

Obiettivo specifico 4

Predisposizione e messa a punto di protocolli, questionari e materiale informativo per la popolazione inerente gli studi di biomonitoraggio umano. Definizione delle migliori strategie di comunicazione dei dati di biomonitoraggio umano, e del loro significato, a gruppi di popolazione residenti in aree ad elevato impatto ambientale da inquinanti persistenti tossici. Le esperienze condotte nel corso del Progetto saranno valutate e confrontate con quelle condotte in altre aree italiane. *A cura di:*

Marinella Natali², Adele Ballarini², Loredana Musmeci¹, Antonella Pilozi¹

¹ *Istituto Superiore di Sanità*

² *Regione Emilia Romagna*

Premessa

La variabilità nella percezione del rischio è legata a diversi fattori. In aggiunta agli elementi scientifici di definizione del rischio, esistono anche altri fattori di natura sociale e individuale, altri ancora legati al tipo di rischio (quali ad esempio l'esposizione volontaria, la distribuzione dei costi e benefici, rischi legati ad attività umane oppure ad eventi naturali, rischi riguardanti bambini o donne gravide e così via...).

Un efficace percorso di comunicazione del rischio all'interno di uno studio di biomonitoraggio umano, deve necessariamente tenere conto di come il rischio è percepito nella popolazione in modo da consentire di modulare contenuti e modalità di comunicazione nel modo più appropriato in relazione al proprio target di riferimento. È evidente che comunicare il rischio in modo efficace presuppone l'adozione di un paradigma comunicativo che si basi sull'ascolto e sulla comunicazione bidirezionale: è necessario comprendere il contesto dell'interlocutore, come il rischio viene percepito e quali sono le esigenze informative del target, per strutturare una comunicazione efficace. Esigenze informative che fanno riferimento principalmente alla conoscenza di alcuni elementi-chiave⁹:

- grado di esposizione personale al rischio
- conseguenze dell'esposizione
- controllabilità del rischio
- altre esperienze per lo stesso tipo di rischio

La reciproca comprensione è anche alla base della costruzione di un rapporto fiduciario tra cittadini, scienziati e istituzioni che è indispensabile per fare fronte alla complessità che caratterizza i contesti di rischio.

Anche se la comunicazione all'interno degli studi di biomonitoraggio umano è un ambito ancora non sufficientemente considerato, recenti esperienze si basano sul paradigma della comunicazione del rischio, andando oltre alla comunicazione

⁹ WHO Regional Office Europe; Salute e ambiente: la comunicazione del rischio, 2013

tradizionale mettendo a punto un paradigma che ha alla base i tre elementi chiave della comunicazione del rischio: trasparenza, coinvolgimento, monitoraggio.

La trasparenza si basa sulla comunicazione puntuale, tempestiva dei dati e delle informazioni: è uno dei principi fondamentali sui quali si deve basare la comunicazione dei biomonitoraggi umani (vedi Keune, Moreens e Loots¹⁰), ed è riferita non solo ai risultati e alle interpretazioni dei risultati, ma anche alle scelte fatte durante il percorso a partire da come lo studio è stato disegnato, quali opzioni erano possibili ecc..

La partecipazione è un passaggio ulteriore perché implica, come pre-condizione, la “traduzione” delle informazioni tecniche per renderle comprensibili anche dai non esperti e il coinvolgimento degli stakeholders nel processo: questo nei biomonitoraggi viene tipicamente affrontato con approcci multidisciplinari di ricerca-azione sul territorio, interviste e focus group, tecniche di ascolto e così via, che si affiancano ai tradizionali strumenti di comunicazione uno a molti.

Il contesto dello studio

Nell'area di Taranto gli studi di monitoraggio ambientale mostrano una situazione di inquinamento ambientale diffuso, attribuito principalmente alle emissioni dello stabilimento siderurgico. Nel 2012 il Ministero della Salute, nell'ambito della revisione dell'Autorizzazione Integrata Ambientale (AIA), ha richiesto la realizzazione di un Piano di Monitoraggio Sanitario per verificare l'efficacia dal punto di vista sanitario delle prescrizioni impartite con l'AIA stessa. Nell'ambito di questo Piano è stato concordato che l'ISS avrebbe condotto studi di biomonitoraggio sulla popolazione potenzialmente esposta ad inquinanti (studi sulla salute riproduttiva femminile e funzioni cognitive in popolazioni pediatriche), in collaborazione con ASL Taranto, ARPA Puglia ed ARES Regione Puglia, oltre a studi in vitro sul particolato atmosferico. Lo studio è stato finanziato nell'ambito del programma CCM 2013.

Lo studio di biomonitoraggio umano si è articolato due in due rami di attività. La prima è stata la valutazione dell'impatto sulla salute riproduttiva femminile, la seconda si è concentrata sul carico corporeo di metalli pesanti di un gruppo di bambini per valutare gli eventuali effetti neurocomportamentali. Un adeguato questionario ha permesso di identificare possibili fattori confondenti.

Obiettivi della comunicazione connessa alle attività di biomonitoraggio umano

Obiettivo generale della comunicazione è stato quello di accompagnare tutto lo studio, aggiornare in modo trasparente e puntuale la cittadinanza, facilitare lo svolgimento del biomonitoraggio supportando l'elaborazione sia della modulistica, che dei materiali divulgativi funzionali allo svolgimento del progetto stesso.

