



DIEP/Lazio

Dipartimento di Epidemiologia del Servizio Sanitario Regionale - Regione Lazio

**INDAGINE TRASVERSALE SULLA SALUTE, SULLE ABITUDINI DI VITA E SUI LIVELLI DI
BIOMARCATORI DI ESPOSIZIONE AMBIENTALE DELLA POPOLAZIONE RESIDENTE
NEL COMPENSORIO DI CIVITAVECCHIA**

Progetto ABC (Ambiente e Biomonitoraggio nell'area di Civitavecchia)



PROTOCOLLO DELLO STUDIO

A cura di:

Dipartimento di Epidemiologia, Servizio Sanitario Regionale, Lazio



via di Santa Costanza, 53 - 00198 Roma - Tel. (+39) 06.83060444 - Fax (+39) 06.83060374
www.deplazio.net

INTRODUZIONE

L'area di Civitavecchia è interessata da diversi decenni da un quadro ambientale complesso per la presenza del porto e di insediamenti energetici ed industriali; per questo motivo l'area è oggetto di attenzione per le possibili ripercussioni sulla salute della popolazione delle emissioni derivanti da questi impianti.

Negli anni '80 e '90 diversi studi epidemiologici sui lavoratori dei diversi comparti industriali di Civitavecchia sono stati condotti dall'Osservatorio Epidemiologico della Regione Lazio (OER). I risultati di questi studi hanno evidenziato eccessi di mortalità per tumore del polmone e della pleura tra i lavoratori portuali (1), i marittimi (2) e gli addetti alle centrali ENEL del comprensorio (3). Per quanto riguarda la popolazione residente, le prime indagini sui possibili danni dell'inquinamento atmosferico nell'area di Civitavecchia risalgono al 1987 quando, su iniziativa regionale, l'OER condusse un'indagine epidemiologica tra i bambini delle scuole elementari che evidenziò una maggiore frequenza di disturbi respiratori tra gli alunni dell'area di Civitavecchia rispetto a quelli della provincia di Viterbo (4,5). Uno studio caso controllo condotto dall'OER sui residenti deceduti per tumore polmonare ha riscontrato rischi relativi significativamente elevati per alcune esposizioni lavorative, in particolare esposti ad amianto e impiegati come lavoratori marittimi, confermando dunque i dati degli studi occupazionali specifici. Nello stesso studio veniva registrata una mortalità per tumore polmonare più elevata nella zona a sud della città a pochi km dal centro (6). Lo studio condotto dal Dipartimento di Epidemiologia del SSR (7) ha analizzato la mortalità e i ricoveri ospedalieri dei residenti nel comune di Civitavecchia nei periodi 1997-2004 evidenziando, in coerenza con i dati già disponibili, eccessi di tumore polmonare e pleurico e di asma bronchiale.

Da marzo 2010 è attivo nella regione Lazio l'Osservatorio Ambientale della centrale termoelettrica di Civitavecchia Torrealvaldiga Nord, costituito a seguito della trasformazione a carbone della centrale termoelettrica ENEL di Civitavecchia (Torrealvaldiga Nord), con il fine di esaminare e di valutare le ricadute ambientali e sulla salute pubblica dell'impianto rispetto al territorio interessato (http://www.regione.lazio.it/rl_ambiente/?vw=contenutidetail&id=163). L'Osservatorio Ambientale è composto da membri rappresentanti della Regione Lazio, del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, del Ministero della Salute, dell'Istituto Superiore di Sanità, dell'Istituto Superiore per la Protezione e Ricerca Ambientale, della Provincia di Roma, di ARPA Lazio, del Dipartimento di Epidemiologia del SSR del Lazio, dalla ASL Roma F e dai

rappresentanti dei Comuni del comprensorio. Nei rapporti dell'Osservatorio Ambientale pubblicati nel 2010 e nel 2011 sono stati presentati diversi aggiornamenti delle conoscenze epidemiologiche dell'area prodotte dal Dipartimento di Epidemiologia del SSR Lazio con analisi della mortalità e ricoveri dei residenti fino al 2011.

In sintesi, tutte le valutazioni finora condotte hanno evidenziato nella popolazione residente nel comune di Civitavecchia un quadro di mortalità generale e per tumori maligni in eccesso rispetto alla popolazione residente nel Lazio nello stesso periodo e un eccesso di rischio per tumore polmonare e della pleura e per malattie respiratorie. I risultati delle analisi del ricorso alle cure ospedaliere hanno sostanzialmente confermato il quadro delineato dagli studi di mortalità.

Malgrado le molte ricerche condotte, non sono ad oggi disponibili dati relativi alla esposizione umana, e al possibile effetto sulla salute, dei contaminanti prodotti dagli impianti industriali e dalle altre fonti inquinanti presenti in questa area. Alcuni di questi inquinanti, caratterizzati da stabilità chimico-fisica, lunga permanenza ambientale e potenziale tossicità, possono contaminare terreno, vegetali e animali, ed entrare così nella catena alimentare, con possibilità d'arrivare fino all'uomo. Gli inquinanti sono presenti nei tessuti della popolazione generale generalmente a concentrazioni relativamente basse, con una emivita anche di diversi anni. A concentrazioni elevate nell'organismo può associarsi un rischio sanitario.

Lo studio epidemiologico ABC (Ambiente e Biomonitoraggio nell'area di Civitavecchia), coordinato dal Dipartimento di Epidemiologia del SSR della regione Lazio, in collaborazione con il Dipartimento di Prevenzione della ASL Roma F e con il supporto dell'Autorità Portuale (di Civitavecchia, Fiumicino e Gaeta), nasce con l'intento di studiare lo stato di salute della popolazione e di descrivere le caratteristiche importanti in termini di fattori di rischio individuali, di valutare gli indici di possibile contaminazione di rilevanza tossicologica, e studiare le possibili relazioni tra fattori di rischio ambientali, body burden, e patologie specifiche.

