I criteri di valutazione per la presenza di micronuclei sono quelli stabiliti da Tolbert et al. (17).

I risultati aggregati saranno presentati come media (DS) delle mediane per ogni soggetto per il Comet test, e come media (DS) delle frequenze (‰) dei micronuclei per ciascun soggetto per il test dei micronuclei. Nella valutazione dei risultati saranno presi in considerazione i principali elementi di confondimento (14, 18).

2.4. Questionario

Insieme al Kit necessario per l'esecuzione del prelievo cellulare, il genitore/tutore del bambino riceverà un questionario da compilare a casa per la raccolta d'informazioni sullo stato di salute dei ragazzi e su eventuali fattori di confondimento (**allegato 8**). Il questionario contiene domande su sintomi e patologie correnti e passati del bambino e su fattori che possono confondere il risultato dei test del DNA (in particolare l'utilizzo di apparecchi dentali e la presenza di otturazioni) ed è stato ottenuto partendo da quello utilizzato nello studio di Viadana, che può essere trovato sul sito: <http://biometria.univr.it/viadanastudy>.

2.5. Calcolo delle dimensioni dello studio

Considerando che l'esposizione a inquinanti con possibili effetti genotossici nel gruppo in esame dovrebbe essere modesta, il calcolo delle dimensioni dello studio è stato effettuato per il Comet test, che è un test di rilevazione di danno citogenetico più sensibile rispetto a quello misurato dal test dei micronuclei. L'outcome del Comet test considerato per il calcolo della numerosità campionaria è stato il momento della coda. Il momento è una misura che tiene conto sia della percentuale di DNA nella coda, sia della lunghezza della stessa. Nello studio di Faccioni et al. (10), è stata studiata la relazione tra utilizzo di apparecchio ortodontico fisso e danno genotossico. Il gruppo di controllo era costituito da 30 soggetti dai 12 ai 33 anni che non portavano l'apparecchio. In questo gruppo il danno genotossico, stimato sulla base del momento della coda (16), era pari in media a 0.30 (DS, 0.09).

Per il calcolo della dimensione campionaria si è utilizzato il test di Tukey-Kramer per i confronti multipli (19). Fissato alfa al 5%, 133 partecipanti (n=399) per ciascuno dei 3 gruppi in esame ci permettono di evidenziare, per almeno uno dei 3 confronti a coppie (gruppo 1 vs. gruppo 2, gruppo 2 vs. gruppo 3, gruppo1 vs. gruppo 3):

- i) un eccesso di danno genotossico del 18% (pari ad una variazione del momento della coda da 0.300 a 0.354) con una potenza dell'80%;
- ii) un eccesso di danno del 18.3% (con una variazione del momento della coda da 0.30 a 0.355) con una potenza dell'90%.

Per garantire una numerosità minima di 133 soggetti per ognuno dei 3 gruppi in studio, considerato un tasso di partecipazione all'indagine del 65%, saranno invitati a partecipare all'indagine 200 soggetti per gruppo. La tabella 1 riporta il numero di soggetti partecipanti allo studio di Viadana per ogni strato e il numero di soggetti attesi nello studio sul danno genotossico.

Tabella 1: distribuzione dei partecipanti all'indagine di Viadana e dei soggetti attesi per lo studio del danno genotossico sulla base della distanza della residenza dalle fabbriche del legno.

<i>proxy di esposizione agli inquinanti</i>	<i>n. partecipanti a Viadana I*</i>	<i>n. soggetti attesi per Viadana II</i>
residenza >4km da qualsiasi fabbrica	486	133
residenza 2-4 km qualsiasi fabbrica <i>oppure</i> residenza <2 km fabbriche del truciolato	918	133
residenza < 2 km fabbriche del truciolato	559	133
<i>totale</i>	<i>1963</i>	<i>399</i>

* esclusi i soggetti con ≥ 12 anni al dicembre 2009, con questionario compilato in inglese/francese, con informazioni chiave (cognome, nome, indirizzo, luogo e data di nascita) mancanti (n=1891).

