

Progetto SEpiAs CCM 2010

Sorveglianza epidemiologica
in aree interessate da inquinamento
ambientale da arsenico
di origine naturale o antropica



*Progetto finanziato dal
Ministero della Salute
Centro Nazionale per la Prevenzione
e il Controllo delle Malattie*

Ente coordinatore:

***Istituto di Fisiologia Clinica
Consiglio Nazionale delle Ricerche
Via Moruzzi, 1 – 56124 Pisa***

PROTOCOLLO di STUDIO



*Pisa, 28 Gennaio 2011
aggiornamento 15 Dicembre 2011*

INDICE

PARTECIPANTI ALLO STUDIO	5
SINOSSI DELLO STUDIO	6
1. INTRODUZIONE E MOTIVAZIONE	7
2. OBIETTIVO DELLO STUDIO	12
3. DISEGNO DELLO STUDIO	13
3.1 Campionamento	13
3.2 Criteri per la definizione delle aree di campionamento	13
3.3 Analisi statistiche	14
3.4 Valutazioni epidemiologiche	14
3.5 Intervista e questionario	14
3.6 Prelievo	16
3.7 Analisi di laboratorio	16
3.7.1 Sinossi degli esami di laboratorio	18
3.7.2 Esami del sangue e breve descrizione	20
3.7.3 Elenco dei biomarcatori e descrizione	20
3.8 Esami cardiologici	22
3.9 Consenso informato, aspetti etici e diffusione dei risultati dello studio	25
4. TEMPI DI REALIZZAZIONE DEL LAVORO	26
5. VALUTAZIONE	26
6. GESTIONE DEI DATI E CRITERI DI PUBBLICAZIONE	28
7. FINANZIAMENTO	28
8. STRUMENTI ALLEGATI	29
9. DOCUMENTI ALLEGATI	29

PARTECIPANTI ALLO STUDIO

UNITA' OPERATIVE PARTECIPANTI

Unità Operativa	Responsabile
UOC Coordinamento	Fabrizio Bianchi, IFC-CNR, Pisa
U01 Viterbo - Lazio	Domenico Spera, Azienda Unità Sanitaria Locale (AUSL) Viterbo Paola Michelozzi, Dipartimento Epidemiologia del S.S.R., ASL RME, Regione Lazio
U02 Amiata - Toscana	Riccardo Frazzetta, Responsabile U.F. Igiene e Sanità Pubblica Zona Amiata Val d'Orcia, USL 7, Abbadia San Salvatore Francesco Cipriani, Coordinatore Osservatorio di Epidemiologia, Agenzia Regionale di Sanità della Toscana, Firenze
U03 Taranto - Puglia	Sante Aldo Minerba, Direttore S.C. Statistica Epidemiologia, ASL Taranto Giorgio Assennato, Direttore Generale ARPA Puglia, Bari
U04 Gela - Sicilia	Salvatore Migliore, UO Epidemiologia, Distretto di Gela, ASP di Caltanissetta, Gela Salvatore Scondotto, Dipartimento Osservatorio Epidemiologia, Regione Sicilia, Palermo
U05 IFC CNR - Pisa	Maria Grazia Andreassi, Resp. Sezione Genetica molecolare, Istituto di Fisiologia Clinica del CNR, Massa
U06 Ist. Genetica Molecolare CNR, Pavia (IGM CNR)	Ivana Scovassi, Dirigente di ricerca, Istituto Genetica Molecolare del CNR, Pavia
U07 Fondazione S. Maugeri (FSM), Pavia	Claudio Minoia, Direttore Laboratorio misure ambientali e tossicologiche, IRCCS Fondazione Salvatore Maugeri, Pavia
U08 Fondazione S. Raffaele, Taranto (FSR) e IFC CNR - Pisa	Girolamo Catapano, Fondazione San Raffaele, Taranto Rosa Sicari, IFC CNR, Pisa

La **UO di coordinamento** del progetto opera in collaborazione con il Comitato Tecnico-Scientifico di Progetto. Il **Comitato Tecnico-Scientifico di progetto** è composto dai responsabili delle otto UO e dalla UO di coordinamento.

La **UO di coordinamento** è supportata da Liliana Cori*, Fabrizio Minichilli*, Elisa Bustaffa* e Sonia Marrucci** (*IFC-CNR; **Fondazione Toscana CNR – Regione Toscana).

SINOSSI DELLO STUDIO

Titolo	Progetto SEpiAs-CCM “Sorveglianza epidemiologica in aree interessate da inquinamento ambientale da arsenico di origine naturale o antropica”.
Razionale dello Studio	Risultati sull’associazione tra esposizione umana ad arsenico, desunta in modo indiretto dalla contaminazione di matrici ambientali e in modo diretto dalla misura dei livelli urinari e ematici, e misure di marcatori di effetto biologico e rischio preclinico sono stati riportati nella letteratura scientifica.
Disegno dello Studio	Studio epidemiologico osservazionale campionario, multicentrico, istituzionale, basato sulla misura di marcatori biologici e di rischio preclinico. Lo studio per ciascun soggetto reclutato prevede: - un’intervista tramite questionario standardizzato su dati antropometrici, storia residenziale, condizioni socio-economiche, esposizioni ambientali e occupazionali, stile di vita, dieta, percezione del rischi; - un prelievo di sangue e di un campione di urine; - la misura non invasiva di parametri clinici (P.A., ECG, ecografia cardiaca basale, ecografia dei vasi del collo). Lo studio non prevede che i pazienti siano assegnati a specifici trattamenti o a procedure mediche invasive.
Obiettivo	Valutare la relazione tra esposizione umana ad arsenico, stimata attraverso dati di inquinamento ambientale e valutata mediante indicatori di dose assorbita, e marcatori biologici di effetto precoce sulla salute, allo scopo di definire indicatori per un sistema avanzato di sorveglianza ambiente-salute.
Criteri di selezione delle Aree e dei Centri	Aree a rischio per la presenza documentata d’inquinamento ambientale da arsenico di origine naturale o antropico: comuni di Civita Castellana e Ronciglione (Viterbo), comuni di Abbazia San Salvatore e Piancastagnaio (Amiata), comune di Taranto, comune di Gela. Strutture sanitarie competenti nelle aree selezionate e strutture ambientali e sanitarie delle regioni interessate.
Criteri di inclusione dei soggetti	Soggetti maschi e femmine, di età 20-44, residenti nelle aree di studio almeno da 6 mesi prima del reclutamento, in considerazione delle conoscenze su tossico-cinetica e metabolismo dell’As (ciclo metabolico di breve durata). Soggetti non in terapia con farmaci contenenti arsenico da almeno 6 mesi.
Durata dello Studio	2 anni.
Periodo di studio	2011-2012 (con possibilità di prolungamento fino a 1 anno prevista dal contratto).
N. Centri partecipanti	4
Casistica	200 soggetti reclutati in 4 aree, con randomizzazione stratificata per sesso e età (50 per area, di cui 25 uomini e 25 donne, 10 in classe di età 20-29, 10 in classe 30-39, 5 in classe 40-44). Fonte di campionamento: Elenco degli assistiti in possesso delle 4 ASL coinvolte.
Principal Investigator	Dr. Fabrizio Bianchi, IFC CNR, Pisa.
Coordinamento biomedico e clinico	Comitato Tecnico-Scientifico di progetto, presso UO di coordinamento.

1. INTRODUZIONE E MOTIVAZIONE

Descrizione ed analisi del problema

Numerose aree del nostro Paese sono contaminate da arsenico (As) di origine naturale o antropica.

I potenziali effetti dell'esposizione cronica ad As rappresentano una preoccupazione per la salute umana.

L'arsenico inorganico è presente in rocce, suoli e acque che riguardano vasti territori, mentre in aree più circoscritte è documentato l'apporto di origine industriale. L'As inorganico è riconosciuto essere un cancerogeno certo per l'uomo (IARC 2004), con la forma trivalente più tossica di quella pentavalente. Le forme organiche, che possono essere più o meno tossiche a seconda dello stadio di metilazione e ossidazione, includono metil e fenil-derivati utilizzati in agricoltura, arsenobetaine e arsenolipidi, il tipo che viene sequestrato in pesci e molluschi.

