**Sintesi Progetto Gruppo di lavoro “Studio epidemiologico”**

**25 Novembre 2014**

Il gruppo di lavoro “Studio epidemiologico” è composto da:

* Asl 12 di Viareggio Dipartimento di Prevenzione e Igiene Pubblica (Ida Aragona, Stefano Pieroni)
* ARS Toscana (Daniela Nuvolone, Francesco Cipriani)
* CNR ICCOM (Emilia Bramanti, Massimo Onor)
* Laboratori di Sanità Pubblica (Gianfranco Sciarra, Cristina Aprea, Marco Vincentini, Claudia Cassinelli, Andrea Perico)
* Dott. Silvano Bertelloni (Pediatra AUOP, Pisa)
* Comitato Pietrasanta (Bruto Pomodoro)
* Istituto Superiore di Sanità

|  |  |
| --- | --- |
| IPOTESI DI LAVORO | |
| **Attività a breve termine** | Determinazione delle concentrazioni di tallio nelle matrici umane dei cittadini di Valdicastello Carducci e Pietrasanta. |
| **Attività a medio termine** | Studio epidemiologico di coorte retrospettivo dei residenti nel comune di Pietrasanta.  Determinazione delle concentrazioni di tallio ed altri metalli pesanti (Hg, Cd, Pb e As) nelle matrici animali e vegetali provenienti da alimenti prodotti per autoconsumo a Valdicastello Carducci. |
| **Attività a lungo termine** | Studio di popolazione con approccio di coorte prospettico dei residenti della frazione di Valdicastello.  Prosecuzione delle attività di monitoraggio di matrici animali e vegetali |

**Revisione e valutazione del progetto di studio**.

La predisposizione dei protocolli di studio delle varie fasi del progetto, le fasi attuative e di realizzazione, l’interpretazione, la diffusione e comunicazione dei risultati saranno oggetto di valutazione e revisione da parte dell’Istituto Superiore di Sanità.

**Attività a breve termine.**

Determinazione delle concentrazioni di tallio nelle matrici umane dei cittadini di Valdicastello Carducci e Pietrasanta.

**Obiettivo**: valutare l’impatto dell’esposizione della popolazione al tallio attraverso il dosaggio nei capelli e nelle urine.

**Metodi**: in via prioritaria saranno analizzati i campioni di urine il cui campionamento e’ stato effettuato dai singoli cittadini, seguendo dettagliate istruzioni, immediatamente dopo l’ordinanza di divieto di utilizzo dell’acqua della rete idrica pubblica.

Il **campionamento delle urine** e’ stato fatto nella frazione di Valdicastello entro i 10 giorni successivi dall’emanazione dell’ordinanza comunale di non potabilità dell’acqua dell'acquedotto poiché, come riportato nella letteratura scientifica internazionale, l’emivita del tallio nelle urine va da 2 a 30 giorni a seconda della variabilità biologica. Sono state raccolte le prime urine della mattina, in contenitori di plastica e conservate in congelatore, in attesa di istruzioni per la loro analisi da parte della rete dei laboratori di Sanità Pubblica. In maniera analoga i cittadini di Pietrasanta hanno effettuato la raccolta delle urine la settimana successiva all’ordinanza di non potabilità’ dell’acqua dell'acquedotto che ha coinvolto il centro storico agli inizi di novembre 2014. I campioni di urine a disposizione sono circa 800 nella frazione di Valdicastello Carducci e circa 150 nella zona di Pietrasanta.

Il **campionamento dei capelli** (circa 200 campioni) e’ stato effettuato sulla popolazione della frazione di Valdicastello Carducci tra il 18 ed il 31 ottobre 2014. I prelievi sono stati effettuati nella zona occipitale del cranio rasando la ciocca a filo del cuoio capelluto. Il prelievo consisteva in 3 ciocche, entrambe del diametro di una matita. Le ciocche sono state quindi frammentate in segmenti della lunghezza di circa 1 cm. Sono stati campionati esclusivamente capelli non trattati con colorazioni e con una lunghezza non inferiore ai 3 cm. Il campionamento dei capelli nell’area del centro storico di Pietrasanta, interessata in un secondo momento dal divieto di utilizzo di acqua, deve ancora essere organizzato nelle prossime settimane (si ipotizzano circa 50-70 campioni), senza particolare urgenza dato che i metalli pesanti rimangono irreversibilmente legati alle proteine del capello.