Nello **specifico** gli obiettivi della comunicazione sono stati declinati come segue, in considerazione delle diverse tipologie di target e del diverso tipo di coinvolgimento nello studio dei vari soggetti:

popolazione target del biomonitoraggio (donne/genitori/bambini):

¹⁰ Keune H., Morrens B., Loots I., “Risk communication and human biomonitoring: which practical lessons from the Belgian experience are of use from the EU perspective?”, in Environmental Health n.7, 2008..

- informare in modo trasparente e corretto sulle finalità, andamento ed esiti del biomonitoraggio nel rispetto dei principi etici contenuti dai codici internazionali in materia di biomonitoraggio e dalla legge italiana
- fornire informazioni sugli esiti dello studio a livello per i singoli individui
- ottenere informazioni sui bisogni della popolazione relativi alle condizioni approfondite durante il biomonitoraggio, anche al fine di strutturare future azioni di prevenzione o supporto a livello locali

soggetti 6-11 anni che hanno partecipato al biomonitoraggio; con il coinvolgimento degli insegnanti e delle direzioni scolastiche:

- informare in modo trasparente sulle finalità dello studio, andamento ed esiti
- informazioni sugli obiettivi e modalità di coinvolgimento dei soggetti interessati dal biomonitoraggio
- informazioni e formazione sulle modalità comunicative più adeguate per supportare il reclutamento e lo svolgimento dello studio

comunità locale e mass media:

- informare in modo trasparente e corretto sulle finalità, andamento ed esiti del biomonitoraggio

partner istituzionali:

- informare in modo trasparente e corretto sulle finalità, andamento ed esiti del biomonitoraggio
- fornire informazioni rispetto alla percezione del rischio rilevata nella popolazione indagata

comunità scientifica:

- contribuire al dibattito internazionale su metodologie, pratiche e d esiti degli studi di biomonitoraggio umano

Segmentazione del target

Indichiamo di seguito i vari segmenti di target individuati in base al criterio della rilevanza in relazione allo studio (rilevanza intesa come grado di coinvolgimento ed interesse nello studio di questione). **Mappatura puntuale degli stakeholders** avvenuta con il supporto dei partner di progetto ed in particolare dei partner operanti da più tempo sul territorio.

Soggetti del biomonitoraggio

- donne
- bambini
- genitori

Partner operativi:

- docenti
- Medici di medicina generale
- Personale sanitario a contatto con i soggetti del biomonitoraggio

Partner di progetto:

- gruppo di coordinamento CCM
- partner istituzionali
 - Comune di Taranto

- Provincia di Taranto
- Regione Puglia
- Osservatorio Ilva
- Ministero della Salute
- Ministero Ambiente
- pubblico generico – I livello:
 - residenti area Taranto
 - associazioni
- pubblico generico – II livello
 - Media locali e nazionali
 - Pubblico generico
- comunità scientifica

Strumenti

La comunicazione e le informazioni relative allo studio di biomonitoraggio sono state studiate per rientrare in un più ampio disegno, condiviso all'interno del gruppo di coordinamento di progetto. Ha rispecchiato i principi di trasparenza, chiarezza e partecipazione enunciati nella parte introduttiva.

Di seguito gli strumenti utilizzati per il raggiungimento degli obiettivi del biomonitoraggio e degli obiettivi di comunicazione da esso implicati:

- Moduli propedeutici allo studio:
 - consenso informato
 - informativa sulla privacy
 - questionario per la rilevazione delle abitudini alimentari
 - Video-presentazione dello studio: documento audiovisivo che presenta obiettivi e attività dello studio (con taglio divulgativo e pensato in particolare per i bambini e i loro genitori)
 - FAQ: domande ricorrenti sia relative allo studio in generale che a contenuti di dettaglio della partecipazione all'indagine
- Documenti relativi all'andamento dello studio
 - di taglio scientifico:
 - Research overview: documenti che hanno l'obiettivo di presentare tempestivamente i risultati man mano che vengono prodotti
 - Report: approfondimenti redatti al termine dell'attività di rilievo che presentano in modo approfondito, e con taglio scientifico, le attività condotte e portate a termine [Reportistica prevista dal progetto CCM – Relazioni periodiche, semestrali e Relazione finale]
 - Di taglio divulgativo:
 - Allestimento e aggiornamento di una pagina web di taglio divulgativo, con informazioni sul progetto, appuntamenti, documenti
 - Final Overview: documento di taglio divulgativo per presentare in modo schematico i risultati principali conseguiti dallo studio
- Conferenze e iniziative informative sul territorio
- Conferenze/Comunicati stampa

- Articoli scientifici per riviste nazionali e internazionali peer reviewed
- Focus per la validazione dei materiali di comunicazione propedeutici allo studio
- Evento conclusivo per la divulgazione dei risultati dello studio (e materiali di supporto all'organizzazione del convegno)

A monte della produzione dei materiali occorre che il gruppo di coordinamento converga sulla stesura di un protocollo di pubblicazioni scientifiche e autorship che presenti tipologie di documenti da redigere, tempi e modalità di divulgazione degli stessi.

organizzazione all'interno del percorso di un incontro partecipato (OST, metaplan) con orientamento Action Planning, con i genitori dei bambini coinvolti nello studio e delle donne coinvolte nella parte relativa all'endometriosi al fine di raccogliere informazioni su eventuali azioni di supporto auspiccate da parte dei cittadini. Il lavoro svolto è auspicabile che possa essere utilizzato per avviare un'attività di ascolto in grado di raccogliere bisogni informativi, di supporto psicologico oppure più concreti e tangibili derivanti dalle classiche reazioni connesse alla comunicazione degli esiti degli studi di biomonitoraggio umano (paura, preoccupazione, stigma sociale, intrapresa di cure mediche non necessarie ecc...).