Per questi motivi la conoscenza delle specie chimiche di As presenti nell'ambiente e le conseguenti possibilità di esposizione umana sono di interesse rilevante per la valutazione del rischio sanitario.

Le principali vie di esposizione per l'uomo sono rappresentate dall'ingestione di acqua e alimenti contaminati, e in alcune aree anche dalla inalazione o contatto dermico di particolato aero-disperso o presente in acqua e suolo.

Gli effetti avversi dipendono dalla dose, dalla durata, dalla frequenza di esposizione e dal tipo di abitudini alimentari della popolazione. Essi possono variare da effetti gravi di tipo neoplastico a carico di pelle, polmone o vescica, a effetti neurologici, cardiovascolari e respiratori. Inoltre sono state documentate associazioni con l'ipertensione, il diabete mellito e alcuni parametri di alterazione funzionale dell'endotelio, di crescente interesse come fattori di rischio cardiovascolare.

Nel nostro Paese il rischio per la salute di esposizione ad As esiste sia in numerose aree con inquinamento di origine naturale, per presenza in suoli e acque legata anche ad attività dell'industria estrattiva e mineraria, sia in aree più circoscritte dove l'origine antropica è legata ad attività industriale. In queste aree, per la valutazione del rischio sanitario associato all'esposizione cronica di comunità residenti, sono necessari non solo dati di monitoraggio delle concentrazioni di As nelle matrici ambientali, ma anche dati che permettano di valutare l'esposizione effettiva dei soggetti e l'impatto sulla loro salute.

La valutazione dell'esposizione delle comunità residenti e del rischio sanitario associato può consentire di definire e dimensionare programmi di prevenzione primaria, e di rafforzare l'attività di controllo di sanità pubblica attraverso lo sviluppo di un sistema innovativo di sorveglianza ambiente-salute, in grado di dare risposte efficaci ad amministratori e cittadini. Il progetto è inoltre rilevante in termini di formazione del personale coinvolto.

Soluzioni proposte sulla base delle evidenze

A fianco del sistema di sorveglianza sanitaria basato sulla valutazione di flussi informativi sanitari correnti (mortalità, ricoveri ospedalieri, registri di patologia) riferiti a residenti in aree definite ad alto rischio ambientale, si propone un sistema di indicatori individuali per identificare segni precoci di modificazione funzionale o strutturale prima che si manifesti il danno clinico e per valutare la suscettibilità individuale.

Si propone di realizzare una campagna di biomonitoraggio umano in quattro aree significative del paese: Amiata e Viterbese, caratterizzate da inquinamento da As di origine naturale, specie nelle acque ad uso civico; Gela e Taranto, caratterizzate da inquinamento da As di origine industriale.

In ciascuna area verranno prelevati campioni biologici (urine e sangue) in 50 soggetti di età 20-50 anni, selezionati in modo randomizzato stratificato per sesso e età, per un totale di 200.

Per ciascun soggetto si prevede:

- 1) la stima dell'esposizione basata su dati di inquinamento ambientale e da informazioni ricavate da un questionario su: familiarità, storia espositiva e medica, dieta e abitudini;
- 2) la valutazione dell'esposizione basata su biomarcatori individuali di dose assorbita di As, misurati nel sangue e nelle urine;
- 3) la valutazione del livello di marcatori molecolari di instabilità e suscettibilità genetica, alterazione epigenetica, apoptosi, misurati nel sangue;
- 4) la valutazione di marcatori pre-clinici di rischio cardiovascolare, misurati mediante esami clinici non invasivi.

Per ciascuna classe di indicatori sono stati selezionati un numero limitato di marcatori sulla base delle prove di validità e di riproducibilità fornite dalla letteratura scientifica recente, e della trasferibilità operativa (fattibilità in termini di competenze e di costi) a fini di sorveglianza.

Prelievi e analisi saranno effettuati in accordo ai protocolli internazionali.

Fattibilità /criticità delle soluzioni proposte

L'istruttoria effettuata per la preparazione del presente progetto ha accertato la presenza di strutture pubbliche e competenze idonee nelle aree d'interesse, la disponibilità/reperibilità di dati sulle concentrazioni di As nelle matrici ambientali e dei flussi informativi sanitari. Inoltre si ritiene fattibile il rilevamento di informazioni sull'esposizione effettiva dei soggetti e sugli indicatori biologici individuali.

Le analisi dei marcatori di esposizione e danno biologico sono affidate a istituti scientifici di provata competenza ed esperienza.

Le UO 1, 2, 3, 4 sono responsabili dei prelievi e della raccolta delle informazioni rilevanti; i dati ambientali e sanitari saranno forniti da personale esperto di ARPA e Dipartimenti di Prevenzione delle UO.

Le UO 5, 6, 7, 8 curano le analisi sui campioni prelevati, la valutazione degli indicatori clinici e il trasferimento dei risultati per il sistema di sorveglianza. L'Unità di coordinamento cura il protocollo d'indagine, le analisi statistiche, le valutazioni epidemiologiche, la preparazione del rapporto intermedio e di quello finale, inclusivo di suggerimenti per la comunicazione pubblica dei risultati. I dati raccolti vengono valutati lungo tutto il percorso del progetto e nella fase finale di stesura del Rapporto conclusivo dal Comitato Tecnico-Scientifico di progetto.

La **UO1** opera nella regione Lazio. I comuni della provincia di Viterbo sono caratterizzati da lungo tempo da un livello da medio a elevato di concentrazione di arsenico (As) nelle acque ad uso civico, che rappresenta il miglior indicatore ambientale di potenziale esposizione per la popolazione residente. I comuni con concentrazioni medie di periodo più elevate costituiscono un aggregato localizzato nell'area a nord del lago di Bracciano e a est del Lago di Vico. Sulla base dei dati delle concentrazioni rilevate in media nei comuni e tenendo conto anche di importanti segnali emersi dall'analisi di mortalità, in accordo con la Direzione Sanitaria e il Dipartimento di Prevenzione della ASL di Viterbo e col Dipartimento di Epidemiologia del Servizio Sanitario della Regione Lazio sono stati selezionati per lo studio SEpiAs i comuni di Civita Castellana e Ronciglione. Un'analisi preliminare della mortalità per cause nel ventennio 1990-2009 ha mostrato importanti segnali di rischio nei due comuni in oggetto nei confronti dell'insieme dei comuni con concentrazioni di As inferiori a 10 µg/litro. I rischi relativi di mortalità (indice comparativo di mortalità espresso dal rapporto tra il tasso standardizzato diretto del comune e quello dell'insieme dei comuni di riferimento) mostrano eccessi statisticamente significativi di mortalità per tutte le cause in entrambe i generi nei due comuni, più accentuati nel comune di Ronciglione. La mortalità per tutti i tumori maligni risulta in eccesso nei due comuni nei maschi, e nelle femmine nel comune di Ronciglione.

La **UO2** opera sul Monte Amiata, un'area con estesi depositi di cinabro e attività estrattive terminate con la chiusura della miniera di Abbadia San Salvatore nel 1980. Le concentrazioni di As suggeriscono il consumo di acqua potabile come veicolo di esposizione, soprattutto nei comuni di Abbadia SS e Piancastagnaio, dove sono state riscontrate concentrazioni di As sempre inferiori al limite di 50 µg/l in vigore fino al 2003 (DPR 236/88) ma talvolta superiori al limite attuale di 10 µg/l (DLvo n. 27 del 2/2/02, in attuazione del 98/83/CE).