I campioni di urine e capelli saranno consegnati al Dipartimento di Prevenzione dell’Azienda USL 12, per il successivo invio al laboratorio di analisi; al momento della consegna del campione personale sanitario (infermiere – assistenti sanitarie) provvederà ad effettuare un’intervista su questionario approvato dal Comitato di bioetica. Sarà inoltre acquisito il consenso informato.

I risultati analitici dei campioni saranno consegnati, a cura del Dipartimento di Prevenzione dell’Azienda USL 12, ad ogni soggetto partecipante allo studio.

Sia per i cittadini di Valdicatello Carducci che per i cittadini del centro storico di Pietrasanta, il **campionamento delle urine sarà ripetuto**, almeno trenta giorni dopo la cessazione dell'assunzione di acqua inquinata, al fine di valutare il trend delle concentrazioni di tallio nelle urine in seguito alla cessazione dell’esposizione. Lo studio riguarderà la popolazione adulta, i bambini e, se necessario, gli adolescenti. I partecipanti dovranno essere maschi e femmine, di età compresa tra 18 e 65 anni nel caso degli adulti, di età compresa tra 0 e 10 anni nel caso dei bambini ed infine di età compresa tra 11 e 17 anni nel caso degli adolescenti. Dovranno essere esclusi, i lavoratori con potenziale esposizione a tallio. Il prelievo dei campioni dovrà essere completato nell’arco temporale di 10/20 giorni per limitare la variabilità e le operazioni di conferimento e gestione dei campioni per il successivo invio alla rete dei laboratori sono affidate alla ASL 12.

Per ogni fascia di età sarà necessario selezionare un gruppo di controllo per stimare i valori di riferimento del tallio urinario. La numerosità dei gruppi di controllo dovrà essere la seguente:

* Adulti: 50 maschi e 50 femmine
* Bambini: 25 maschi e 25 femmine - dato che nei bambini le differenze di escrezione legate al sesso dovrebbero essere ininfluenti la composizione maschi/femmine può anche essere diversa da quella indicata
* Adolescenti: 25 maschi e 25 femmine

Le popolazioni di riferimento dovranno provenire da luoghi che hanno le stesse abitudini alimentari ma che non hanno avuto la possibilità di bere l'acqua inquinata da tallio. Per questa ragione non dovranno essere selezionati individui che, pure non residenti a Pietrasanta, trascorrono o abbiano trascorso periodi di tempo significativi in questo comune. In altre parole vanno esclusi ad esempio lavoratori o studenti pendolari che lavorano o studiano a Pietrasanta.

Le **analisi dei campioni** saranno effettuate dal laboratorio di Sanità Pubblica Area vasta Toscana Sud-Est che è accreditato ACCREDIA con il numero 0790. Per l’analisi, i campioni di urina opportunamente diluiti con acido nitrico 1% e addizionati di standard interno (gallio), vengono analizzati in ICP/MS. La determinazione quantitativa viene effettuata mediante taratura con soluzioni di riferimento preparate in acqua; la relazione tra l’intensità del segnale e la concentrazione delle masse è lineare per più di 6 ordini di grandezza. La preparazione del campione viene eseguita sotto cappa a flusso laminare. L’apparecchiatura impiegata sarà ICP/MS Perkin Elmer DRC II munito di camera ciclonica (cyclonic spray chamber), e pompa peristaltica, autocampionatore, software di gestione, computer e stampante. Il limite di rivelabilità (LoD) ed il limite di quantificazione (LoQ) risultano per il tallio rispettivamente di 0,004 e 0,010 μg/l. L’incertezza estesa al 95% di probabilità, fattore di copertura K=2, calcolata cumulando le componenti di tipo A e di tipo B, risulta di circa il 20% nel range di concentrazioni 0.010-20.0 μg/l (compatibile con i livelli riscontrabili nell’urina della popolazione generale non professionalmente esposta). L’esecuzione di controlli di qualità interni (preparati in laboratorio) in tutte le serie analitiche ed esterni (2 campioni al mese) forniti e gestiti da Occupational and Environmental Laboratory Medicine (OELM) garantisce l’esattezza dei risultati analitici del tallio. I risultati dei controlli esterni di qualità hanno mostrato per il 2014 valori di z-score sempre compresi tra +/-1.