Articolazione di strumenti e azioni in relazione al target

Sequenza delle attività e cronoprogramma

Indichiamo di seguito le sequenza delle attività previste in supporto alla comunicazione legata allo svolgersi del progetto.

- Mappatura completa degli stakeholders e identificazione dei partner istituzionali (non solo del settore sanitario) coinvolti nella comunicazione dello studio
- Allestimento spazio online per aggiornamenti di progetto e ideazione logo
- Redazione moduli e documenti propedeutici allo studio
- Focus group di "esperti" per la validazione dei moduli propedeutici allo studio
- Incontri con docenti, pediatri e MMG
- *Formazione operatori sanitari*
- Iniziativa pubblica di avvio del percorso (con azione di ufficio stampa di supporto)
- [Iniziative ad hoc sul territorio: incontri informativi]
- Reclutamento
- Aggiornamenti periodici (Report, Overview, Videoclips, aggiornamenti web)
- Restituzione dei risultati: rispetto alla trasparenza e alla comunicazione dei risultati occorre rispettare la piramide delle priorità dei destinatari, ovvero:
 - o comunicazione dei risultati individuali ai soggetti dello studio
 Occorre definire se lasciare ai partecipanti la scelta di:
 - ricevere i risultati individuali a casa
 - ricevere i risultati per il tramite del medico curante
 - non ricevere alcun riscontro rispetto ai risultati

- comunicazione dei risultati dello studio ai gruppi di soggetti coinvolti: incontri informativi collettivi con i soggetti del biomonitoraggio
- comunicazione dei risultati alla comunità locale: incontro informativo sul territorio
- comunicazione alla stampa, ai mezzi di informazione e al pubblico generico: Conferenza stampa ed evento finale
- Divulgazione scientifica dei risultati (pubblicazioni peer reviewed ecc...)

Quindi durante il progetto per l'Obiettivo 4 le Unità Operative coinvolte hanno supportato i partner nell'elaborazione e revisione dei documenti rivolti ai soggetti degli studi di biomonitoraggio e agli altri target (tecnici e operatori, pediatri, genitori, cittadini, opinione pubblica e pubblici generici).

Per quel che riguarda il biomonitoraggio relativo al target bambini, in collaborazione con UNIBS e ASL Taranto, è stato messo a punto uno **schema di attività** di comunicazione che sintetizza, per ciascuna attività programmata, obiettivi, target, materiali comunicativi necessari, tempi e soggetti responsabili per ciascuna azione. Tale schema è stato concordato e discusso in un incontro tecnico che si è svolto il 2 ottobre 2014 a Riccione e successivamente messo a punto insieme ai partner.

In base a questo schema sono poi state effettuate le opportune attività di revisione e modifica dei documenti necessari per condurre il biomonitoraggio, alla luce delle evidenze emerse da una analisi della letteratura esistente in materia di biomonitoraggio umano e alle *best practices* disponibili.

È stato in particolare fornito il supporto comunicativo in relazione ai seguenti documenti:

- lettera di invito
- questionario screening arruolamento dei casi
- modulo di partecipazione
- modulo informativo e per il consenso informato
- brief tecnico destinato ai pediatri
- documento FAQ: elaborazione dei contenuti appositi destinati a iniziative di divulgazione (opuscoli, pubblicazione online), strutturati in domande-risposte (FAQ), che sono stati messi a disposizione del gruppo di lavoro anche come supporto nell'elaborazione delle presentazioni dello studio nelle scuole a genitori e bambini.
- presentazione dello studio (formato Power Point)
- presentazione contenuti tecnici e fasi dello studio in formato Prezi: rielaborazione dei contenuti con il software Prezi che consente di realizzare presentazioni animate, adatte anche al web.

Per quel che riguarda lo studio di biomonitoraggio relativo all'endometriosi, è stato fornito un supporto in merito alla revisione dei documenti, predisposti dall'ISS, che sono stati utilizzati per lo studio:

- Consenso Informato
- informativa per la privacy

- Questionario (da somministrare da parte di operatori sanitari)
- Guida al consenso informato (materiale informativo da distribuire alle donne)
- Opuscolo con FAQ relative allo studio
- sito web di progetto.

Infine, in vista della pubblicazione di contenuti online e dell'utilizzo nelle scuole, in data 27 ottobre 2014 è stata siglata una convenzione tra ISS e Kinderumwelt – Ltd not for profit per l'utilizzo a titolo gratuito del filmato in formato Flash, che presenta i contenuti principali di uno studio di monitoraggio

A supporto dell'attività svolta è stata effettuata una ricognizione ed elaborazione della letteratura e delle *best practices* nazionali e internazionali in materia di comunicazione del biomonitoraggio umano.