OBIETTIVO

L'obiettivo dello studio ABC è quello di valutare lo stato di salute della popolazione residente nei comuni del comprensorio di Civitavecchia e il livello di esposizione a fattori di rischio ambientale e legati allo stile di vita. Utilizzando i livelli di alcuni indicatori biologici, lo studio ABC vuole valutare

se, e che misura, la popolazione residente nell'area di Civitavecchia sia da ritenersi esposta per via inalatoria e/o alimentare a specifici xenobiotici, con particolare riferimento a metalli pesanti, policlorobifenili (PCB), diossine, metaboliti degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e benzene, in misura superiore a quanto rilevabile in popolazioni di controllo per le quali si possa escludere l'influenza di analoghe fonti antropiche di esposizione. Lo studio prevede inoltre la costituzione di una banca per la conservazione del materiale biologico raccolto nel corso dello studio per future analisi e determinazioni relativi ai meccanismi del danno biologico di natura ambientale. La banca biologica viene affidata alla "Fondazione Bioteca di Sarroch" (8-9), per le proprie caratteristiche relative alle tecnologie scientificamente avanzate e alle pratiche etiche, sociali e democratiche nella conservazione dei materiali biologici.

Modello dello studio, campionamento e arruolamento

Il campione di popolazione generale oggetto dello studio sarà costituito da 1.200 persone residenti nei comuni di Civitavecchia, Santa Marinella, Allumiere e Tolfa, scelto in modo casuale dopo aver stratificato per genere e distribuzione sul territorio delle concentrazioni degli inquinanti, secondo fasce definite da modelli di dispersione delle emissioni atmosferiche prodotti in collaborazione con ARPA Lazio. In particolare, con una attività parallela al presente progetto, sono definite le mappe di isoconcentrazione degli inquinanti sulla base dei seguenti fattori di emissione: centrali termoelettriche, porto, traffico veicolare, riscaldamento civile.

Nel campione di popolazione verranno rilevati i livelli di concentrazione di alcuni inquinanti nelle matrici biologiche e verranno inoltre valutati alcuni indicatori di salute; la numerosità campionaria è stata calcolata in modo tale da evidenziare eventuali scostamenti significativi rispetto ai valori di riferimento nella popolazione generale degli inquinanti misurati ovvero per effettuare confronti interni per diversi livelli di esposizione. Saranno escluse dal campione le persone che risiedono nell'area in studio da meno di 10 anni.

Esami di laboratorio e strumentali ed interviste

Lo studio di bio-monitoraggio umano prevede la valutazione di laboratorio dei seguenti inquinanti:

1. metalli pesanti nelle urine e nel sangue, per la sola determinazione del Piombo e Mercurio;
2. policlorobifenili (PCB), diossina-simili e diossine (PCDD/PCDF) nel sangue (un sottocampione di 50 persone);

3. metaboliti degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) nelle urine;
4. metaboliti del benzene nelle urine;
5. cotinina nelle urine.

Altri esami di laboratorio valuteranno indicatori emato-chimici-specifici (metabolismo glicemico, lipidico, funzionalità epatica, renale, endocrina) e verrà effettuata una valutazione antropometrica, della pressione arteriosa e della funzionalità respiratoria; parallelamente verranno raccolte informazioni anamnestiche su comportamenti e storie di esposizione, quali consumo di prodotti alimentari vegetali ed animali provenienti dalla medesima area, storia occupazionale, abitudini di vita e storia clinica

Enti coinvolti, ruoli e responsabilità

L'indagine, coordinata dal Dipartimento di Epidemiologia del SSR del Lazio (DEP Lazio), si svolgerà in collaborazione con la ASL Roma F, competente sul territorio, e nello specifico:

- il Dipartimento di Prevenzione della ASL Roma F;
- Il Dipartimento di Cardiologia dell'Ospedale San Paolo di Civitavecchia;
- Laboratorio di Analisi dell'Ospedale San Paolo di Civitavecchia
- Centro Trasfusionale ASL Roma F;

e si avvarrà della collaborazione del Dipartimento Ambiente e connessa Prevenzione Primaria dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), dell'Istituto Nazionale per l'Assicurazione contro gli Infortuni sul Lavoro (INAIL), del Finnish National Health Institute (THL), della Sezione di Medicina del Lavoro, Malattie Respiratorie e Tossicologia Professionali e Ambientali dell'Università di Perugia e della Fondazione Bioteca di Sarroch (Ca).

Il DEP Lazio avrà la responsabilità, di gestire le seguenti attività:

1. progettazione e responsabilità generale dello studio;
2. campionamento della popolazione generale a partire dagli Archivi Anagrafici dei residenti;

3. gestione degli appuntamenti e visite (call center con numero verde dedicato, agenda degli appuntamenti);
4. accoglienza dei soggetti campionati per informazioni sullo studio e raccolta del consenso informato;
5. effettuazione dei prelievi ematici e raccolta delle urine;
6. misurazioni antropometriche e della pressione arteriosa;
7. esecuzione delle prove di funzionalità respiratoria;
8. effettuazione delle interviste;
9. trasporto dei campioni di sangue e urine per esami tossicologici all'ISS, all'INAIL, all'Università di Perugia e in Finlandia;
10. fornitura dei materiali: bilance, sfigmomanometro, materiale informativo, provette, contenitori urine, etichette codice a barre, questionario informatizzato, ecc.
11. spedizione dei referti ai soggetti partecipanti allo studio;
12. messa a punto, in collaborazione con ARPA Lazio, delle mappe di ricaduta degli impianti industriali, del porto, del traffico veicolare e del riscaldamento e delle biomasse del comprensorio di Civitavecchia, stimate attraverso l'uso di opportuni modelli di dispersione;
13. formazione di tutto il personale coinvolto nello studio ABC.