2.6. Analisi statistica

L'analisi statistica principale sarà il confronto tra le medie/mediane dei 3 outcome del Comet test (% DNA, lunghezza e momento della coda) nei 3 gruppi in studio. Questo confronto sarà effettuato utilizzando sia test parametrici (ANOVA) o non parametrici (Kruskall Wallis), a seconda della simmetria nella distribuzione degli outcome, sia opportuni modelli per l'analisi della covarianza, per tenere conto di altre variabili che possono confondere l'associazione tra vicinanza alle fabbriche del legno e danno genotossico (come sesso, età, nazionalità, utilizzo di apparecchi dentali, etc).

3. FASE II – Analisi dei dati correnti di morbosità e mortalità dell'intera coorte

3.1. Obiettivo

Valutare se, nei bambini/ragazzi che hanno partecipato allo studio di Viadana, esiste un'associazione tra il vivere nelle vicinanze delle aziende produttrici di pannelli truciolari e alcuni indicatori di morbosità ricavati dai dati correnti.

3.2. Popolazione e disegno dello studio

Sarà analizzata l'esperienza di ricovero, di utilizzo di prestazioni ambulatoriali e di prescrizioni farmaceutiche per l'intera coorte dei bambini che hanno partecipato allo studio di Viadana nel dicembre del 2006 (n=3854).

Le cause di ricovero sono classificate secondo la "Classificazione internazionale delle malattie 9° revisione – modificazione clinica" (Traduzione italiana della "International Classification of Diseases – 9th revision – clinical modification"). Per ognuno dei gruppi di cause indicati in tabella 2 sarà individuata la presenza di almeno un ricovero per i bambini della coorte (prevalenza del primo evento per causa) nel periodo dal 1/01/2007 ad oggi.

I farmaci sono classificati secondo il sistema ATC (Anatomical Therapeutic Chemical Classification System). Per ogni bambino sarà ricostruita la storia prescrittiva (numero di prescrizioni) per le categorie di farmaci indicate in tabella 3 nel periodo dal 1/01/2007 ad oggi.

Per ogni bambino sarà ricostruita inoltre la storia di ricorso alle prestazioni ambulatoriali (tabella 4) nel periodo dal 1/01/2007 ad oggi. I dati dei consumi sanitari relativi a ricoveri, farmaci e prestazioni ambulatoriali sono forniti e verificati dall'Osservatorio Epidemiologico dell'ASL di Mantova, che utilizza questi flussi sanitari al fine di ricostruire, con cadenza annuale, la storia dei consumi sanitari di tutta la popolazione assistita della provincia di Mantova.

Saranno inoltre ricostruite per tutta la coorte la storia dei tumori maligni (attraverso la consultazione del registro tumori) e di mortalità per tutte le cause dal 1/1/2007 ad oggi, e la storia di malformazioni congenite tra i bambini della coorte.

3.3. Analisi statistica

Saranno calcolati i tassi (percentuali) di ricovero, di ricorso alle visite ambulatoriali e del consumo di farmaci per gruppi di cause e per cause specifiche per tutti i bambini della coorte. Sarà inoltre attribuita una DDD (defined daily dose) per principio attivo.

Sarà studiata l'associazione tra i tassi (sia grezzi sia aggiustati per i potenziali confondenti) e la distanza dalle aziende del pannello truciolare. La distanza dalle aziende sarà utilizzata sia come variabile continua, sia classificando i bambini su livelli crescenti di "esposizione" (bambini che vivono a >2km dalle fabbriche, bambini che vivono <2km dalle fabbriche del legno, eccetto quelle del pannello truciolare, bambini che vivono <2km dalle aziende del pannello truciolare). Per l'analisi saranno utilizzati modelli di regressione per dati discreti sovradispersi (modelli ZIP – Zero Inflated Poisson). I 3 gruppi verranno inoltre confrontati per consumo complessivo di farmaci (DDD per principio attivo). Per tutta la coorte saranno inoltre calcolate l'incidenza dei tumori maligni e di mortalità per tutte le cause dal 1/1/2007 ad oggi, e la prevalenza dei bambini portatori di malformazioni congenite.

Tabella 2: gruppi di cause di ricovero selezionate.