Conclusioni generali dello studio di biomonitoraggio e tossicità degli inquinanti presenti nel territorio di Taranto (CCM 2013)

Per semplicità espositiva si ricorda l'OBIETTIVO GENERALE dello studio:

“Valutazione dell'esposizione di gruppi di popolazione residente in aree della città di Taranto prossime allo stabilimento ILVA, a confronto con aree non impattate dalle emissioni dell'ILVA stessa e del possibile impatto sulla salute riproduttiva femminile e su funzioni cognitive in popolazioni pediatriche. In considerazione della molteplicità di inquinanti rilevati a Taranto e del complesso profilo di esposizione della popolazione residente, ai fini della sorveglianza sanitaria si propone di affiancare al monitoraggio ambientale - eseguito da ARPA Puglia - e dell'esposizione - eseguita da ISS, ASL Taranto- l'impiego di saggi cellulari in grado di valutare l'attività biologica del particolato presente nell'area di Taranto. Tale approccio, oltre a fornire elementi utili alla valutazione del rischio, consentirà di identificare possibili markers biologici utili all'analisi della popolazione residente nell'area di Taranto e esposta a miscele complesse di inquinanti atmosferici”.

Di seguito si riportano le conclusioni generali dello studio in relazione ai singoli obiettivi specifici, a meno dell'Obiettivo specifico 4, per il quale si rimanda alla Relazione Finale:

OBIETTIVO SPECIFICO 1:

Costruzione di mappe geo-referenziate di contaminazione ambientale nell'area interessata allo studio sulla base dei dati resi disponibili dalle strutture presenti sul territorio.

Caratterizzazione del potenziale immunotossico, pro-infiammatorio e genotossico del materiale particolato aerodisperso della città di Taranto.

Risultati:

1. La metodologia applicata in questo studio, di esposizione in vitro delle cellule direttamente ai filtri di raccolta del PM₁₀, ha permesso di acquisire una prima serie di indicazioni sul possibile effetto immunotossico e pro-infiammatorio di tale materiale su cellule immunitarie del sangue periferico di soggetti adulti sani, evitando la possibile alterazione causata dai processi di estrazione del PM₁₀ dal filtro.
2. La valutazione del potenziale immunotossico del PM₁₀ mediante determinazione dell'effetto su vitalità, apoptosi e capacità proliferativa cellulare ha evidenziato che solo il PM₁₀ campionato nella stagione fredda nelle postazioni urbane ISS Roma, Statte e Macchiavelli, esercita un effetto citotossico su cellule immunitarie circolanti umane in quanto causa una riduzione di vitalità e/o un aumento di

apoptosi. Va notato che il PM₁₀ campionato nella stagione fredda presso la postazione ISS Roma risulta essere quello con la maggiore capacità di alterare la vitalità cellulare ed è anche l'unico in grado di ridurre la capacità proliferativa delle cellule immunitarie verso una sostanza ad attività mitogenica. Nella stagione estiva non si osserva un effetto immunotossico statisticamente significativo del PM₁₀ campionato negli stessi siti urbani.

3. Per quanto riguarda la valutazione del potenziale pro-infiammatorio è stato osservato che il PM₁₀ campionato nella stagione calda ed in misura ridotta quello campionato nella stagione fredda nelle tre aree urbane esaminate (ISS Roma, Statte e Macchiavelli) è in grado di indurre la produzione di citochine e chemochine coinvolte nelle risposte infiammatorie, suggerendo una capacità attivatoria di tale PM₁₀ nei confronti delle cellule immunitarie circolanti umane. Il ridotto effetto pro-infiammatorio del PM₁₀ prelevato nelle tre aree urbane di ISS Roma, Statte e Macchiavelli durante la stagione fredda, è presumibilmente dovuta all'effetto immunotossico esercitato dal PM₁₀ campionato in tale stagione. Questa ipotesi è stata confermata dall'analisi statistica che ha messo in evidenza una correlazione lineare inversa tra vitalità cellulare e produzione di citochine in risposta al materiale particolato. Il PM₁₀ della postazione ISS Roccarespampani, essendo sprovvisto, come atteso, di effetto immunotossico, è quello che maggiormente mostra un effetto attivatorio sulla produzione di fattori solubili di tipo citochinico e chemochinico da parte delle cellule immunitarie circolanti in entrambe le stagioni.
4. La valutazione dei risultati ottenuti relativi al potenziale immunotossico e pro-infiammatorio del PM₁₀ suggerisce che le differenze osservate tra le 4 postazioni analizzate e, per ogni postazione, tra stagione calda e stagione fredda sono imputabili a differenze qualitative di composizione chimico-fisica del PM₁₀ e/o alle possibili diverse interazioni tra i suoi componenti.
5. Inoltre il rilevamento di un significativo effetto immunotossico nella stagione fredda e di un maggiore effetto pro-infiammatorio nella stagione calda suggerisce che tali diversi effetti sul sistema immunitario siano verosimilmente imputabili a differenti composizioni di inquinanti presenti nel PM₁₀ prelevato.
6. I risultati delle analisi effettuate sul PM₁₀ per la determinazione degli IPA suggeriscono che gli effetti biologici osservati verosimilmente non sono imputabili a questa classe di isomeri in quanto la loro concentrazione nei campioni analizzati risulta sempre inferiore al limite di rivelabilità. L'approfondimento dello studio potrebbe prevedere la caratterizzazione di un numero maggiore di isomeri degli IPA in funzione delle sorgenti presenti sul territorio.
7. Le analisi al SEM/EDX effettuate sulle singole particelle costituenti il PM₁₀ hanno evidenziato delle differenze nella composizione dei *cluster* del PM₁₀ nelle diverse postazioni e nei diversi periodi di campionamento.