Il biomonitoraggio umano condotto nel 1999 su quattro comuni aveva mostrato concentrazioni moderatamente più elevate a Abbadia SS e Piancastagnaio (media geometrica 5,36 e 7,32 µg/l) rispetto a quanto osservato a Radicofani e Castiglione

D'Orcia (MG 4,1 e 4,9 µg/l). Sarà studiato un campione di residenti ad Abbadia SS e Piancastagnaio (6.819 e 4.194 ab, 2000-2006), reclutato tra i soggetti della coorte studiata nel 1999, in parte sottoposta a controllo nel 2009, permettendo un'osservazione storica del profilo d'esposizione. Come aree con dati di emissione/inquinamento ambientale da As di origine industriale sono stati scelti i comuni di Taranto e di Gela, Siti di Interesse Nazionale per le Bonifiche (SIN).

La **U03** opera a Taranto, dove diverse sorgenti sono responsabili di elevate emissioni in atmosfera di diossine, IPA, NO₂, SO₂, particolato, metalli pesanti. Il registro INES riporta nel 2006 emissioni di As dall'ILVA di Taranto pari a 1.116 kg/a. Sono stati riportati eccessi di mortalità e incidenza per neoplasie del polmone, della pleura, della vescica, linfomi non Hodgkin, in particolare nel sesso maschile, per i quali sono state postulate associazioni con esposizioni ambientali e esiste una diffusa preoccupazione nella popolazione. Il campione sarà reclutato nella popolazione giovane-adulta residente nel comune pari a 194.021 ab all'1/1/2009.

La **U04** opera a Gela dove, nell'ambito della caratterizzazione ambientale del Ministero dell'Ambiente, nel SIN sono state rilevate concentrazioni di As nelle acque di falda fino a 4 ordini di grandezza superiori ai limiti normativi (10 µg/l). Le emissioni di As dichiarate dalla Raffineria di Gela nel 2006 erano di 269 Kg/anno (Registro INES). Concentrazioni anomale di As sono state misurate in polveri stradali e aghi di pino in due campagne svolte dall'Università di Palermo (*Bosco et al. 2005*) e dall'ISS recentemente (in stampa). Il biomonitoraggio umano realizzato nel 2009 su incarico della Regione Siciliana all'OMS, ha avuto come principale risultato il rilevamento di concentrazioni urinarie/ematiche di As alterate nel 20% dei 276 soggetti campionati (*Bianchi et al. in stampa*). Indagini epidemiologiche hanno suggerito eccessi di mortalità e ricoveri per tumori, malattie respiratorie e cardiovascolari, e di malformazioni congenite. Il campione sarà reclutato tra i soggetti residenti a Gela già inclusi nel campione studiato nel 2009, in modo da permettere un'osservazione storica del profilo d'esposizione.

Le UO 5,6,7,8 sono coinvolte nelle attività di analisi di laboratorio e cliniche.

La **U05** ha gli obiettivi di: (a) valutare l'instabilità genetica con test del MN, biomarcatore cromosomico, accorciamento dei telomeri, come marcatori precoci di rischio di malattie cronico-degenerative; (b) identificare alterazioni epigenetiche mediante valutazione dello stato di metilazione globale e di geni target in cellule circolanti; (c) valutare l'influenza di polimorfismi funzionali di geni coinvolti nei meccanismi di detossificazione metabolica e riparazione del DNA (GSTM1, GSTT1, XRCC1, XRCC3, hOGG1) nella modulazione di danno genetico ed epigenetico.

La **U06** ha gli obiettivi di valutare: (a) l'instabilità genetica con test del MN, (b) il danno al DNA tramite la presenza della forma fosforilata dell'istone H2AX; (c) la sintesi di poli(ADP-ribosio) come risposta a condizioni di stress; (d) l'apoptosi mediante vari parametri morfologici e biochimici.

La **U07** ha il compito di misurare le diverse forme di As in urine e sangue periferico, conoscenza fondamentale per differenziare la quota inorganica presente come As³⁺ e As⁵⁺, dalle forme organiche presenti come acido monometilarsonico, acido dimetilarsinico, arsenobetaina e arsenocolina, molto diverse in termini di pericolosità per la salute umana, in termini di cancerogenicità, tossicità, metabolismo, delle caratteristiche individuali.

La **U08** è dedicata ai marcatori di danno pre-clinico aterosclerotico: lunghezza del tratto Q-T del tracciato ECG, indici ultrasonografici di danno pre-clinico come lo spessore medio intimale carotideo, la *compliance* arteriosa, lo score del calcio ed il grasso pericardico.

Bibliografia di riferimento

- Balakumar P, Kaur J. Arsenic exposure and cardiovascular disorders: an overview. *Cardiovasc Toxicol*. 2009; 9(4):169-76.
- Bianchi F, Biggeri A, Cadum E, et al. Environmental epidemiology and polluted areas in Italy. *Epidemiol Prev* 2008; 30(3):146-152.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Scientific Opinion on Arsenic in Food, European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. *EFSA Journal* 2009; 7(10):1351.
- Federici C, Botto N, Manfredi S, Rizza A, Del Fiandra M, Andreassi MG. Relation of increased chromosomal damage to future adverse cardiac events in patients with known coronary artery disease *Am J Cardiol*. 2008; 102:1296-300.
- Graziano G, Bilancia M, Bisceglia L, Assennato G, et al. Statistical analysis of the incidence of some cancers in the province of Taranto 1999-2001. *Epidemiol Prev* 2009; 33(1-2):37-44.
- Musmeci L, Bianchi F, Carere M, Cori L, Ambiente e salute a Gela: stato delle conoscenze e prospettive di studio, *Epidemiologia & Prevenzione*, anno 33(3) 2009, supp.1.
- Mordukhovich I, Wright RO, Amarasiriwardena C, et al. Association between low-level environmental arsenic exposure and QT interval duration in a general population study. *Am J Epidemiol*. 2009;170(6): 739-46.
- Salnikow K. Genetic and Epigenetic Mechanisms in Metal Carcinogenesis and Cocarcinogenesis: Nickel, Arsenic, and Chromium *Chem. Res. Toxicol* 2008; 2: 28-44.
- Scovassi AI, Bottone MG, Biggiogera M, Pellicciari C. Dynamic relocation of nuclear proteins during the execution phase of apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2008, 76:1440-50.
- Sturchio E, Minoia C, Zanellato M, et al. Schede monografiche, Arsenico. *G Ital Med Lav Ergon*. 2009; 31(1): 5-32.

2. OBIETTIVO DELLO STUDIO

Obiettivo generale:

Valutare la relazione tra esposizione umana ad arsenico (As), stimata attraverso dati di inquinamento ambientale e valutata mediante indicatori di dose assorbita, e marcatori biologici di effetto precoce sulla salute, allo scopo di definire indicatori per un sistema avanzato di sorveglianza ambiente-salute.

Obiettivi specifici:

1. Caratterizzazione ambientale e sanitaria nelle zone di interesse, mirata alla definizione di proxy di esposizione (a cura delle UO 1, 2, 3, 4).
2. Misura dell'esposizione individuale nelle quattro aree di interesse attraverso biomonitoraggio umano, di As nel sangue e nelle urine, in campioni casualizzati di popolazione residente (a cura di UO7).
3. Misura di biomarcatori di effetto precoce e di rischio pre-clinico: marcatori cromosomici/molecolari di suscettibilità e danno genetico e epigenetico (a cura di UO5), marcatori molecolari di danno al DNA, stress, apoptosi (a cura di UO6), marcatori di rischio cardiovascolare (a cura di UO8).
4. Valutazione delle associazioni tra misure di esposizione e di effetto biologico, attraverso: analisi statistica dei dati analitici e clinici, analisi di correlazione tra dati su ambiente e salute, dati reperiti dal questionario e dati dei marcatori (a cura della UO di coordinamento).
5. Definizione di indicatori per un sistema avanzato di sorveglianza ambiente-salute.

3. DISEGNO DELLO STUDIO

Studio epidemiologico osservazionale campionario, multicentrico, istituzionale, basato su biomonitoraggio per la misura di marcatori di esposizione, biologici e di rischio preclinico.

Lo studio per ciascun soggetto reclutato prevede:

- intervista tramite questionario standardizzato;
- prelievo di sangue e la raccolta di un campione di urine;
- misura non invasiva di parametri clinici (ECG, ecografia cardiaca basale, ecografia dei vasi del collo).