Causa di ricovero	ICD-IX-CM
Tutte le cause	0-999
Tutte le cause (esclusi traumatismi e avvelenamenti)	0-799
Tumori maligni	140-208
del tessuto linfatico ed emopoietico	200-208
Tumori benigni	210-239
Malattie del sistema nervoso e degli organi di senso	320-389
disturbi visivi	368
malattie della congiuntiva	372
infiammazione delle palpebre, altre affezioni delle palpebre	373, 374
affezioni dell'apparato lacrimale	375
Malattie dell'apparato respiratorio	460-519
bronchiti acute	466
asma	493
rinite allergica	477
Malattie infiammatorie della pelle	690-698

Tabella 3: categorie di farmaci selezionati.

Categorie di farmaci	ATC
Tutti i farmaci	A-V
Pelle	D
Corticosteroidi, preparazioni dermatologiche	D07
Malattie maligne	L01-L02
Malattie immunitarie	L03-L04
Sistema respiratorio	R
Preparazioni nasali	R01
Preparazioni per la gola	R02
Farmaci per le malattie ostruttive delle vie aeree	R03
Preparazioni per la tosse e i raffreddori	R05
Antistaminici per uso sistemico	R06
Organi di senso	S
Oftalmologici	S01

Tabella 4: prestazioni ambulatoriali selezionate.

Prestazioni ambulatoriali	Codice
Tutte	03.xx - 99.xx
Visita generale	89.7
Spirometria semplice	89.37.01
IgE specifiche allergologiche: quantitativo per ogni allergene	90.68.1
Esame allergologico per orticarie fisiche	91.90.1
Indagini Fotobiologiche per fotodermatosi (foto patch test)	91.90.2
Indagini Fotobiologiche per fotodermatosi (fototest)	91.90.3
Screening allergologico per inalanti (fino a 7 allergeni)	91.90.4
Test percutanei e intracutanei a lettura immediata (fino a 12 allergeni)	91.90.6
Prick by Prick con allergeni freschi	91.90.9
Esame complessivo dell'occhio	95.02

4. Problemi Etici

4.1. Sicurezza ed esecuzione del test

L'esecuzione del prelievo cellulare non presenta alcun problema etico. Si tratta di un delicato *brushing* effettuato sulla mucosa della guancia interna dei bambini (che non interessa il più profondo livello faringeo) per prelevare cellule superficiali destinate allo sfaldamento spontaneo. La raccolta delle cellule è facile, non invasiva e ben tollerata. La semplicità di esecuzione e la non invasività dei test ne giustificano l'impiego nella valutazione dell'esposizione ad agenti tossici e nella verifica dell'efficacia di eventuali interventi preventivi.

Non solo per ragioni di economicità generale dello studio e di *compliance* attesa, ma anche per ridurre al minimo la possibilità che il prelievo sia percepito da parte dei partecipanti come un atto medico, si è ritenuto opportuno delegare il prelievo ai genitori.

4.2. Informazioni

La popolazione sarà informata esaurientemente su significato e modalità di esecuzione del test. Gli strumenti informativi individuati saranno: i) lettera a domicilio con *depliant* illustrativo (**allegato 4**); ii) filmato esplicativo visibile sul sito internet dell'ASL [NDR: la pubblicazione sul sito avverrà solo dopo l'approvazione dello studio da parte del CE; il filmato è attualmente visibile al sito <http://biometria.univr.it/viadanastudy/film.html>]; iii) interviste *ad hoc* rilasciate ai media dagli autori dello studio; iv) un numero verde per eventuali chiarimenti personalizzati; v) incontri interattivi con i genitori, che saranno invitati in assemblea pubblica organizzata allo scopo; durante tali incontri sarà particolare cura degli autori dello studio chiarire che, nonostante l'indagine sia condotta su un campione statistico di 600 partecipanti al primo studio (n=3864), essa si prefigge di offrire un risultato di interesse per tutta la comunità di appartenenza. Sarà fatta particolare attenzione a chiarire ai genitori dei partecipanti che i test utilizzati non sono test di diagnosi precoce di malattia, né di danno per l'intero organismo, ma semplicemente test di esposizione in grado di misurare un danno a livello del DNA delle *sole cellule della mucosa orale*. Tale danno è quindi limitato e riparabile, e coinvolge una popolazione cellulare specifica e sottoposta a un continuo e rapido ricambio per sfaldamento spontaneo. Sarà sottolineato che il danno genotossico a livello della mucosa buccale non configura un danno per *l'organismo in toto*, ma di un'esposizione a sostanze tossiche che viene per così dire *registrata* in fase di ingresso (la cavità orale) e che i risultati ottenuti saranno interpretabili solo a livello collettivo. Verrà infine chiarito il vantaggio della

popolazione nel partecipare all'indagine in quanto essa potrà permettere l'identificazione di aree ad elevata concentrazione di inquinanti potenzialmente tossici e quindi permettere l'adozione di misure efficaci di prevenzione primaria