8. L'identificazione dei componenti, singoli o in combinazione, responsabili degli effetti biologici osservati nei nostri sistemi cellulari in vitro necessita ulteriori approfondimenti in una popolazione più ampia di campioni e per un periodo più prolungato di osservazioni.
9. Nel corso di questa indagine è stato messo a punto un modello sperimentale che ha permesso di valutare l'effetto genotossico del particolato atmosferico inalabile (PM₁₀) in cellule bersaglio esposte direttamente al particolato raccolto su filtri (i filtri utilizzati sono stati i medesimi di quelli utilizzati per lo studio del potenziale immunotossico). Questa procedura è innovativa rispetto agli approcci precedenti, basati sull'analisi della fase organica estratta chimicamente dal particolato, e permette una valutazione più rigorosa della genotossicità del particolato stesso, anche a fini comparativi, in quanto tiene conto della effettiva biodisponibilità delle componenti genotossiche su di esso adsorbite. I risultati ottenuti con il sensibile saggio della cometa (*comet assay*), che misura prevalentemente l'induzione di rotture a singola elica nel DNA, hanno mostrato un effetto genotossico limitato ma statisticamente significativo con i campioni di PM del sito urbano di Roma (stazione di campionamento presso l'ISS) e di Taranto Machiavelli, prossimo all'area industriale della città. Non ha invece prodotto effetti genotossici rilevabili il particolato della postazione urbana di Taranto Statte e, come atteso, del sito extraurbano di Rocca Respampani (Viterbo). E' importante comunque sottolineare che il danno al DNA rilevato dal saggio della cometa testimonia un'interazione del materiale in studio con il DNA che non necessariamente evolve in un evento mutageno.
10. La risposta genotossica indotta nel *comet assay* dall'esposizione delle cellule al particolato è risultata più elevata con i campioni della postazione di Roma ISS rispetto a quelli di Taranto, in entrambe le campagne di campionamento. Tuttavia tale differenza raggiunge la significatività statistica solo nella stagione invernale ($p=0,04$ e $p=0,03$ per il sito di Machiavelli e Statte rispettivamente). L'indicazione di una maggiore genotossicità per il particolato atmosferico di Roma è confermata dai risultati dell'analisi della fosforilazione dell'istone H2AX, un marcatore della rottura di entrambi i filamenti del DNA. E' questo un evento più raro rispetto alle rotture a singolo filamento misurate dal *comet assay*, ma potenzialmente più grave in quanto direttamente associato alla morte cellulare o a riarrangiamenti cromosomici.
11. Sulla base dei dati disponibili, relativi a campionamenti spot effettuati presso un numero limitato di postazioni e per un numero limitato di giorni, non è possibile stabilire se la maggiore attività genotossica mostrata dai campioni di particolato di Roma rispetto a quelli di Taranto rifletta una reale maggiore diffusione di inquinanti genotossici nell'aria di Roma. Va comunque sottolineato che l'entità dell'effetto genotossico osservato è risultata in ogni caso limitata, come mostra il confronto con un agente genotossico di riferimento.
12. Il confronto tra pattern di attività dei campioni analizzati e parametri chimico-fisici, sopradescritti, non mostra una ovvia associazione, in particolare per quanto riguarda i livelli totali di particolato, che sono confrontabili nei tre siti urbani

esaminati. La diversa composizione elementare dei particolati indica tuttavia marcate differenze tra i siti e i periodi di campionamento, che possono riflettere il variabile contributo di diverse attività antropiche. L'evidenza di attività genotossica del PM10 non contrasta con i risultati analitici che mostrano l'assenza di IPA, perchè le specie genotossiche adsorbite sul particolato sono prevalentemente composti policiclici ossigenati o nitrati, e non IPA, che peraltro sarebbero stati inattivi nelle condizioni di saggio applicate (per le ridotte capacità metaboliche delle cellule del sangue). Ulteriori indagini basate sul sistema di saggio testé messo a punto, associate ad una estesa caratterizzazione chimica del PM10, potrebbero contribuire attraverso un processo di *source apportionment* alla identificazione dei maggiori fattori di rischio genotossico, contribuendo ad una mirata azione di prevenzione ambientale.

In conclusione, il quadro complessivo che emerge da questa indagine suggerisce per la città di Taranto, per gli inquinanti genotossici aerodispersi analizzati, un carico non superiore a quello di Roma, almeno relativamente alle aree coperte dalle stazioni di campionamento.

E' comunque opportuno sottolineare che i risultati ottenuti nel corso di questa indagine, e le relative implicazioni sui livelli di contaminazione atmosferica nei siti studiati, sono specificamente riferibili ai periodi in cui sono stati effettuati i campionamenti, e possono non essere rappresentativi per periodi precedenti, in cui varie attività antropiche possono avere avuto un impatto diverso.

Considerando i limiti intrinseci dello studio *in vitro*, la bassa numerosità campionaria analizzata ed il limite temporale dei rilevamenti ambientali, i risultati dello studio non possono ritenersi conclusivi e sono solo rappresentativi dei periodi in cui sono stati effettuati i campionamenti.

In ogni caso i risultati dei test *in vitro* di immunotossicità, potenziale pro-infiammatorio e genotossicità confermano la presenza di sostanze genotossiche, immunotossiche e con potenziale pro-infiammatorio nel particolato aerodisperso delle aree urbane ma non evidenziano specificità per la città di Taranto rispetto ad un altro sito urbano di riferimento.