il Dipartimento di Prevenzione della ASL Roma F con il proprio personale e un ambulatorio messo a disposizione, situato presso la sede della Asl, nel Comune di Civitavecchia, avrà la responsabilità, di gestire le seguenti attività:

- a) fornire informazioni relative allo studio ABC alla popolazione anche pubblicizzandolo sul proprio sito ;
- b) fornire i locali per l'effettuazione delle visite e dei prelievi;
- c) reperimento numeri di telefono soggetti campionati.

il Laboratorio di Analisi dell'Ospedale San Paolo di Civitavecchia avrà la responsabilità, di gestire le seguenti attività:

- a) esecuzione esami di laboratorio non tossicologici;

- b) preparazione dei campioni di sangue e urine per esami tossicologici;
- c) preparazione e stoccaggio provvisorio dei campioni destinati alla biobanca.

Il Dipartimento di Cardiologia dell'Ospedale San Paolo di Civitavecchia avrà la responsabilità di:

- a) refertare le prove spirometriche effettuate;
- b) validare le informazioni individuali della carta di rischio cardiovascolare.

Il Centro Trasfusionale della ASL Roma F avrà la responsabilità, di gestire le seguenti attività:

- a) selezione 50 donatori di sangue abituali per l'esame delle diossine e dei PCB;
- b) effettuazione dei prelievi ematici e raccolta delle urine per questo sottogruppo;

L'ISS, Reparto Bioelementi e Salute, eseguirà gli esami tossicologici relativi i metalli pesanti; l'INAIL, Dipartimento Medicina del Lavoro, eseguirà gli esami tossicologici relativi a IPA, benzene e cotinina; il Finnish National Health Institute eseguirà le determinazioni di diossine e PCB; la Sezione di Medicina del Lavoro dell'Università di Perugia eseguirà altre determinazioni relative agli IPA; la "Fondazione Bioteca di Sarroch" (fondazione senza fini di lucro) con l'obiettivo della conservazione di materiali biologici avrà la responsabilità dello stoccaggio dei campioni biologici.

MODELLO DELLO STUDIO

Lo studio ABC è uno studio epidemiologico trasversale in cui in un campione di popolazione generale verrà definito un profilo tossicologico (determinazione della concentrazione di sostanze tossiche nel sangue e nelle urine) e un profilo dello stato di salute (misure antropometriche, prove di funzionalità respiratoria, analisi chimiche del sangue e delle urine, carta del rischio cardiovascolare). Il campione verrà anche sottoposto ad una intervista strutturata per la raccolta di informazioni anamnestiche su comportamenti e storie di esposizione, quali consumo di prodotti alimentari vegetali ed animali provenienti dalla medesima area, storia occupazionale, abitudini di vita e storia clinica.

Il modello di studio confronterà i residenti esposti alle concentrazioni degli inquinanti emessi dagli impianti presenti nel comprensorio di Civitavecchia (centrale termoelettrica, area portuale, traffico veicolare e attività urbane in genere) e quelli non esposti a queste emissioni. L'esposizione sarà determinata dalla residenza in zone caratterizzate da diverse concentrazioni al suolo degli inquinanti emessi dagli impianti che saranno sviluppati in collaborazione con ARPA Lazio. I soggetti saranno campionati dalla popolazione generale residente nei comuni dell'area in studio che coinvolge l'intero comune di Civitavecchia e i comuni di Allumiere, Tolfa e Santa Marinella. Al primo gennaio 2013 risultano residenti nel comune di Civitavecchia 51.261 persone, 4.131 ad Allumiere, 17.455 a Santa Marinella e 5.148 a Tolfa (ISTAT).

Lo studio ABC prevede l'estrazione di un campione di popolazione generale di 1.200 persone di età compresa tra 35 e 69 anni, residenti nell'area in studio da almeno 10 anni. Il campione garantirà la rappresentatività per genere, classi di età quinquennali e fasce definite dai modelli di ricaduta degli inquinanti emessi in atmosfera. All'interno del campione verrà selezionato un sottogruppo di 50 persone, donatori abituali presso il Centro trasfusionale della Asl Roma H, per la determinazione di diossine e PCB.

Le condizioni di origine personale, voluttuaria od occupazionale potenzialmente correlate con un'esposizione a metalli, PCB, diossine, IPA, benzene e nicotina sarà valutata mediante apposito questionario. Non vi saranno selezioni a priori, né a posteriori, delle persone campionate: l'abitudine al fumo di tabacco e l'assunzione di quantità di alcoolici superiori ai valori medi consigliati dall'OMS non saranno criteri di esclusione dei soggetti, così come non lo saranno la possibile esposizione occupazionale ai composti chimici in studio, emergente al momento della compilazione del questionario. La valutazione dell'influenza di tali condizioni sui parametri ematici sarà effettuata in sede di analisi delle informazioni raccolte.

Infine, una parte dei campioni biologici (sangue, urine, capelli e unghie) raccolti saranno inviati alla Fondazione Bioteca di Sarroch (Ca) che è la biobanca individuata come custode dei campioni di materiale biologico dei cittadini partecipanti allo studio ABC.

La conservazione dei campioni consentirà di eseguire misurazioni ripetute nel tempo per mettendo quindi di valutare dinamicamente come l'organismo risponde alle sostanze tossiche, la loro eventuale persistenza ed eliminazione, la reversibilità delle modificazioni biologiche precoci e, in alcuni casi, dei danni (ad esempio, nel caso di alterazioni al patrimonio genetico, grazie ai meccanismi spontanei di riparazione del Dna). Inoltre, considerato il rapido sviluppo delle conoscenze e delle tecnologie nel settore, è pensabile che in futuro saranno possibili ulteriori analisi, oggi non disponibili o addirittura neppure ipotizzabili.