La determinazione del tallio nei capelli sarà effettuata in ICP/MS (stessa strumentazione indicata per l’analisi dell’urina) previa mineralizzazione in forno a microonde (sistema MARS CEM) in presenza di acido nitrico.

**L’analisi dei campioni di capelli** sarà effettuata anche dal laboratorio di Chimica Analitica Strumentale dell’Istituto di Chimica dei Composti Organo Metallici (ICCOM-CNR) di Pisa mediante ICP-MS (Agilent 7700E). I campioni di capelli verranno lavati in una miscela 3 + 1 (v/v) di etere etilico ed acetone, asciugati all’aria, trattati con una soluzione acquosa di EDTA al 5 %, risciacquati con acqua bidistillata ed, infine, asciugati in essiccatore. Il campione di capelli verra’ digerito secondo la procedura riportata in Tabella 1.

|  |  |
| --- | --- |
| Forno MW | Milestone Ethos Start D, FKV (Bergamo, Italy) |
| Peso del campione | 0.2 – 0.3 g |
| Recipienti per  la digestione | Bombe in Teflon capaci di sopportare una pressione interna di 60 bar |
| Trattamento | Pre-digestione con 7 mL di HNO3 concentrato ad alta purezza e 3 mL di H2O2 per 1 h a temperatura ambiente; digestione con rampa di 10 min da temperatura ambiente a 200°C e trattamento di 20 min a 200°C; raffreddamento e diluizione del digerito con acqua ultrapura a 50 mL |
| Capacità | 12 contenitori in un carosello a rotazione continua (uno con il bianco, ) |

**Tabella1**. Metodo di digestione dei capelli.

In mancanza di un campione di riferimento certificato per il tallio nella matrice capelli verra’ preparato un campione “pool” di capelli e su questo verra’ quantificato il tallio mediante ICP-MS con calibrazione esterna, con standard interni multipli e con metodo delle aggiunte standard alla matrice valutando anche la precisione e la riproducibilita’ intra e inter day. Si propone che questo campione “pool” possa essere analizzato mediante ICP-MS anche dal Dipartimento di Scienze della Terra dell’Universita’ di Pisa, oltre che dal Laboratorio di Sanità Pubblica di Siena e dal National Research Council Canada, Measurement Science and Standards Chemical Metrology.

**Risultati attesi**

L’analisi dei livelli di tallio permetterà di ottenere la definizione dei livello di tallio nella popolazione esposta e di valutare i possibili rischi sullo stato di salute. Per i valori urinari i risultati saranno interpretati in accordo con i valori di riferimento elaborati per gli adulti (18-65 anni) dalla Società Italiana Valori di Riferimento (SIVR, Edizione 2011), per adulti e bambini dalla Commissione Tedesca per il Biomonitoraggio Umano (Int J Hyg Environ Health. 2012; 215: 150-8) secondo la seguente tabella:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Parametro | Valore di riferimento | Note |
| 5°-95° percentile | 0.05-0.5 μg/L adulti 18-65 anni | SIVR, 2011. Popolazione adulta non professionalmente esposta |
| RV95\* | 0.6 μg/L nei bambini tra 3 e 14 anni  0.5 μg/L negli adulti di 20-29 anni | Cut-off che individua l’esposizione in una popolazione in un determinato momento |
| HBM I° | 5.0 μg/L | Per valori di una sostanza al di sotto di questo valore in campioni biologici non sono attesi effetti avversi sullo stato di salute |

\* RV95 = 95% dell’intervallo di confidenza del 95° percentile della popolazione nella matrici biologica ottenuta in una popolazione di riferimento

°HBM I = human biomonitoring

Non essendo disponibili score di riferimento per valutare la gravità della contaminazione in soggetti con valori da tallio maggiori a 5.0 μg/L si propone il seguente schema:

|  |  |
| --- | --- |
| Valore tallio, μg/L | Score di gravità |
| 5-100 | Contaminazione lieve |
| 101-200 | Contaminazione moderata |
| 201-300 | Contaminazione media |
| 301-400 | Contaminazione grave |
| 400-500 | Contaminazione molto grave |
| >500 | Intossicazione acuta |

**Costi**:

Personale sanitario di supporto per la raccolta campioni, interviste ed elaborazione dati: **10.000 euro** - **Azienda USL 12**

Rinnovo apparecchiature per trattamento campioni di capelli: **25.000 euro – Azienda USL 7** di Siena Laboratorio di Sanità Pubblica

Analisi capelli CNR: **25-45.000 euro** a seconda della numerosità

**Tempi**: 80 campioni di urine al giorno o 20 campioni di capelli al giorno, in totale alcune settimane

**Attività a medio termine**

1. Studio epidemiologico di coorte retrospettivo dei residenti nel comune di Pietrasanta

2. Determinazione delle concentrazioni di tallio ed altri metalli pesanti (Hg, Cd, Pb e As) nelle matrici animali e vegetali provenienti da alimenti prodotti per autoconsumo a Valdicastello Carducci.