Lo studio non prevede che i pazienti siano assegnati a specifici trattamenti o a procedure mediche invasive.

3.1 Campionamento

L'obiettivo dello studio è di reclutare un totale di 200 soggetti, 50 in ciascuna delle quattro aree, con randomizzazione stratificata per sesso e età, secondo la seguente tabella.

La tabella riporta anche il numero suggerito di soggetti da campionare, considerando le tipiche condizioni avverse, quali la impossibilità di rintracciare, la difficoltà a trovare i rintracciati, il rifiuto alla partecipazione.

Genere	Donne				Uomini				Donne e Uomini
Età	20-29	30-39	40-44	Totale	20-29	30-39	40-44	Totale	
Da campionare	40	40	20	100	40	40	20	100	200
Da reclutare	10	10	5	25	10	10	5	25	50

Fonte di campionamento è l'elenco degli assistiti in possesso in ciascuna delle 4 ASL coinvolte.

A Gela, Taranto e nell'area Amiata saranno in via prioritaria selezionati soggetti precedentemente reclutati in studi di biomonitoraggio umano nel rispetto della ripartizione per sesso ed età sopra dichiarata. I soggetti mancanti saranno selezionati in modo randomizzato dagli elenchi degli assistiti fino ad arrivare all'obiettivo prefissato.

3.2 Criteri per la definizione delle aree di campionamento

Il campionamento avviene sulla base della residenza nel comune in studio.

3.3 Analisi statistiche

La correlazione tra la misura del livello di esposizione ad As nelle varie forme (totale, inorganico e organico, senza e con correzione per il valore della creatinina) e i vari marcatori di effetto e di rischio saranno valutate mediante analisi statistiche uni-variate e multi-variate, facendo ricorso a tecniche statistiche parametriche e non-parametriche.

Le correlazioni saranno aggiustate per variabili di confondimento o di modificazione ricavate dal questionario individuale.

I dati saranno analizzati per area, sesso e tre classi di età (20-29; 30-39; 40-44), e nel caso non siano verificate eterogeneità, saranno cumulati in modo da innalzare la potenza statistica delle analisi.

Sebbene la dimensione del campione prefissato per ciascuna area (50 soggetti) e anche quella complessiva (200 soggetti) sia limitata, le analisi di correlazione tra variabili continue individuali (livello dei marcatori) può consentire di porre in evidenza associazioni statisticamente significative o comunque di interesse per le valutazioni epidemiologiche.

E' prevista una valutazione di concordanza tra livelli di esposizione stimata sulla base dei dati ambientali (*proxi* di esposizione basato sulla residenza) e di esposizione calcolata sulla base della concentrazione di arsenico inorganico e organico misurata nei liquidi biologici.

3.4 Valutazioni epidemiologiche

Oltre alle valutazioni dei risultati delle analisi di correlazione, saranno effettuate le valutazioni di:

- a) confronti tra valori di arsenico misurati (totale e forme inorganiche e organiche, non corrette e corrette per il valore della creatinina) con valori osservati in altre indagini e pubblicati su rivista scientifica accreditata o su report istituzionali (es. Rapporti ISTISAN o Report NHANES-CDC), allo scopo di posizionare i valori di SEpiAs rispetto al contesto nazionale e internazionale riferito a popolazioni/comunità viventi con diverse caratteristiche di rischio;
- b) confronti dei valori dei marcatori di effetto e di rischio con quanto riportato nella letteratura scientifica;
- c) confronti delle correlazioni tra a) e b) con quanto riportato in letteratura.

3.5 Intervista e questionario

Ad ogni partecipante sarà somministrato un questionario in modo diretto, da parte di un operatore specificamente formato sui temi oggetto della presente proposta.

Verranno raccolte variabili utili per l'accertamento dell'esposizione e per il controllo del confondimento in fase di analisi, quali le esposizioni ambientali, le attività professionali, lo stile di vita, la dieta, la storia della residenza, dati antropometrici, condizioni socio-economiche, percezione del rischio, etc.

Contenuti e uso del questionario

Dati personali

Dati anagrafici utili per la descrizione

Condizioni ambientali

Localizzazione dell'abitazione di residenza rispetto a impianti industriali (incluso discariche e inceneritori), abitazioni precedenti se residente da meno di 10 anni, tipo e stato dell'abitazione, presenza di animali domestici, uso di acqua per bere e altri usi domestici.

Variabili da utilizzare sia per descrizione e caratterizzazione rispetto ad altre sezioni indagate mediante questionario (es. condizioni di salute) sia per standardizzazione dei risultati delle analisi dei biomarcatori (es. lontananza da siti pericolosi e durata di residenza correlati ai dati di carico corporeo).

Attività lavorativa ed esposizione ad agenti chimici e fisici

Tipo di lavoro svolto nel passato e nel presente, tipo di esposizioni lavorative croniche e acute ad agenti tossici (una lista è proposta). Informazioni fondamentali per suddividere in gruppi omogenei la casistica su cui si effettuano le analisi statistiche dei dati relativi ai biomarcatori, e per effettuare aggiustamenti nella fase di produzione di stimatori di rischio.

Abitudini individuali

Fumo attivo e passivo, alcol da utilizzare come classici confondenti o modificatori di effetto rispetto a eventi principali (marcatori) o secondari (condizioni, sintomi, fattori di rischio).

Storia medica

Richiesta di elenco di malattie e condizioni cliniche diagnosticate dal medico, allergie, sintomi respiratori e cardiovascolari, uso di farmaci.

Queste variabili sono finalizzate alla descrizione di caratteristiche non ricavabili dai flussi informativi sanitari correnti e potranno essere utili per valutazioni incrociate con altre variabili del questionario (fattori di rischio occupazionali, ambientali, residenziali, fattori di rischio individuali, tenendo conto dei periodi di potenziale efficacia e tempi di induzione-latenza tipici di ciascuna condizione morbosa).

Dieta

Consumo di cibi (domande su elenco), con specificazione di quantità, frequenza, luogo e modalità di produzione, adesione a diete e perdita di peso.

Le informazioni di questa sezione sono di importanza fondamentale per caratterizzare alcuni fattori di rischio alimentari rilevanti a livello locale, sia in sede di descrittiva che di valutazione di associazioni con i marcatori.

Storia riproduttiva

Per le donne è dato rilievo alla storia degli esiti delle gravidanze precedenti e sono richieste informazioni sull'allattamento.

Per gli uomini, sono richieste informazioni sulla sterilità o infertilità.

Scheda su percezione di pericoli e rischi

A valle della definizione di pericolo e rischio si richiede di attribuire priorità fattori antropici e naturali, alla loro presenza nell'area, ai mezzi d'informazione abitualmente consultato, giudizio sull'ambiente di vita. Queste informazioni hanno la finalità di descrivere la percezione da parte delle comunità e possono servire anche a interpretare i risultati di elaborazioni precedentemente richiamate.

Scheda ambulatoriale

Domande sul prelievo (riuscita del prelievo, eventuale motivazione del rifiuto)

Peso e altezza misurati al momento della somministrazione.

Analisi dei questionari

Le analisi dei questionari saranno effettuate dalla UO di coordinamento presso l'Unità di ricerca in Epidemiologia, dell'Istituto di Fisiologia Clinica del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

3.6 Prelievo

Il prelievo di sangue ai donatori reclutati è effettuato presso un centro prelievo della ASL di riferimento o laboratorio accreditato ubicato nell'area di campionamento.

Ai donatori è fatta richiesta di presentarsi a digiuno per il prelievo di sangue.

Ai donatori è fatta richiesta di raccogliere le prime urine della mattina del prelievo e consegnare presso lo stesso laboratorio del prelievo ematico.

Presso la stessa sede del prelievo viene proposto il questionario.

Ai donatori viene consegnato un buono per una colazione, a carico del progetto.

L'organizzazione dei prelievi e delle interviste e di tutta la logistica è a carico del responsabile della UO territoriale.