OBIETTIVO SPECIFICO 2:

Stima del ruolo svolto dall'interazione tra esposizione a inquinanti ambientali (diossine, PCB e IPA) e caratteristiche genetiche relative ad enzimi coinvolti nella biotrasformazione degli stessi inquinanti sulla salute riproduttiva femminile, specificamente nell'insorgenza di endometriosi.

Risultati:

1. I risultati dello studio evidenziano concentrazioni di PCDD, PCDF, DL-PCB e NDL-PCB in linea con i valori osservati in un recente studio su gruppi di donne della popolazione generale italiana con caratteristiche confrontabili a quelle del presente studio.

2. Analogamente a quanto osservato precedentemente in una popolazione di donne residenti a Roma, le concentrazioni di contaminanti nel siero risultano essere nel complesso più elevate nelle donne con endometriosi rispetto al gruppo di controllo. La differenza di concentrazione è statisticamente significativa per PCDD+PCDF+DL-PCB (Tot TE) e PCDD+PCDF. Stratificando per età tale differenza perde significatività per le donne di età >33 anni, mentre rimane significativa per le donne di età compresa fra 20 e 33 anni.
3. Livelli medio alti di concentrazione nel siero di Tot TE, PCDD+PCDF, NDL-PCB risultano associati, nei limiti della numerosità campionaria considerata, a un aumento di rischio relativo di endometriosi statisticamente significativo, seppur contenuto, rispetto ai livelli bassi; stratificando per età l'aumento di rischio permane per le donne di età compresa fra 20 e 33 anni e perde in significatività per quelle di età più alta.
Non si evidenziano associazioni fra la concentrazione di contaminanti e lo stadio dell'endometriosi in nessuna delle due fasce di età considerate.
4. Negli stessi soggetti, la sola presenza di un polimorfismo di GSTM1, GSTT1 e GSTP1 non provoca un aumento significativo di rischio di sviluppare endometriosi. Tuttavia, incrociando le concentrazioni di contaminanti nel siero con il profilo genetico, si osserva, nei limiti della numerosità campionaria, una tendenza a un aumento significativo, seppur contenuto, del rischio relativo (OR) di endometriosi rispetto all'aumento di rischio già osservato considerando i soli dati di contaminazione del siero. Tale incremento si osserva nei soggetti con livelli medio alti di contaminanti (Tot TE, PCDD+PCDF, NDL-PCB) rispetto a quelli con livelli bassi, in presenza dei genotipi GSTM1+ e GSTP1 w/w.
5. Risultati simili erano stati osservati in un analogo studio precedente su un gruppo di donne residenti a Roma. Il genotipo GSTT1 non è associato a modifiche del rischio relativo di endometriosi in relazione alla concentrazione di qualunque inquinante analizzato.
6. Per quanto riguarda gli OH-IPA, i risultati dello studio evidenziano, per tutti i metaboliti considerati, l'assenza di differenze di concentrazione statisticamente significative tra le donne con endometriosi e il gruppo di controllo.
Come atteso, i livelli di OH-IPA nel gruppo delle fumatrici sono significativamente più elevati rispetto a quelli determinati nelle non fumatrici.
Il confronto con i risultati di uno studio condotto su un gruppo di donne residenti a Torino evidenzia, nell'intero gruppo delle donne del presente studio, concentrazioni significativamente più elevate per quasi tutti gli OH-IPA analizzati. Dopo stratificazione per abitudine al fumo, rimangono fortemente significative nelle non fumatrici dei due studi le differenze di concentrazione di 2-OH-NAP, 1-OH-PYR e la somma Σ_{10} OH-IPA. Una più completa interpretazione dei risultati in relazione anche agli stili di vita, abitudini alimentari, ecc, potrà derivare dall'analisi approfondita dei questionari associati alle donne arruolate per il biomonitoraggio. In ogni caso lo studio suggerisce l'opportunità di approfondire la conoscenza del contesto espositivo a idrocarburi policiclici aromatici delle donne residenti a

Taranto, pur non evidenziando il presente studio una correlazione tra esposizione a questi inquinanti e la patologia investigata.

Si evidenzia che dai dati riportati da ISPRA relativamente alla qualità dell'aria ambiente in Italia per gli anni 2013-2014, la concentrazione del Benzo(a)pirene, considerato tracciante per la famiglia degli IPA, è in netto calo sia a Taranto che a Roma, attestandosi a concentrazioni ben inferiori al limite normativo. Pertanto si ritiene necessario che in contesti ad alta pressione ambientale, quale la realtà tarantina, non ci si limiti alla mera ricerca del Benzo(a)pirene, bensì si analizzi uno spettro più ampio di IPA, oltre ad una sempre più approfondita caratterizzazione del particolato.

In conclusione, le concentrazioni di PCDD, PCDF (diossine) e PCB nel siero sono in linea con i valori osservati in un recente studio su gruppi di donne della popolazione generale italiana con caratteristiche confrontabili a quelle del presente studio. Nei limiti della numerosità campionaria e in linea con quanto osservato in uno studio analogo effettuato su una popolazione di donne residenti a Roma, si osserva come a un aumento dei livelli ematici di diossine e PCB sia associato un contenuto incremento di rischio (Odds Ratio) di endometriosi, incrementato dalla presenza di alcuni genotipi di enzimi detossificanti.