CAMPIONAMENTO E ARRUOLAMENTO

Campionamento

1. Le persone presenti nelle liste anagrafiche dei comuni coinvolti verranno georeferenziate sulla base dell'indirizzo di residenza al 31 dicembre 2012;
2. verranno selezionati per l'estrazione le persone di età compresa tra 35 e 69 anni residenti nell'area da almeno 10 anni;
3. verrà effettuato un campionamento casuale stratificato per comune di residenza per un totale di 2.000 soggetti (assumendo una rispondenza del 60%);
4. l'estrazione dei soggetti oggetto dello studio verrà effettuata dal DEP Lazio. Per tenere in considerazione la diversa dimensione delle popolazioni dei comuni del comprensorio, il campione finale di 1200 residenti sarà costituito al 60% da residenti nel comune di Civitavecchia mentre il restante 40% sarà suddiviso tra i residenti dei comuni di Allumiere, e Tolfa;
5. all'interno del campione, 50 persone saranno selezionate tra gli iscritti alle liste del centro trasfusionale della Asl Roma F, questi donatori abituali saranno sottoposti ad un ulteriore prelievo per la determinazione delle diossine.
6. per ogni soggetto campionato saranno disponibili: nome, cognome, indirizzo postale e il nominativo del corrispondente medico di medicina generale (MMG);
7. al soggetto campionato verrà inviata una lettera di invito (allegata);
8. il MMG verrà informato tramite lettera che il proprio assistito è stato estratto per lo studio e gli verrà chiesta collaborazione per facilitarne la partecipazione;
9. oltre all'invito per lettera, i soggetti campionati verranno contattati telefonicamente.

Arruolamento

Le liste dei soggetti campionati e il calendario degli appuntamenti sarà gestita dal personale del DEP Lazio; per la gestione dell'arruolamento sono previste le tappe seguenti:

1. assegnazione numero progressivo a ciascun soggetto campionato da 1 a 2000
2. invio lettera di invito per partecipare allo studio;
3. la lettera di invito conterrà i seguenti elementi:
 - a. in indirizzo soggetto campionato;
 - b. chiarimento obiettivi dello studio ABC;
 - c. paragrafo sull'offerta di un controllo sanitario;
 - d. ruolo diversi attori: DEP Lazio, ASL Roma F, ISS, INAIL, THL, Bioteca;
 - e. invito a contattare il centro di coordinamento dello studio, fornito di call center con numero verde, per concordare con l'operatore data e orario per appuntamento controllo sanitario;
 - f. numero di telefono e persona di riferimento da contattare per confermare o cambiare data e/o orario appuntamento

Per la gestione degli appuntamenti verrà predisposto un documento excel che conterrà le seguenti informazioni :

- a. nome, cognome
- b. numero progressivo
- c. telefono
- d. nome MMG
- e. telefono MMG
- f. data e ora appuntamento
- g. data invio lettera
- h. data invio seconda lettera
- i. data primo tentativo contatto
- j. data secondo tentativo contatto
- k. data terzo tentativo contatto
- l. data e ora nuovo appuntamento
- m. esito arruolamento

- n. motivo esclusione (rifiuto (con motivazione rifiuto), mancato reperimento, decesso, trasferimento, motivi di salute, fuori residenza per motivi studio/lavoro, ecc.)

ESAMI DI LABORATORIO, MISURE E INTERVISTE

La scelta dei *biomarkers* di esposizione alle emissioni degli impianti industriali, al porto, al traffico veicolare, al riscaldamento e bio masse si è basata su:

- criteri di letteratura
- valutazioni dati ambientali
- opportunità di laboratorio.

Il protocollo di studio prevede la raccolta di campioni biologici e la raccolta di informazioni su abitudini e caratteristiche individuali, nello specifico storia professionale, abitudini e stili di vita, abitudini al fumo, dieta e anamnesi. Il consumo di tabacco, l'esposizione ad emissioni da traffico, il consumo di alcuni cibi possono influire sulle concentrazioni degli analiti indagati. Per favorire l'interpretazione dei risultati delle analisi sui campioni biologici, si effettuerà la raccolta di tali informazioni con un particolare approfondimento per i giorni che immediatamente precedono il prelievo di sangue e la raccolta delle urine.

Metalli pesanti

La scelta dei metalli pesanti da determinare è basata su dati di letteratura. La scelta della matrice biologica su cui eseguire le analisi ha tenuto conto delle indicazioni riportate nei documenti pubblicati dall'*American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) nel 2006 e dal WHO nel 2012. Entrambi i documenti sono concordi nell'indicare il sangue come migliore matrice biologica per la determinazione del piombo, mentre gli altri metalli possono essere analizzati nelle urine. Poiché la maggior parte (> ¾ del totale) del mercurio ematico è rappresentato da forme organiche, la sua concentrazione nel sangue è ragionevolmente accettata come misura di esposizione a metil-mercurio (consumo di prodotti marini) e verrà determinata nello studio insieme al livello urinario. La tabella seguente riporta sinteticamente i riferimenti utilizzati e la lista di metalli che verranno ricercati, e relativa matrice biologica.

TRM Spa - TORINO

elenco metalli pesanti da determinare e matrice biologica scelta

indicatori biologici di esposizione	AIA (n. 309 - 557341/2006)	matrice biologica		analiti e matrice scelti
		ACGIH 2006	WHO 2012	
zinco	X	-	-	Urina
cadmio	X	sangue/urina	Urina	Urina
antimonio	X		-	Urina
arsenico	X	Urina	Urina	Urina
piombo	X	Sangue	Sangue	Sangue
cromo	X	sangue/urina	Urina	Urina
cobalto	X	sangue/urina	Urina	Urina
rame	X	-	Urina	Urina
manganese	X	-	-	Urina
nichel	X	-	Urina	Urina
vanadio	X	-	Urina	Urina
stagno	X	-	-	Urina
mercurio	X	sangue/urina	Urina	Sangue/Urina
tallio	X	-	-	Urina
cesio				Urina
berillio				Urina
palladio°				Urina
platino°				Urina

rodio°				Urina
--------	--	--	--	-------

° gli ultimi tre presenti nelle marmitte catalitiche.