3.7 Analisi di laboratorio

Agli individui reclutati, tra i rispondenti ai criteri di inclusione, verrà prelevata una quantità complessiva di sangue pari a 18 ml e di urine pari a 20 ml, per consentire le diverse analisi incluse nel protocollo, secondo lo schema dettagliato che segue.

Sintesi su prelievi di sangue e urina

50 soggetti per area: 25 uomini e 25 donne,
10 in classe di età 20-29, 10 in classe 30-39, 5 in classe 40-44.

Codice prelievo (da riportare sulle provette e sul questionario individuale)

Codice UO	sessu	Età (2011-anno nascita)	Numero progressivo
1, 2, 3, 4	F, M	1, 2, 3	1-50 ...
UO 1 Viterbo = 1 UO 2 Amiata = 2 UO 3 Taranto = 3 UO 4 Gela = 4		20-29 = 1 30-39 = 2 40-44 = 3	Codice del paziente quando viene individuato/contattato

Esempi:

- 1) uomo residente nel viterbese di età 42 anni → 1M3 + da 1 a n secondo l'ordine di reclutamento
2) donna residente nel comune di Taranto di età 31 anni → 3F2 + da 1 a n secondo l'ordine di reclutamento

UO di Laboratorio, responsabile, indirizzo e contatti:

- **UO 5** Dr.ssa Maria Grazia Andreassi, IFC-CNR, Via Moruzzi, 1 – 56124 Pisa;
tel. 050 3152628; e-mail: andreas@ifc.cnr.it.
- **UO 6** Dr.ssa A. Ivana Scovassi, IGM-CNR, Via Abbiategrasso 207 27100 Pavia;
tel. 0382-546334/8; e-mail: scovassi@igm.cnr.it.
- **UO 7** Dr. Claudio Minoia, FSM, Via Salvatore Maugeri, 4 - 27100 Pavia;
tel. 0382-592301/8; e-mail: claudio.minoia@fsm.it.

17

Trasporti

I trasporti verranno effettuati da DHL, contattato da IFC-CNR Pisa (responsabile Dr.ssa Liliana Cori, cell. lavoro: 346-7543190).

3.7.1 Sinossi degli esami di laboratorio

UO di lab	Esame	Quantità prelievo	Tipo provetta e colore tappo	Trattamento	Conservazione	Spedizione	Note
UO 5 IFC-CNR Pisa	Marcatori di effetto genetico e epigenetico	3 ml sangue	➡ 1 provetta tappo viola (con EDTA)	nessuno	➡ sangue da -20°C a -80°C	con cadenza periodica via corriere	➡ confezione con siberini; Alto-Basso indicato su contenitore
UO 6 IGM-CNR Pavia	3 marcatori	5 ml sangue	➡ 1 provetta tappo viola (con EDTA)	⬇ separazione linfociti e fissazione su 30 vetrini per campione individuale (a cura dei lab locali di riferimento, pag. 21)	➡ vetrini a temperatura ambiente	con cadenza periodica via corriere	Vedi nota bene a pag. 21
UO 7 FSM Pavia	As e Hg	7 ml sangue (gli ultimi prelevati)	➡ 1 provetta tappo rosso (senza separatore integrato)	⬇ 2-3 ml di siero da 4 ml di sangue (ottenuto lasciando coagulare per un'ora il campione di sangue in provetta sottovuoto)	➡ siero a -20°C	con cadenza periodica via corriere	➡ confezione con siberini; Alto-Basso indicato su contenitore
			➡ 1 provetta tappo blu (con eparina di sodio, senza additivo)	⬇ 3 ml di sangue intero	➡ sangue a 5°C		➡ altra confezione con un solo siberino non a contatto con le provette; Alto-Basso indicato su contenitore
Tot sangue per i lab		15 ml sangue					
Lab locale	Esami base (protocollo)	3 ml sangue					
Totale prelievo	Tutti gli esami	18 ml sangue (15ml + 3ml)					
UO 7 FSM Pavia	As	20 ml urina	2 provette da 10 ml ciascuna	nessuno	➡ urina a -20°C	con cadenza periodica via corriere	➡ confezione con siberini; Alto-Basso indicato su contenitore

Le UO5 e UO6 stabiliscano congiuntamente un percorso di inter-calibrazione delle tecniche analitiche.

Nota bene

Protocollo per isolamento dei linfociti e allestimento vetrini

Prove preliminari

Per accelerare il lavoro di messa a punto delle metodiche necessarie alle analisi previste, si propone la seguente strategia:

ogni centro di raccolta esegue un prelievo da donatore sano, separa i linfociti secondo il protocollo stabilito, e allestisce solo 10 vetrini, da spedire all'UO 6, previa comunicazione via e-mail.

Per uniformare la metodica utilizzata, è importante processare contemporaneamente i preparati delle 4 unità, quindi l'analisi sarà condotta solo dopo avere ricevuto i campioni da tutti i centri di raccolta. Pertanto si invitano gentilmente i colleghi a procedere rapidamente al prelievo.

1. Isolamento dei linfociti

Il sangue (~5 ml) viene posto in provette contenenti anticoagulante (EDTA o altro), e lentamente stratificato su 5 ml di Ficoll con densità 1077 (il tutto avviene in provette da centrifuga). Dopo centrifugazione a 2.000 rpm per 20 minuti a temperatura ambiente, si ottiene la separazione del sangue in tutti i suoi componenti: sul fondo della provetta si depositano gli eritrociti, poi il Ficoll, l'anello linfomonocitario, ed infine la porzione superiore di plasma. La frazione cellulare utilizzata nello studio è l'anello linfomonocitario, che viene prelevato delicatamente con una pipetta pasteur, depositato in una provetta da centrifuga da 15 ml, e diluito con PBS (Phosphate Buffered Saline) fino a raggiungere il volume finale di 14 ml. La sospensione cellulare si centrifuga a 1.100 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente, ed il surnatante viene eliminato; il pellet viene risospeso delicatamente con 2,5 ml di PBS. Si esegue conteggio mediante camera di Bürker (o strumento automatico). La concentrazione attesa è circa 3×10^6 /ml di sospensione in PBS.

2. Allestimento dei vetrini

Per gli esperimenti di immunofluorescenza indiretta vengono utilizzati vetrini portaoggetto (76x26 mm, almeno puliti con etanolo, se non sterili, con estremità smerigliata x scrivere le informazioni relative al campione) sulla cui superficie vengono distribuiti circa 20 µl di sospensione di linfociti, nella zona all'estremità opposta alla smerigliatura e su una superficie di circa 20x20 mm. I vetrini si fanno asciugare a temperatura ambiente fino al giorno successivo e si conservano a temperatura ambiente fino al momento dell'uso o della spedizione. Per ogni campione si allestiscono circa 30 vetrini. Per il trasporto, i vetrini vengono inseriti in apposite scatole portavetrini e spedite in busta millebolle in pacco contrassegnato come "fragile".

Esami dei micronuclei

Su un sottocampione di soggetti di ciascuna delle quattro aree di studio, in fase successiva e sulla base di indicazioni emerse dalle analisi sopra riportate, sarà effettuato un ulteriore prelievo di sangue, come di seguito schematizzato:

UO di lab	Esame	Quantità prelievo	Tipo provetta e colore tappo	Trattamento	Conservazione	Spedizione	Note
UO 5 IFC-CNR Pisa	Micro-nuclei	3 ml di sangue	1 provetta con tappo verde (con eparina)	nessuno	temperatura ambiente	entro 24-48 ore via corriere	prelievo successivo per soggetti da richiamare

3.7.2 Esami del sangue e breve descrizione

Emocromo con formula: è l'esame del sangue più comune, comprendente il conteggio del numero dei globuli rossi o eritrociti, dei globuli bianchi o leucociti e delle piastrine o trombociti.

Proteina C-reattiva (PCR): è una proteina rilevabile nel sangue prodotta dal fegato, indicatore di uno stato infiammatorio.

Velocità di eritrosedimentazione (VES): valuta la velocità di sedimentazione dei componenti corpuscolari del sangue (eritrociti, leucociti, trombociti), cioè il tempo che impiegano per separarsi dal plasma (la parte liquida del sangue) e come la PCR è un indicatore di infiammazione.