Lo studio non ha evidenziato una correlazione tra esposizione a IPA (misurati nelle urine come OH-IPA) ed endometriosi. Tuttavia, si sono rilevate concentrazioni di alcuni OH-IPA mediamente più elevate di quelle riscontrate in altri studi e, in particolare, in un recente studio su un gruppo di donne italiane: questa osservazione suggerisce l'opportunità di approfondire la conoscenza del locale contesto espositivo a IPA.

OBIETTIVO SPECIFICO 3:

Definizione dell'esposizione a metalli con proprietà neurotossiche (As, Cd, Hg, Mn e Pb) in fluidi e tessuti di soggetti in età evolutiva (6-11 anni) residenti nelle aree di Taranto in studio e in un gruppo di controllo al fine di individuare eventuali difformità di esposizione e valutare le possibili associazioni con deficienze nella sfera neuro-comportamentale e cognitiva.

Risultati:

Lo studio è stato programmato per indagare i possibili effetti sulla sfera dello sviluppo neuropsicologico di alcuni metalli potenzialmente neurotossici, quali arsenico (As), cadmio (Cd), manganese (Mn), mercurio (Hg), piombo (Pb), e del selenio (Se) quest'ultimo in quanto coinvolto nel complesso sistema di difesa contro lo stress ossidativo. Sono stati esaminati 299 soggetti in età scolare (6-11 anni), suddivisi equamente fra maschi e femmine e residenti in aree situate a distanza incrementale dalla zona di emissione industriale, con la zona Tamburi più vicina alle sorgenti emissive (fra 1 e 5 Km); Statte - Paolo VI - Taranto (fra 5 e 10 Km), e l'area di Talsano più lontana (fra 10 e 15 Km). La distanza è stata calcolata con riferimento agli impianti ILVA, nelle cui adiacenze insistono anche una raffineria ed un cementificio.

I soggetti sono stati esaminati attraverso una completa valutazione delle funzioni neurocomportamentali, fra cui: i) il Quoziente Intellettivo (QI); ii) le funzioni esecutive, con particolare riferimento ai test diagnostici per ADHD (*Attention-*

Deficit/Hyperactivity Disorder); iii) il comportamento sociale con particolare riferimento ai test di screening per l'autismo; iv) i tratti psicopatologici quali ansia e depressione. Sono state considerate anche variabili riguardanti lo stato socio economico (SES, *Socio-Economic Status*) ed il livello culturale delle famiglie di appartenenza, fattori in grado di influenzare lo sviluppo neuropsicologico. Infine sono stati esaminati i livelli di esposizione ai suddetti metalli e per tale ragione i soggetti sono stati sottoposti a prelievo di sangue, urine e capelli. I risultati evidenziano, in sintesi, i seguenti aspetti:

1. Valori di biomonitoraggio (dose interna dei metalli) non elevati, nella loro globalità, rispetto ai riferimenti considerati e non indicativi di sorgenti di esposizione specifiche, non risultando distribuiti diversamente in funzione delle zone di residenza nè della distanza dalle sorgenti emissive. Si rende comunque necessaria una verifica dei livelli di cadmio e delle specie di arsenico nelle urine per identificare con precisione le sorgenti di esposizione.
2. Riduzione del QI rilevata con la batteria WISC (*Wechsler Intelligence Scale for Children*) nelle aree di Tamburi e Paolo VI, dove è evidente anche un livello di SES fondamentalmente medio-basso (confermato dalla proporzionalità del QI con il livello SES), ed in relazione alle *performances* materne nelle Matrici Progressive (SPM, *Standard Progressive Matrices*), rispetto alle aree a maggiore distanza dalle sorgenti di emissione;
3. Aumento di iperattività e tratti psicopatologici (ansia e depressione), riduzione dell'attenzione e alterazione del comportamento sociale, rilevati con le batterie CANTAB (*Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery*), CBCL (*Child Behavior Checklist*) e SRS (*Social Responsiveness Scale*), nelle aree di Tamburi, Paolo VI, Statte rispetto alle aree a maggiore distanza dalle sorgenti di emissione;
4. Potenziale aumento di patologie del neurosviluppo, quali ritardo intellettivo, ADHD, autismo e di tratti psicopatologici, quali ansia e depressione nelle aree di Tamburi, Paolo VI, Statte; il dato deve essere confermato mediante approfondimento clinico specialistico;
5. Associazione dei punteggi di QI, test di iperattività, disturbi dell'attenzione e del comportamento sociale (rilevati con le batterie CANTAB, CBCL e SRS) con gli indicatori di biomonitoraggio, in modo particolare il Pb ematico. Gli effetti osservati a carico delle funzioni neuropsicologiche risultano in relazione alla zona di residenza, alla distanza dalle sorgenti di emissione, e al biomonitoraggio del piombo, e permangono significativi anche dopo aver controllato l'influenza, comunque elevata, dei fattori socio economici e culturali legati alle famiglie di appartenenza dei soggetti.
6. In particolare per i dati di biomonitoraggio si riporta il confronto delle concentrazioni nelle varie matrici con i limiti tossicologici internazionalmente riconosciuti:
 - a. Mercurio e manganese nei capelli: in mancanza di limiti tossicologici, il valore mediano di Hg (come metil-Hg, 476 ng/g) e Mn (135 ng/g) nei capelli è risultato simile o inferiore a quanto riportato da analoghi studi;
 - b. Mercurio urinario: per i valori di Hg urinario (Hg inorganico e/o metallico), 221 soggetti hanno un livello di elemento al di sotto del limite di quantificazione mentre i restanti 78 hanno concentrazioni inferiori al valore limite dello Human BioMonitoring tedesco (HBM-I, 7 ng/ml) e, quindi, non richiedono successive valutazioni;