Per la facilità di campionamento l'urina è la matrice biologica più ampiamente usata per la popolazione generale, in particolare per le sostanze con breve emivita biologica, non persistenti e rapidamente metabolizzate. L'esame dell'urina è anche facilitata dalle più alte concentrazioni di xenobiotici rispetto al sangue quando si tratta di composti a metabolismo ad escrezione rapida. Il principale svantaggio consiste nella variabilità del volume giornaliero e della densità delle urine stesse. La determinazione dei metalli sarà effettuata a partire da un campione di urine del primo mattino che sono più concentrate e migliorano la capacità di rilevazione, rispetto alle urine spot, che risentono di maggiore variabilità nei livelli di diluizione; i risultati saranno comunque normalizzati per la creatinina urinaria. La raccolta sarà effettuata mediante un apposito contenitore da 100 ml (Kartell, in polietilene), che verrà approntato allo scopo. I contenitori disponibili in commercio verranno preventivamente decontaminati, mediante lavaggio con soluzione al 10% di HNO₃, per evitare possibili contaminazioni da metalli. Soltanto mercurio e piombo saranno cercati nel sangue, mediante specifica provetta Vacutainer *metal free*, avendo l'accortezza di effettuarne il prelievo da ultimo, per consentire con i primi prelievi di effettuare il *wash out* del metallo dell'ago, utilizzato per il prelievo. I contenitori contenenti le urine e le provette con il sangue campionato saranno trasferiti in ghiaccio secco o in mezzo di trasporto a temperatura controllata a laboratori del Dipartimento Ambiente e connessa Prevenzione Primaria dell'ISS.

Un campione di unghie (delle mani o dei piedi) e di capelli (una ciocca del diametro di circa 1 cm nella zona del vertice posteriore del capo) saranno raccolti e conservati per ulteriori determinazioni dei metalli.

Benzene

Tra i principali inquinanti che un impianto industriale può emettere nell'ambiente vi sono il benzene e gli IPA. Gli impianti industriali non sono l'unica fonte di tali inquinanti, la cui presenza è

stata ampiamente rilevata nel gas di scarico auto veicolare; inoltre il fumo di sigaretta risulta essere una delle maggiori fonti di esposizione personale a benzene e derivati (BTEX). I metaboliti del benzene oggetto dell'indagine sono l'acido S-fenilmercapturico (SPMA) e l'acido trans, trans-muconico (tt-MA) urinari.

Idrocarburi policiclici aromatici

La scelta degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) da ricercare si orienta sulla base delle evidenze di letteratura relative alla cancerogenicità di tali composti secondo la classificazione IARC; alle indicazioni dell'*Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR); e alla fattibilità di misure di laboratorio.

La scelta di utilizzare un pannello di metaboliti urinari degli IPA in luogo di un singolo biomarcatore riassuntivo (ad esempio l'1-idrossipirene) è da ricercare nella maggiore informatività di tale analisi. Le informazioni derivate da un'analisi di multipli metaboliti degli IPA saranno incrociate con le relative analisi ambientali per cercare di creare, se possibile, un profilo specifico per tipologia di inquinamento.

E' stato quindi scelto di determinare, con tecnica HPLC e spettrometria di massa, la concentrazione urinaria dell'1-idrossipirene, indicatore generico di esposizione ad IPA, del 3-idrossibenzo[a]pirene, indicatore di esposizione a benzo[a]pirene, l'unico IPA posto in classe 1 dalla IARC, e dei 6 e 8 nitro-1-pirenoli, metaboliti del nitro pirene, marker molecolare delle emissioni diesel.

Inoltre saranno determinate, con tecniche di immunofluorescenza, le concentrazioni urinarie del 1-idrossifenantrene, del 2-idrossifenantrene, 3-idrossifenantrene, 4-idrossifenantrene, 9-idrossifenantrene, 1-idrossinaftalene, 2-idrossifluorene, 9 idrossifluorene.

Cotina

L'abitudine al fumo di tabacco espone i soggetti a migliaia di sostanze chimiche, fra le quali anche benzene ed IPA, e rappresenta quindi un rilevante fattore confondente negli studi di biomonitoraggio. Per valutare quantitativamente l'entità di questa esposizione nell'interpretazione dei dati verrà misurata la cotina urinaria, specifico metabolita della nicotina.

Ulteriori analisi

Un fase successiva del progetto, che richiede il reperimento di ulteriori risorse e la messa a punto delle metodiche analitiche, si potranno includere la determinazione degli indicatori biochimici di ossidazione della guanina, della guanosina e della deossiguanosina determinabili mediante HPLC-MS/MS.

Policlorobifenili (PCB), diossino-simili e diossine (PCDD/PCDF)

La determinazione delle diossine verrà effettuata su un sottogruppo di 50 persone selezionate dalle liste dei donatori abituali del Centro Trasfusionale della ASL Roma F in base alla loro residenza nel territorio, al sesso e all'età. Con il termine diossine si intende un gruppo di sostanze che includono le policloro-dibenzo-diossine (PCDD) e i policloro-dibenzofurani (PCDF). Ogni sostanza è dotata di una sua particolare tossicità definita TEF (*toxicequivalencyfactor*) che esprime la tossicità di un determinato congenere in riferimento alla tossicità della 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-diossina (TCDD) (TEF=1). Per valutare globalmente il rischio da esposizione a tali sostanze viene utilizzata la *toxicequivalency* (TEQ) calcolata come sommatoria delle concentrazioni ematiche di ogni sostanza moltiplicata per i relativi TEF. Si è deciso di dosare i 7 congeneri delle diossine 2,3,7,8-sostituite ed i 10 congeneri di furani 2,3,7,8-sostituiti, che sono utilizzati per il calcolo delle TEQ, come riportato nella seguente tabella.