4.3. Comunicazione dei risultati

I test di genotossicità effettuati non sono interpretabili a livello individuale come indicatori di rischio di malattia. Per questo motivo, e per evitare false e/o scorrette interpretazioni del singolo risultato, i risultati dei test non saranno restituiti a livello individuale. Nel modulo per il consenso informato è, infatti, chiaramente specificato che non verranno comunicati ai genitori i risultati dei test effettuati sui bambini (**allegato 7**). Invece, ai genitori dei bambini partecipanti all'indagine, sarà inviato una sintesi dei principali risultati ottenuti dall'indagine, con in particolare l'informazione relativa alla zona in cui essi abitano. I dati aggregati (il confronto del danno genotossico tra i 3 gruppi definiti sulla base della distanza dalle aziende del legno) saranno anche comunicati alla popolazione in una pubblica assemblea contestualmente alle eventuali azioni di prevenzione da attivare.

4.4 Conservazione dei dati e privacy

Tutti i dati raccolti nello studio Viadana II (risultati di test biologici, questionari, dati sul ricorso ai servizi sanitari e sul consumo di farmaci) saranno archiviati elettronicamente in un database anonimizzato, che sarà linkato al database della precedente indagine e utilizzato per l'elaborazione dei dati. Ogni individuo sarà identificabile mediante il numero progressivo identificativo (ID) già assegnato nella precedente indagine e la chiave nominativa (possibilità di passare dalla ID all'individuo) sarà conservata su supporto cartaceo ed elettronico a cura degli autori dello studio.

5. Struttura organizzativa

RESPONSABILE SCIENTIFICO DELLO STUDIO

- **Prof. Roberto de Marco**

COMITATO SCIENTIFICO

- **Prof.ssa Maria Enrica Fracasso**
- **Dr. Alessandro Marcon**
- **Dr. Paolo Ricci**

PRINCIPALI COLLABORATORI ALLA RICERCA

- **A.S.V. Annalaura Bozzeda:** staff Osservatorio Epidemiologico ASL Mantova
- **A.S.V. Maria Dall'Acqua:** staff Osservatorio Epidemiologico ASL Mantova
- **Dr.ssa Denise Doria:** assegnista post-dottorato, Sezione di Farmacologia, Università di Verona
- **A.S.V. Luciana Gatti:** staff Osservatorio Epidemiologico ASL Mantova
- **Dr. Paolo Girardi:** dottorando di ricerca, Sezione di Epidemiologia e Statistica Medica, Università di Verona
- **Dr. Davide Nicolis:** assegnista di ricerca, Sezione di Epidemiologia e Statistica Medica, Università di Verona
- **Ost. Vanda Pironi:** staff Osservatorio Epidemiologico ASL Mantova
- **Dr.ssa Marta Rava:** dottoranda di ricerca, Sezione di Epidemiologia e Statistica Medica, Università di Verona

6. Unità partecipanti

1. Sezione di Epidemiologia e Statistica Medica, Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica, Università di Verona (responsabile scientifico: prof. Roberto de Marco).
2. Sezione di Farmacologia, Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica, Università di Verona (responsabile scientifico: prof.ssa Maria Enrica Fracasso).
3. Osservatorio Epidemiologico ASL di Mantova (responsabile scientifico: dott. Paolo Ricci).

6.bis Finanziamenti

La previsione di spesa complessiva è di circa Euro 90.000,00, esclusi i costi del personale dipendente dell'Osservatorio Epidemiologico.