Fibrinogeno: è un importante indicatore della coagulazione del sangue; è trasformato dalla trombina tramite un processo di polimerizzazione in fibrina, necessaria alla formazione del trombo emostatico.

Glicemia: è il valore della concentrazione di glucosio nel sangue.

Creatininemia: la creatinina è un prodotto della reazione di degradazione della creatina che avviene nei muscoli a velocità quasi costante. È principalmente filtrata dai reni ed il suo livello nel plasma è un indicatore dell'attività renale.

Colesterolo (Totale, LDL, HDL): è una molecola lipidica o steroide, sintetizzata autonomamente nel corpo umano e solo in piccola parte assunta con l'alimentazione. La maggior parte del metabolismo del colesterolo avviene nel fegato. Fondamentale è la suddivisione tra frazione di colesterolo a bassa densità (LDL) e ad alta densità (HDL). La misura ed il rapporto tra i due parametri consente una buona predittività dei rischi di malattie cardiovascolari, che crescono al crescere della quota di LDL (c.d. colesterolo cattivo), o diminuiscono se è più elevata la componente HDL (c.d. colesterolo buono).

3.7.3 Elenco dei biomarcatori e descrizione

Test del Micronuclei: è un test di genotossicità, che consente di osservare errori nella divisione cellulare causati da sostanze dannose. Consiste nel prelevare cellule da una piccola quantità di sangue venoso durante la divisione cellulare (mitosi) e osservarne un discreto numero (almeno un centinaio) al microscopio. In caso di errori (provocati dal mutageno), sono visibili, oltre al nucleo, frammenti di DNA sparsi per il citoplasma e che dunque non sono stati incorporati nel nucleo principale durante le ultime fasi della divisione cellulare (chiamati *micronuclei*).

I micronuclei appaiono come dei piccoli nuclei accessori, identici a quelli normali ma di dimensioni notevolmente ridotte.

I micronuclei possono essere evidenziati, e contati, in linfociti del sangue periferico coltivati in vitro per un breve periodo.

Biomarcatori Molecolari: valutano la presenza di specifici polimorfismi funzionali dei geni coinvolti nei meccanismi di detossificazione metabolica e di riparazione del DNA al fine di definire le diverse capacità metaboliche e riparative connesse alla costituzione genetica (presenza di polimorfismi genetici) che possono creare le basi per differenze interindividuali nell'induzione degli effetti biologici e clinici derivanti da fattori di esposizione ambientale. L'analisi richiede soltanto il prelievo di una piccola quantità di sangue venoso e una tecnologia nota come PCR (*reazione a catena della polimerasi*).

Polimorfismi di geni coinvolti nel metabolismo dell'arsenico e nei meccanismi di riparo del danno al DNA

Gene	SN P	Cambiamento aminoacidico	Funzionalità	Referenze
AS3MT	T>C	Met287Thr	La presenza dell'allele C (sia in omozigosi che in eterozigosi) porta ad un aumento dell'attività enzimatica e aumento dei livelli del metabolita MMA3 (composto più tossico) nelle urine	Lindberg et al 2007, Wood et al 2006
GSTT1/ GSTM1	+/-	Delezione gene	Ridotta capacità enzimatica in presenza di genotipo nullo	Wang et al 2007
XRCC1	G>A	Arg399Gln	Ridotta capacità enzimatica in presenza di genotipo mutato	Fujihara 2011
hOGG1	C>G	Ser326Cys	Individui (esposti all'As) omozigoti mutati mostrano una maggiore concentrazione urinaria di 8OHdG	Fujihara 2011

Legenda: MMA: acido monometilarsonico; 8OHdG:8-idrossi-2deossiguanina

Marcatori epigenetici: valutano le alterazioni della metilazione del DNA che possono influenzare la trascrizione di geni critici, contribuendo allo sviluppo di patologie. L'analisi richiede soltanto il prelievo di una piccola quantità di sangue venoso e una tecnologia nota come sequenziamento diretto del DNA per l'identificazione dei componenti chimici.

Studio metilazione gene-specifica [Promotore di p53 (Chanda et al. 2006), Promotore di p16 (Chanda et al. 2006), Promotore di p21 (ipotesi SEpiAs)]

Marcatori di danno al DNA: numerosi agenti chimici e fisici causano danni al DNA; tra questi, le rotture indotte nella molecola che porta l'informazione genetica sono particolarmente pericolose per il corretto funzionamento delle cellule, ed è quindi importante determinare la potenzialità di causarli da parte di inquinanti ambientali. Poiché la modificazione di una proteina legata al DNA, l'istone H2AX, è una delle risposte più precoci che la cellula mette in atto per contrastare le rotture

al DNA, determinare i livelli di questa proteina modificata è un mezzo per stimare la presenza di rotture nel DNA. L'analisi della proteina H2AX modificata può essere effettuata analizzando al microscopio linfociti del sangue periferico opportunamente trattati.

Marcatori di apoptosi: è una forma di morte cellulare condotta in modo ordinato e regolato, e generalmente porta ad un vantaggio durante il ciclo vitale dell'organismo (ad esempio, durante lo sviluppo l'embrione umano presenta gli abbozzi di mani e piedi “palmati”: affinché le dita si separino, è necessario che le cellule che costituiscono le membrane interdigitali muoiano in modo programmato). Al contrario della necrosi che è una forma di morte cellulare incontrollata, l'apoptosi è definita morte altruista o morte pulita. Un'eccessiva attività apoptotica può causare disordini da perdita di cellule, un'apoptosi carente può implicare una crescita cellulare incontrollata. Le cellule apoptotiche hanno un aspetto tipico e caratteristiche particolari che le rendono riconoscibili al microscopio.

Marcatori di stress cellulare: in condizioni di stress cellulare, come esposizione a sostanze mutagene, danno al DNA, cambiamenti dell'ambiente intracellulare, una delle prime risposte della cellula è l'attivazione della proteina PARP, che è un sensore di situazioni di potenziale pericolo per la cellula. La proteina reagisce al pericolo con la sintesi di un polimero, che promuove i meccanismi di difesa della cellula; il polimero può essere visualizzato all'interno della cellula.

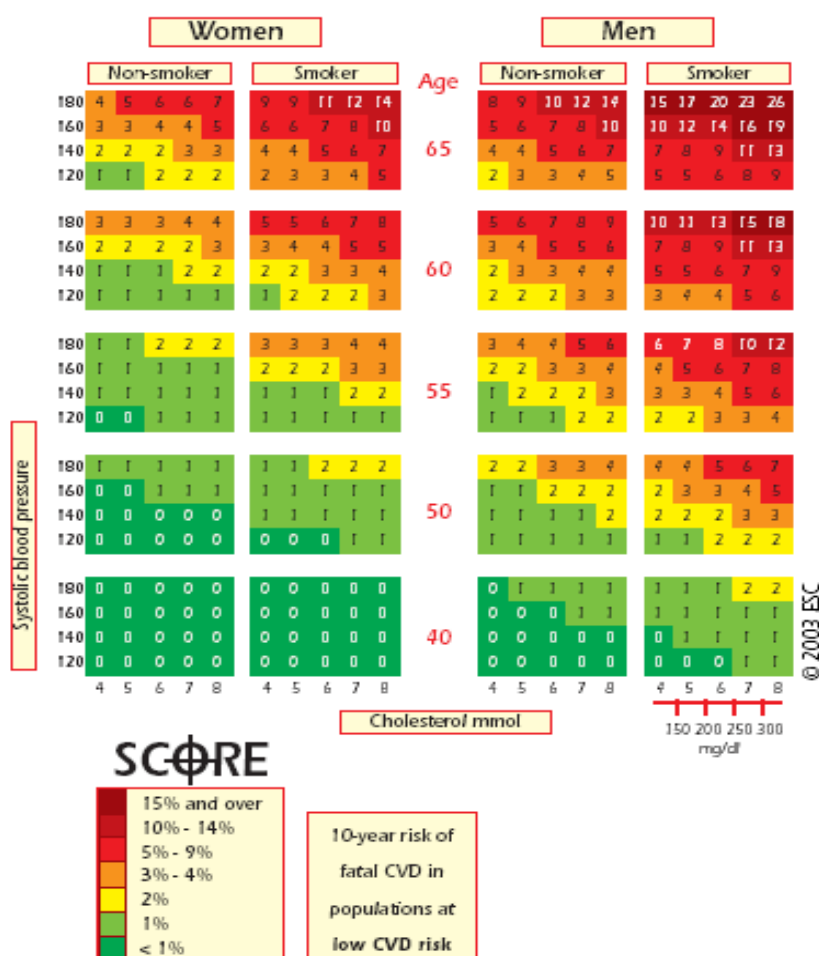
Marcatori di esposizione: per l'arsenico nelle urine è prevista la speciazione, nelle forme inorganiche trivalente (As^{+3}) e pentavalente (As^{+5}) e in quelle organiche, come acido monometilarsonico (MMA), acido dimetilarsinico (DMA), arsenobetaina e arsenocolina. Nel sangue è prevista la misura della concentrazione dell'arsenico totale, non corretto e corretto per la concentrazione di creatinina dosata nello stesso individuo.