Tabella 4: elenco congeneri diossine e furani da determinare:

indicatori biologici di esposizione	AIA n. 309 - 557341/2006	matrice biologica	analiti scelti
2,3,7,8-T ₄ CDD	x	sangue	X
1,2,3,7,8-P ₅ CDD	x	sangue	X
1,2,3,4,7,8-H ₆ CDD	x	sangue	X
1,2,3,6,7,8-H ₆ CDD	x	sangue	X
1,2,3,7,8,9-H ₆ CDD	x	sangue	X
1,2,3,4,6,7,8-H ₇ CDD	x	sangue	X
O ₈ CDD	x	sangue	X
2,3,7,8-T ₄ CDF	x	sangue	X
1,2,3,7,8-P ₅ CDF	x	sangue	X
2,3,4,7,8-P ₅ CDF	x	sangue	X
1,2,3,4,7,8-H ₆ CDF	x	sangue	X
1,2,3,6,7,8-H ₆ CDF	x	sangue	X
1,2,3,7,8,9-H ₆ CDF	x	sangue	X
2,3,4,6,7,8-H ₆ CDF	x	sangue	X
1,2,3,4,6,7,8-H ₇ CDF	x	sangue	X
1,2,3,4,7,8,9-H ₇ CDF	x	sangue	X
O ₈ CDF	x	sangue	X

Parallelamente, sullo stesso campione di sangue prelevato per la determinazione dei 17 congeneri di PCDD/PCDF, pari a 100 ml (10 provette di Vacutainer per sierologia), verrà effettuata la ricerca di 12 congeneri di PCB_{dl} (*dioxin-like*)

elenco congeneri 12 PCB_{dl} (*dioxin-like*) da determinare

indicatori biologici di esposizione	AIA n. 309 -557341/2006	matrice biologica	analiti scelti
T4CB-77		Sangue	X
T4CB-81		Sangue	X
P5CB-126		Sangue	X
H6CB-169		Sangue	X
P5CB-105		Sangue	X
P5CB-114		Sangue	X
P5CB-118		Sangue	X
P5CB-123		Sangue	X
H6CB-156		Sangue	X
H6CB-157		Sangue	X
H6CB-167		Sangue	X
H7CB-189		Sangue	X

A questo elenco di 12 congeneri di PCB_{dl} si aggiungerà comunque la determinazione dei PCB totali e di tutti e 30 i congeneri di PCB_{ndl} (*nondioxin-like*).

Per l'elevato costo di ogni singola determinazione, la ricerca viene limitata ai 17 congeneri di PCDD/PCDF, ai 12 congeneri di PCB_{dl}, ai PCB totali e ai 30 PCB_{ndl}.

Dalle liste dei donatori abituali, verranno selezionati 50 soggetti di età compresa tra 35 e 55 anni ai quali verrà proposto di effettuare un campione aggiuntivo di sangue (100 ml) per la ricerca dei PCDD/F e PCB. La determinazione sarà fatta su siero. I campioni prelevati potranno essere lasciati sieriare spontaneamente o per centrifugazione, entro sei ore dal prelievo. Il siero ottenuto dovrà essere trasferito da ciascuna delle provette in due provette Falcon in PTFE da 50 ml e congelato a -20°C fino alla spedizione.

Esami di laboratorio generali

A tutti i soggetti campionati verranno effettuati esami laboratorio (vedi tabella), allo scopo di:

- valutare lo stato di salute generale, mediante esami di ematochimici mirati alla valutazione della funzionalità di vari sistemi e dei fattori di rischio cardiovascolare;
- valutare, attraverso esami di funzionalità endocrina, possibili indicatori di tossicità, infatti alcuni inquinanti (es. PCDD/PCDF e PCB) si comportano a volte come *endocrine disruptor* sostituendosi agli ormoni e determinando alterazioni sulla normale funzionalità endocrina;
- incentivare la partecipazione fornendo i risultati della valutazione dello stato di salute al soggetto.

Elenco esami di laboratorio per valutazione stato generale di salute, rischio cardiovascolare, funzionalità renale.

<i>Sangue</i>
<i>emato-chimica generale</i>
emocromo con formula
Glicemia

emoglobina glicosilata
bilirubina totale, diretta e indiretta
GOT, GPT, gGT
colesterolo totale
colesterolo HDL
Trigliceridi
<i>funzionalità renale</i>
Creatinina
acido urico
<i>funzionalità endocrina</i>
FT4
TSH
<i>Urine</i>
esame urine standard completo
Microalbuminuria
Creatininuria

I valori di glicemia e colesterolo, insieme con quello della pressione arteriosa, l'abitudine al fumo e la familiarità, consentono di calcolare il rischio di eventi cardio-cerebrovascolari nei successivi 10 anni. Il punteggio è uno strumento di promozione della salute utilizzato in medicina generale per promuovere e monitorare i cambiamenti negli stili di vita e prevenire eventi vascolari. I risultati di laboratorio osservati, insieme al punteggio di rischio calcolato, verranno perciò consegnati al soggetto campionato, chiedendogli di informarne il proprio medico di medicina generale (MMG).