Lo studio è finanziato interamente con fondi stanziati da enti pubblici:

- per il 50% provvederà l'ASL di Mantova attingendo al budget 2009 e 2010 assegnato dalla DG Sanità della Regione Lombardia alle attività del Registro Tumori di Mantova, una delle cinque funzioni svolte dall'Osservatorio Epidemiologico, come da Piano Organizzativo Aziendale 2009;
- per il 50% provvederanno la Provincia di Mantova ed i Comuni del Distretto socio-sanitario di Viadana, come da disponibilità espressa in sede di coordinamento dell'indagine.

6.ter Conflitti di interesse

Tutti gli autori e i collaboratori coinvolti nello studio dichiarano l'assenza di ogni conflitto di interesse.

7. Riferimenti bibliografici

1. Wigle DT, Lanphear BP. Human health risks from low-level environmental exposures: no apparent safety thresholds. *PLoS Med.* 2005 Dec;2(12):e350.
2. Costa S, Coelho P, Costa C, Silva S, Mayan O, Santos LS, Gaspar J, Teixeira JP. Genotoxic damage in pathology anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde. *Toxicology.* 2008 Oct 30;252(1-3):40-8.
3. Iarmarcovai G, Bonassi S, Sari-Minodier I, Baciuchka-Palmaro M, Botta A, Orsière T. Exposure to genotoxic agents, host factors, and lifestyle influence the number of centromeric signals in micronuclei: a pooled re-analysis. *Mutat Res.* 2007 Feb 3;615(1-2):18-27.
4. Rekhadevi PV, Mahboob M, Rahman MF, Grover P. Genetic damage in wood dust-exposed workers. *Mutagenesis.* 2009 Jan;24(1):59-65.
5. Victorin K. Review of the genotoxicity of nitrogen oxides. *Mutat Res.* 1994 Feb;317(1):43-55.
6. Celik A, Kanik A. Genotoxicity of occupational exposure to wood dust: Micronucleus frequency and nuclear changes in exfoliated buccal mucosa cells. *Environ Mol Mutagen.* 2006 Dec;47(9):693-8.
7. Speit G, Schmid O. Local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated epithelial cells. *Mutat Res.* 2006 Sep;613(1):1-9.
8. Neri M, Bonassi S, Knudsen LE, Sram RJ, Holland N, Ugolini D, Merlo DF. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. I. Overview and critical issues. *Mutation Res.* 2006 612:1-13.
9. Boogaard PJ. Human biomonitoring activities-Programmes by industry. *Int. J. Hyg. Environ.-Health.* 2007 210:259-261.
10. Faccioni F, Franceschetti P, Cerpelloni M, Fracasso ME. In vivo study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003 Dec;124(6):687-93.
11. Fracasso M E, Franceschetti P, Doria D, Talamini G, Bonetti F. DNA breaks as measured by the alkaline comet assay in exfoliated cells as compared to voided urine cytology in the diagnosis of bladder cancer: A study of 105 subjects. *Mutation Res.* 2004, 564/1: 57-64.
12. Fracasso M E, Doria D, Franceschetti P, Perbellini L, Romeo L. DNA damage and repair by comet assay in lymphocytes of white-collar active smokers and passive smokers (non- and ex-smokers) *Toxicol Lett* 2006 167, 131-141.

13. Fracasso M E, Doria D, Carrieri M, Bartolucci GB, Quintavalle S, De Rosa E. DNA single- and double-strand breaks by alkaline and immuno-comet assay in lymphocytes of workers exposed to styrene. *Toxicol Lett.* 2009 185, 9-15
14. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Geiger E, Knasmueller S, Fenech M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMAN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Res.* 2008 659: 93-108.
15. Wilhelm M, Eberwein G, Hölzer J, Gladtko D, Angerer J, Marczynski B, Behrendt H, Ring J, Sugiri D, Ranft U. Influence of industrial sources on children's health - hot spot studies in North Rhine Westphalia, Germany. *Int J Hyg Environ Health.* 2007 Oct;210(5):591-9.
16. Olive PL, Wlodek D, Durand RE, Banath JP. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp Cell Res.* 1992 Feb;198(2):259-67.
17. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. *Am J Epidemiol.* 1991 134, 840-50.
18. Møller P, Knudsen LE, Loft S, and Wallin H. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 2000 October; 9: 1005-1015
19. Hsu, Jason. *Multiple Comparisons: Theory and Methods.* 1996 Chapman & Hall. London.