3.8 Esami cardiologici

I donatori vengono visitati da un medico cardiologo che ha seguito un corso di aggiornamento per la standardizzazione dei metodi presso IFC CNR a Pisa. I donatori vengono sottoposti a test diagnostici non invasivi: l'ecografia dei vasi cerebro-afferenti prevede la visualizzazione dei vasi del collo con una sonda che viene poggiata sul collo. L'ecocardiogramma basale è un esame usato nella routine clinica ed in grado di definire la morfologia del cuore e delle sue strutture principali (grandi vasi e valvole) e la funzione. Alcuni parametri accessori, ma che non comportano alcuna alterazione dell'esame, sono la misurazione delle calcificazioni degli apparati valvolari e lo spessore del grasso pericardico. Tutti questi esami vengono eseguiti nella stessa seduta.

EuroScore

Euroscore nei paesi a basso rischio (Italia, Lussemburgo, Spagna, Portogallo, Svizzera, Francia, Grecia, Belgio).



10 years risk of fatal CVD in **low risk** regions of Europe by gender, age, systolic blood pressure, total cholesterol and smoking status.

Spessore medio-intimale

L'ecografia delle arterie carotidi sarà eseguita con una sonda lineare alla frequenza di 7 MHz. Si misura l'ispessimento medio-intimale (CIMT) in proiezione longitudinale ad 1,0 cm sotto il bulbo della carotide comune per tre volte calcolando il valore medio. Il limite superiore normale utilizzato per definire i valori di normalità dell'IMT è stabilito al 75° percentile della distribuzione dell'ispessimento medio-intimale. L'ispessimento medio-intimale è sempre eseguito con uno studio completo delle carotidi extracraniche per la presenza di placche carotidee, per aumentare la sensibilità per l'identificazione subclinica della malattia vascolare. La placca carotidea è definita come la presenza di un ispessimento focale di parete che sia di almeno 50% superiore a quello dell'area circostante o da una regione focale con CIMT maggiore di 1,5 mm che sporge nel

lume. La morfologia della placca e il grado di stenosi saranno valutati, secondo le ultime linee guida per la diagnosi vascolare non invasiva.

Calcium Score

Gli studi ecocardiografici bi-dimensionali saranno eseguiti in tutti i pazienti con sistemi commercialmente disponibili (Biosound Esaote MyLab 30; Hewlett-Packard SONOS 7500; Philips iE33) e focalizzando lo studio sulla valvola aortica, la radice aortica e l'anulus mitralico nelle proiezioni classiche. In tutti i casi, le condizioni della macchina prima e dopo le analisi in ogni paziente vengono registrate per l'ottimizzazione della visualizzazione delle strutture cardiache e mantenute costanti durante tutto lo studio. La sclerosi aortica (ARS) è definita come un'aumentata ecogenicità e/o ispessimento delle pareti (>2,2mm). Un'aumentata ecogenicità ed ispessimento delle cuspidi o la presenza di calcificazioni definiscono la sclerosi della valvola aortica (AVS). I criteri per la calcificazione dell'anulus mitralico (MAC) prevedono una struttura che produce echi in maniera intensa localizzata alla giunzione atrioventricolare e sul lembo posteriore della valvola mitrale. MAC si quantifica da lieve a grave, tenendo in considerazione il suo ispessimento e lunghezza. E' stato proposto un algoritmo per quantificare la progressione della calcificazione a livello della radice aortica, della valvola aortica e dell'anulus mitralico. La somma dei punti ottenuti definisce lo score dell'indice di calcificazione (CSI), che va da 0 (normale) a 10 (calcificazione diffusa della radice e valvola aortica e dell'anulus mitralico).

ARS – (0-1)				
Score:	0 – normal echogenicity, wall thickness < 2.2mm 1 – enhanced echogenicity, wall thickness ≥2.2mm			
AVS – (0-6)				
Score:	0 – normal echogenicity 1 – enhanced echogenicity 2 – calcification			
	0	1	2	CSI = ARS+AVS+MAC (0-10)
RC	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
LC	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
NC	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
MAC – (0-3)				
Score:	0 – normal echogenicity 1 – mild calcification (thickness < 2.2mm, length < 5mm) 2 – moderate calcification (thickness >2mm, length > 5mm) 3 – severe calcification (“shadowing”)			

The quantification of CSI (calcification score index) – RC = right coronary cuspid, LC = left coronary cuspid, NC = non-coronary cuspid, ARS – aortic root sclerosis, AVS – aortic valve sclerosis, MAC – mitral annulus calcification.

Lettura centralizzata dei biomarcatori di imaging

Tutte le immagini verranno acquisite dai centri coinvolti nel progetto in periferia e archiviate su supporto digitale ed inviate a IFC-CNR per la lettura centralizzata. Ogni centro invierà i propri dati quantitativi che saranno rivalutati da un operatore “in cieco” e con sistemi quantitativi “operatore-indipendenti” sviluppati in IFC-CNR, allo scopo di ridurre la variabilità inter ed intra osservatore.

3.9 Consenso informato, aspetti etici e diffusione dei risultati dello studio

Alle persone che partecipano come donatori al Progetto SEpiAS viene consegnato un modulo di consenso informato per spiegare le finalità dello studio (modulo allegato).

La diffusione dei risultati della ricerca avviene in modo anonimo, cioè senza alcun riferimento all'individuo o a informazioni attraverso le quali si possa identificarlo. Ai sensi degli Art. 7 e 13 del dlgs. 196 del 30 giugno 2003 sulla tutela dei dati personali, i dati vengono raccolti ed archiviati in modo adeguato, sono utilizzati esclusivamente per scopi di ricerca scientifica e solo da personale autorizzato.

Al donatore di sangue e urina che ne fa richiesta sono comunicati i risultati delle sue analisi, direttamente o al suo medico di famiglia.

Per quanto riguarda gli accertamenti cardiovascolari, i risultati vengono comunicati per scritto o in via diretta dal medico specialista.

I campioni di sangue e urina vengono identificati solo da un numero di codice e non riportano il nome del donatore.

La conservazione dei campioni biologici è a cura dei diversi laboratori di analisi (UO 5, 6 e 7), che sono responsabili per la loro eliminazione al termine dell'indagine.

I questionari dei donatori e i moduli di consenso informato, raccolti da ciascuna UO territoriale, vengono digitalizzati e conservati dall'Istituto di Fisiologia Clinica, Unità di Ricerca in Epidemiologia Ambientale, che conserva la chiave per linkare i questionari ai valori analitici individuali prodotti dalle UO di laboratorio.

I risultati dello studio possono essere oggetto di pubblicazioni scientifiche e comunicazioni pubbliche, con modalità adeguate a garantire l'anonimato dei dati individuali e dopo la comunicazione dei risultati individuali ai donatori.