- c. Arsenico urinario: il valore mediano per l'As totale (8.3 ng/ml) è leggermente più alto delle mediane del *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES, 5.5 ng/ml) e del *German Environmental Survey for Children* (GerES IV, 4.5 ng/ml). Per una corretta valutazione tossicologica è necessario effettuare la quantificazione delle varie specie chimiche dell'As presenti nelle urine. Per questo motivo, urine di 21 soggetti con i valori più alti di As totale (≥ 50 ng/ml) sono stati sottoposti ad analisi di speciazione, evidenziando che il 93% del valore di As urinario era rappresentato dall'As-Betaina, prodotto di origine alimentare e non tossico.
- d. Cadmio urinario: 174 bambini hanno una concentrazione inferiore all'HBM-I (valore di sicurezza di 0.5 ng/ml), 125 ne hanno una intermedia tra HBM-I e HBM-II (valore di attenzione di 2 ng/ml), ma nessun valore è superiore al *Biomonitoring Equivalent* di azione (BE_{POD}, 4.6 ng/ml). Da questi risultati possiamo concludere che i 125 soggetti dovrebbero essere rivalutati dalle istituzioni preposte. Dal momento che non sembra esserci un apporto del fumo passivo sulla dose interna di Cd (almeno come rilevato da questionari, dai quali emerge che soltanto il 10 % dei soggetti è esposto a questa fonte) attenzione dovrà essere posta al possibile contributo della dieta (vegetali a foglia verde, patate, granaglie, oltre a pesce locale) e della presenza di piercing metallici (36 dei 125 bambini hanno piercing);
- e. Piombo ematico: il 95° percentile del Pb nel sangue ottenuto in questo studio è pari a 17.02 µg/L; la mediana (8.40 ng/ml) risulta la metà di quanto misurato in 299 adolescenti bresciani e di quello del GerES IV ed è confrontabile con lo studio americano NHANES (6.40 ng/ml). L'*EFSA CONTAM Panel* riporta, come '*reference point*' per problemi nello sviluppo cognitivo nei bambini (misurato come IQ), una *benchmark* dose corrispondente ad un rischio aggiuntivo dell'1% (BMDL01) pari a 12 µg Pb/L, che coincide con l'80° percentile osservato nel gruppo di bambini esaminato. Quindi, il restante 20 % dei soggetti ha un livello ematico di Pb superiore alla BMDL01. Anche se i dati riscontrati nel loro insieme risultano minori o dello stesso tenore di altri studi le indicazioni tossicologiche vanno nella direzione di concentrazioni di Pb ematico più basse possibili: la relazione tra Pb ematico ed effetto neurologico, infatti, è rappresentata da una curva non lineare che riflette un impatto relativo maggiore per le concentrazioni più basse;
- f. Selenio ematico: il valore mediano di Se nei bambini di Taranto (142 ng/ml) garantisce una attività antiossidante ottimale.

In conclusione lo studio ha permesso di rilevare una situazione di potenziale presenza di disturbi clinici e preclinici del neurosviluppo nell'area di Taranto, non riconosciuti e non adeguatamente sottoposti ad interventi preventivi, terapeutici e riabilitativi. Il 15% di potenziali diagnosi cliniche osservato nel campione esaminato, basato per definizione su soggetti supposti sani, indica l'opportunità di ulteriori approfondimenti diagnostici ed epidemiologici. Si tratta comunque di un risultato in linea con i dati epidemiologici mondiali sulle patologie del neurosviluppo comprendenti autismo, ADHD, disturbi dell'apprendimento e del comportamento, che interessano il 10-15% delle nascite.

I disturbi osservati sono maggiormente evidenti nelle aree in prossimità delle emissioni industriali considerate ed in funzione inversa rispetto alla distanza dalle sorgenti, calcolata in riferimento ai camini di emissione dell'ILVA, nelle cui adiacenze insistono anche una raffineria ed un cementificio.

Gli effetti neuropsicologici, come peraltro atteso, sono associati soprattutto al piombo, anche se le concentrazioni interne di questo metallo e degli altri studiati risultano, globalmente, minori o dello stesso tenore di altri studi e non sono indicativi di sorgenti di esposizione specifiche, non risultando distribuiti diversamente in funzione delle zone di residenza nè della distanza dalle sorgenti emmissive. Il ruolo dell'esposizione ad agenti neurotossici risulta pertanto uno dei determinanti degli effetti osservati nell'area di Taranto, assieme allo stato socioeconomico.

Data la natura trasversale delle osservazioni non è possibile attribuire un ruolo di causalità, considerando la non disponibilità di dati di monitoraggio ambientale in prossimità delle scuole prese in considerazione che non ha permesso di identificare con precisione le sorgenti di esposizione.

E' opportuno comunque evidenziare alcune limitazioni dello studio che risiedono fondamentalmente nella dimensione campionaria e nella non disponibilità di dati di monitoraggio biologico relativi ad epoche pregresse, caratterizzate da prevedibili livelli più elevati di emissioni industriali, relative soprattutto all'epoca prenatale e postnatale dei soggetti esaminati in cui si realizza una maggiore vulnerabilità durante lo sviluppo delle funzioni nervose.