Banca biologica sangue e urine

Una quota del prelievo ematico (una provetta "sierologica" da 7ml e due provette con EDTA da 3,5 ml) sarà riservata allo stoccaggio e alla conservazione per future indagini di laboratorio. Il quantitativo di sangue descritto consentirà di poter disporre per ciascun soggetto campionato di:

- 4 ml di siero
- 4 ml di plasma
- 1 ml di globuli rossi (in 0,25 di soluzione fisiologica)
- 1 ml di buffycoat (in 0,25 di soluzione fisiologica)
- Urine

Il materiale biologico verrà stoccato in paillettes di polietilene, ossia in tubicini finissimi, simili a capillari, distinguibili per colore del manicotto o del tampone di cotone e per numerazione; vengono riempite mediante un'apposita macchina e conservate prima a -80°C e poi inviate alla Biotecaper la conservazione in azoto liquido a -179°C. A questo scopo il protocollo di intesa con la Bioteca prevede l'utilizzo degli impianti di conservazione e gestione della banca biologica. ~~vengono riempite mediante un'apposita macchina e conservate prima a -80°C e poi inviate alla Biotecaper la conservazione all'interno di congelatori -80°C. A questo scopo il protocollo di intesa con la Bioteca prevede l'utilizzo degli impianti di conservazione e gestione della banca biologica~~

Raccolta materiali biologici e visita

In occasione del primo appuntamento col soggetto campionato che si svolgerà presso un ambulatorio della ASL ROMA F a Civitavecchia, verrà effettuata una valutazione:

- dello stato di salute generale
- della funzionalità respiratoria
- dei fattori di rischio cardio-cerebrovascolari

Verranno raccolte informazioni anamnestiche su comportamenti, stili di vita, storie di esposizione e lavorative, consumi e abitudini alimentari e storia clinica, sia nell'arco dell'intera vita che recenti ed effettuate misure antropometriche e cliniche. La spirometria verrà effettuata da un tecnico specializzato in fisiopatologia respiratoria. Obiettivo della spirometria è rilevare i parametri di funzione respiratoria nella popolazione. Verranno rilevati i principali parametri di funzionalità respiratoria: FVC, FEV1, FEV1/VC, Flussi ai piccoli volumi, e saturimetria transcutanea. La spirometria sarà eseguita prima e dopo broncodilatatore secondo i protocolli GOLD. Durante la

visita verrà effettuata una determinazione della saturazione della emoglobina mediante saturimetro. Al soggetto verrà inoltre chiesto un campione di unghie (delle mani o dei piedi, senza smalto) e di capelli (una ciocca del diametro di circa 1 cm nella zona del vertice posteriore del capo) saranno raccolti e conservati per ulteriori determinazioni dei metalli.

Al termine della visita al soggetto verrà fissato un secondo appuntamento presso lo stesso ambulatorio della ASL (ore 7.30-9-30) per l'effettuazione del prelievo ematico. Al soggetto verrà inoltre consegnato un contenitore per la raccolta del campione di urina e un questionario da compilare il giorno prima dell'appuntamento entrambi da consegnare il giorno del prelievo ematico.

Al soggetto verrà raccomandato di evitare di consumare cibi affumicati (provola affumicata, salmone affumicato, etc) o cotti alla brace e di evitare, se possibile, l'esposizione a fumo di legna o carbone (stufe caminetti, barbecue) nei due-tre giorni precedenti la raccolta delle urine.

Il primo appuntamento con i soggetti campionati prevede le seguenti azioni da eseguirsi nell'ordine che segue:

1. accoglienza, con presentazione degli obiettivi dello studio e chiarimenti
2. raccolta consensi informati su prelievo (allegato), utilizzo e conservazione materiali biologici, autorizzazione *record linkage* con altre banche dati
3. misurazione pressione arteriosa
4. intervista standardizzata su PC (vedi questionario - allegato 1)
5. misura peso, altezza
6. spirometria e saturometria
7. richiesta prelievo capelli ed urine

Il secondo appuntamento con i soggetti campionati, fissato dal centro di coordinamento dello studio, prevede le seguenti azioni da eseguirsi nell'ordine che segue:

1. accoglienza, con presentazione degli obiettivi dello studio e chiarimenti
2. questionario auto compilato su esposizioni recenti: 24h e 1 settimana (vedi questionario – allegato 2)
3. raccolta delle urine
4. prelievo ematico

I 50 soggetti selezionati per la determinazione delle diossine verranno invitati, dal centro di coordinamento dello studio, presso il Centro Trasfusionale AVIS – Ospedale San Paolo Civitavecchia e, durante i due appuntamenti, saranno oggetto delle azioni previste per il resto della coorte precedentemente descritte.

Il Dipartimento di Epidemiologia del SSR assicurerà inoltre:

1. formazione di tutto il personale coinvolto nello studio ABC: organizzazione, modalità di accoglienza e intervista, utilizzo questionario su PC e autosomministrato, misurazione pressione arteriosa, ecc.;
2. fornitura dei materiali: bilance, sfigmo, fonendo, materiale informativo, provette, contenitori urine 24h, etichette codice a barre, questionario informatizzato, questionario autosomministrato, data entry, ecc.;
3. le risposte individuali alle persone coinvolte circa i risultati degli accertamenti svolti.

ASPETTI NORMATIVI ED ETICI

Assicurare la riservatezza delle informazioni personali raccolte è un elemento portante del progetto ABC.

- Saranno preparati archivi sicuri per assicurare la riservatezza delle liste di campionamento e dei questionari cartacei, prevedendo procedure per distruggerli dopo la validazione;

- le informazioni raccolte dovranno essere rese rapidamente anonime, dopo le prime verifiche sulla correttezza e completezza dell'intervista, in modo da impedire che si possa in qualunque modo collegarle all'identità degli intervistati;
- i supporti (computer, server, memorie e dischi portatili, ecc.) dedicati alla raccolta, alla conservazione -anche temporanea – e all'elaborazione dei dati della sorveglianza, dovranno essere dotati di adeguati meccanismi di sicurezza e di protezione per impedire l'accesso ai dati da parte di persone non autorizzate;
- per reperire il numero telefonico degli intervistati, si farà ricorso all'e fonti informative disponibili all'interno delle ASL e agli elenchi telefonici.