Tutte le fasi previste (protocollo di studio) vengono approvate dal Comitato Etico della ASL che garantisce la tutela dei diritti, della sicurezza e del benessere dei soggetti. Inoltre è responsabile di revisionare e approvare i metodi e il materiale da impiegare per ottenere e documentare il consenso informato dei partecipanti allo studio.

Il protocollo di studio è redatto in accordo alle Norme di Buona Pratica Clinica dell'Unione Europea e alla Dichiarazione di Helsinki, costituita da principi etici che forniscono una guida per i medici e per gli altri partecipanti alla ricerca medica che coinvolge soggetti umani.

Per la migliore informazione sul lavoro in corso vengono preparate Schede informative per il donatore, da utilizzare nelle quattro aree di interesse, che contengono i riferimenti specifici dei responsabili delle attività di prelievo e spedizione dei campioni in ciascuna area.

4. TEMPI DI REALIZZAZIONE DEL LAVORO

CRONOGRAMMA SEpiAs

Attività / Mese	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Coordinamento																									
Raccolta dati ambiente e salute																									
Campionamento																									
Prelievi																									
Analisi laboratorio																									
Analisi statistiche																									
Valutazioni epidemiologiche																									
Report e comunicazione																									

5. VALUTAZIONE

Tra le **criticità** degne di specifica attenzione si citano: il reperimento di set di dati ambientali e sanitari completi e validati per ciascun sito; la selezione e disponibilità dei soggetti campionati per il prelievo e l'intervista; la raccolta e consegna dei campioni a diversi laboratori; il test degli indicatori 'meno provati' prodotti per la loro applicazione; il lavoro congiunto tra operatori della sanità pubblica e delle agenzie ambientali.

Tutti questi elementi sono oggetto di specifica attenzione, discussi e affrontati dal Comitato Tecnico-Scientifico di progetto per minimizzarne l'impatto.

La valutazione del Progetto è seguita dettagliata per ciascuno degli obiettivi sopra esposti.

OBIETTIVO GENERALE	Valutazione della relazione tra esposizione umana ad arsenico, stimata sia attraverso dati ambientali sia mediante indicatori di dose assorbita, e marcatori biologici di effetto precoce sulla salute, allo scopo di definire indicatori per un sistema avanzato di sorveglianza ambiente-salute.
Indicatore/i di risultato	Trasferimento dei risultati in indicatori per il sistema di sorveglianza ambiente-salute nelle aree a rischio. Redazione di un protocollo per la definizione degli indicatori di inquinamento ambientale, di biomarcatori di esposizione e di indicatori di danno precoce alla salute. Applicazione del protocollo nelle aree pilota. Redazione di un report delle attività realizzate.
Standard di risultato	Uso indicatori validati da UE (DPSIR) e test di ulteriori mirati ai territori prescelti. Realizzazione delle fasi previste (100%). Campionatura completa dei soggetti (100%). Disponibilità del report delle attività entro la conclusione del progetto e accessibile via web.
OBIETTIVO 1	Coordinamento scientifico e organizzativo del progetto (UO di coordinamento).
Indicatore/i di risultato	Realizzazione di riunioni; attività di rete e accompagnamento via internet; redazione di report, redazione rendicontazioni tecniche e finanziarie.
Standard di risultato	Realizzazione di 3 riunioni nelle fasi iniziali, intermedia e finale del progetto. Redazione di 4 rendicontazioni tecniche e finanziarie. Realizzazione di 1 report con sommario esecutivo. Rispetto dei tempi e degli standard qualitativi previsti nel progetto. Redazione di 1 report dedicato all'illustrazione degli indicatori a scopi operativi per i servizi di sanità pubblica.
OBIETTIVO 2	Raccolta dei dati ambientali e sanitari nelle zone d'interesse, utili alla caratterizzazione ambiente-salute e alla definizione dei proxy di esposizione (U01,2,3,4).
Indicatore/i di risultato	Accesso e consultazione di documentazione e flussi informativi per il reperimento dei dati rilevanti.
Standard di risultato	Reperimento dei dati di interesse disponibili nelle 4 aree (100%). Stima dell'esposizione delle aree di residenza per almeno il 90% dei soggetti reclutati nelle 4 aree.
OBIETTIVO 3	Campionamento (UOC e U01,2,3,4).
Indicatore/i di risultato	Recupero dati da anagrafi comunali o da elenchi degli assistiti. Reclutamento donatori nei tempi previsti. Realizzazione delle interviste. Prelievo dei campioni biologici. Numero di invii di campioni biologici ai laboratori dalle 4 aree. Numero di campioni biologici deteriorati e quindi da ripetere.
Standard di risultato	Assenso al prelievo e all'intervista da parte dei soggetti campionati/numero campionati (60%). Completamento interviste e prelievo/numero assensi (90%). Perdita di campioni biologici inferiore al 5%.

OBIETTIVO 4	Analisi di laboratorio e cliniche (U05,6,7,8).
Indicatore/i di risultato	Realizzazione delle misurazioni di biomarcatori di esposizione secondo gli standard di laboratorio certificati. Congruità dei risultati con i valori di riferimento.
Standard di risultato	Misurazioni di biomarcatori di esposizione, di suscettibilità di danno cromosomico, di danno epigenetico, di rischio clinico in almeno 180 campioni e almeno 40 in ciascun centro. misurazioni di marcatori di danno al DNA, stress e apoptosi in almeno 160 campioni e almeno 30 in ciascun centro.
OBIETTIVO 5	Valutazione e integrazione dei risultati, definizione di indicatori (UOC in collaborazione con tutte le UO).
Indicatore/i di risultato	Analisi statistica dei dati per valutazioni uni-variate, multivariate, di correlazione tra indicatori. Definizione degli indicatori sulla base dei dati reperiti integrati con quelli della letteratura internazionale.
Standard di risultato	Redazione di 1 report dedicato all'illustrazione degli indicatori che includa la metodologia e le indicazioni operative.

6. GESTIONE DEI DATI E CRITERI DI PUBBLICAZIONE

La gestione dei dati avviene nel rispetto dell'anonimato, poiché i risultati delle analisi di laboratorio e i questionari compilati sono trasferiti all'UO di coordinamento responsabile delle analisi statistiche, con codice d'identificazione individuale assegnato a ciascun donatore al momento dell'accettazione dell'entrata nello studio. La chiave di abbinamento del codice al nome del donatore resta in possesso del solo responsabile della UO territoriale, che potrà comunicare ai donatori i rispettivi risultati.

I risultati dello studio, elaborati e scritti in forma anonima, sono di proprietà del Ministero della Salute, che potrà usarli per propri scopi e finalità.

Il responsabile scientifico dello studio potrà chiedere al Ministero della Salute l'autorizzazione per l'utilizzo a scopi di divulgazione scientifica (comunicazioni a congressi, articoli su riviste scientifiche), per propria iniziativa o dietro richiesta di uno o più membri del comitato tecnico-scientifico del progetto. Tutti i lavori scientifici dovranno riportare la dizione: *"Progetto realizzato con il supporto finanziario del Ministero della Salute – CCM"*.

7. FINANZIAMENTO

Lo studio è stato approvato dal Ministero della Salute-Centro Nazionale per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie (Bandi 2010), che ha assegnato un finanziamento di 400.000 euro.

8. STRUMENTI ALLEGATI

- All 1 - Scheda informativa per il paziente per la donazione del sangue e urina;
- All 2 - Scheda informativa per il paziente per l'esame cardiologico;
- All 3 - Lettera al medico curante;
- All 4 - Modulo di consenso informato per la donazione del sangue e urina;
- All 5 - Modulo di consenso informato per l'esame cardiologico;
- All 6 - Questionario per i donatori;
- All 7 - Dichiarazioni di assenza di conflitto di interessi, a cura del Principal Investigator;
- All 8 - Dichiarazioni di assenza di conflitto di interessi, a cura delle UO di ASL.

9. DOCUMENTI ALLEGATI

- All 9 - Documento di approvazione del progetto da parte del Ministero della Salute (includente accordo di collaborazione tra IFC-CNR e Ministero della Salute).