Aspetti etici:

- gli intervistati verranno informati preventivamente tramite lettera dello scopo dell'indagine e delle modalità di svolgimento delle interviste, specificando in particolare gli accorgimenti presi per garantire la riservatezza delle informazioni personali raccolte;
- verrà richiesto un consenso informato alla partecipazione allo studio precisando la possibilità per la persona rifiutarla o di interromperla in qualunque momento.

Questo protocollo è stato sottoposto all'approvazione del Comitato Etico della Asl Roma E.

Struttura organizzativa e gestione delle attività

Il Dipartimento di Epidemiologia del SSR del Lazio è il soggetto coordinatore del progetto.

Ai fini della continua revisione e valutazione del protocollo, del disegno, della analisi ed interpretazione dei risultati è costituito un gruppo di coordinamento formato da:

- il gruppo di lavoro "Valutazioni epidemiologiche", coordinato dal Dipartimento di Epidemiologia del SSR del Lazio, e costituito dal Dipartimento di Epidemiologia del SSR del

Lazio, dal Dipartimento di Prevenzione della ASL Roma F e dal Dipartimento di Cardiologia dell'Ospedale San Paolo di Civitavecchia;

- e dal gruppo di lavoro “Valutazioni tossicologiche”, coordinato dal Dipartimento Ambiente e connessa Prevenzione Primaria dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), e costituito anche dal Dipartimento Ambiente e connessa Prevenzione Primaria dell'ISS, dal Dipartimento Medicina del Lavoro dell'INAIL, dal Finnish National Health Institute, della Sezione di Medicina del Lavoro, Malattie Respiratorie e Tossicologia Professionali e Ambientali dell'Università di Perugia e dalla Bioteca Sarroch.

Rapporti con la stampa e con i media, interventi a pubblici dibattiti

Sarà opportuno Informare preventivamente il coordinatore e concordare preventivamente il contenuto della comunicazione. In generale, nella comunicazione bisognerà fare riferimento esclusivamente ai risultati empirici dello studio, e fare in modo che i risultati dello studio siano commentati in modo scientificamente valido ed offerti in modo non distorto alla discussione. Non potranno essere comunicati risultati provvisori o preliminari.

A studio completato

- Il coordinatore preparerà una proposta di rapporto conclusivo che sottoporrà al gruppo di lavoro.
- Il gruppo di coordinamento si esprimerà in merito al rapporto e alla proposta di pubblicazione.
- Il coordinatore preparerà un rapporto finale che verrà inviato alla Regione Lazio e alle amministrazioni dei comuni oggetto dello studio ABC.

Il processo di revisione tra pari è parte integrante dello studio; i risultati dello studio ABC dovranno quindi essere sottoposti per la pubblicazione a riviste scientifiche accreditate.

I partecipanti al progetto si impegnano a rispettare le norme di comunicazione stabilite, evitando di esprimere opinioni personali sui contenuti del progetto salvo, quando esplicitamente riportato nei documenti ufficiali.

Riferimenti responsabili organizzazione del Progetto ABC:

per il Dipartimento di Epidemiologia SSR Lazio

Dr. Francesco Forastiere e mail: f.forastiere@deplazio.it

Dr.ssa Carla Ancona email: c.ancona@deplazio.it

per il Dipartimento di Prevenzione, ASLRomaF

Dr. Augusto Pizzabiocca email: augusto.pizzabiocca@aslrnf.it

Bibliografia

1. Bonassi S, Ceppi M, Puntoni R, Valerio F, Vercelli M, Belli S, Biocca M, Comba P, Ticchiarelli L, Mariotti F, et al. Mortality studies of dockyard workers (longshoremen) in Italy. *Am J Ind Med* 1985;7(3):219-27.
2. Rapiti E, Turi E, Forastiere F, Borgia P, Comba P, Perucci CA, Axelson O. A mortality cohort study of seamen in Italy. *Am J Ind Med* 1992;21(6):863-72.
3. Forastiere F, Pupp N, Magliola E, Valesini S, Tidei F, Perucci CA. Respiratory cancer mortality among workers employed in thermoelectric power plants. *Scand J Work Environ Health* 1989;15(6):383-6.
4. Forastiere F, Corbo GM, Michelozzi P, Pistelli R, Agabiti N, Brancato G, Ciappi G, Perucci CA. Effects of environment and passive smoking on the respiratory health of children. *Int J Epidemiol.* 1992;21(1):66-73.
5. Forastiere F, Corbo GM, Pistelli R, Michelozzi P, Agabiti N, Brancato G, Ciappi G, Perucci CA. Bronchial responsiveness in children living in areas with different air pollution levels. *ArchEnvironHealth* 1994;49(2):111-8.
6. Fano V, Michelozzi P, Ancona C, Capon A, Forastiere F, Perucci CA. Occupational and environmental exposures and lung cancer in an industrialised area in Italy. *OccupEnvironMed.* 2004 Sep;61(9):757-63.
7. Fano V, Forastiere F, Papini P, Tancioni V, Di Napoli A, Perucci CA. Mortalità e ricoveri ospedalieri nell'area industriale di Civitavecchia, anni 1997-2004. *Epidemiologia e Prevenzione* 2006; 30(4-5): 221-26.
8. Biggeri A, De Marchi B, Tallacchini M. La Bioteca di Sarroch: uno strumento civico a tutela della salute umana e ambientale; *Ecoscienza*, 3, 2001: 14.
9. De Marchi B, La bioteca di Sarroch: comunicare con i fatti. *Epidemiologia e Prevenzione*; maggio-agosto 2001: 243-4.