**1. Studio di coorte retrospettivo dei residenti nel comune di Pietrasanta**

**Obiettivo**: descrivere lo **stato di salute generale della popolazione di Pietrasanta** e valutare eventuali rischi sanitari legati all’esposizione a tallio.

**Metodi**: gli step necessari alla realizzazione di questo studio possono essere così sintetizzati:

* ricostruzione della **storia residenziale** della coorte storica dei cittadini dell’intero comune di Pietrasanta, sia relativamente ai movimenti intercomunali che intracomunali, utilizzando gli archivi informatizzati dell’anagrafe comunale. Da precedenti esperienze si ipotizza di poter ricostruire la coorte almeno dall’inizio del 2000 ad oggi.
* **georeferenziazione** degli indirizzi dei residenza dei cittadini mediante utilizzo della banca dati geografica regionale e servizio regionale di normalizzazione degli indirizzi.
* identificazione della popolazione che è stata esposta a tallio, tra cui sicuramente i residenti di Valdicastello, ma anche i residenti di altre aree del territorio comunale (centro storico).
* per ciascun soggetto aggancio ai dati sulle storie residenziali delle informazioni sanitarie derivante dal **patrimonio informativo** di competenza ARS e ASL (decessi, ricoveri, farmaci, aborti spontanei, nati pre-termine e basso-peso)
* **analisi di occorrenza** delle malattie negli esposti a tallio rispetto ai non esposti, mediante modelli statistici adeguati (analisi della regressione di Cox)
* analisi della **distribuzione spaziale delle malattie** per individuare eventuali cluster spaziali, ovvero aggregazioni anomale di malattie nel territorio comunale.

|  |  |
| --- | --- |
| Punti di forza dello studio   * utilizzo di banche dati esistenti, che implicano costi e tempi di realizzazione contenuti * consente di descrivere lo stato di salute generale della popolazione di Pietrasanta * lo studio di coorte retrospettivo consente di evidenziare la presenza di rischi di salute dei residenti di Valdicastello (e/o altre zone del comune) rispetto ai cittadini non esposti * la georeferenziazione sul territorio dei casi di malattia consente di effettuare analisi spaziali molto informative | Limiti dello studio   * la valutazione dell’esposizione si basa sull’informazione sulla residenza e non su misure specifiche * basandosi sulle banche dati amministrative già esistenti, manca una relazione diretta tra esposizione a tallio e specifici effetti sanitari * mancano informazioni individuali su altri fattori di rischio importanti (fumo, alcool, dieta, occupazione), in parte recuperabile con il questionario somministrato al momento della consegna dei campioni di urine e capelli |

Risultati attesi:

L’obiettivo di questa attività è descrivere lo stato di salute dei cittadini che hanno vissuto nel comune di Pietrasanta, in riferimento a condizioni generali di salute desumibili dalla banche dati esistenti. In questa fase saranno pertanto valutati numerosi condizioni di malattia, anche di entità rilevante (ricoveri, decessi), non necessariamente correlabili all’esposizione al tallio. Inoltre la localizzazione degli indirizzi di residenza delle persone consentirà di evidenziare eventuali rischi legati alla residenza in quelle frazioni e aree del territorio comunale considerate a rischio per esposizione a tallio.

**2. Determinazione delle concentrazioni di tallio ed altri metalli pesanti (Hg, Cd, Pb e As) nelle matrici animali e vegetali provenienti da alimenti prodotti per autoconsumo a Valdicastello Carducci**

Il tallio tende a bioaccumularsi, cioè aumenta rispetto alla sua concentrazione nell’ambiente.

Per tale motivo, allo scopo di valutare il livello di esposizione a tale metallo attraverso la catena alimentare, saranno effettuati campioni di matrici vegetali ed animali su un campione statisticamente rappresentativo di orti ed allevamenti per autoconsumo dell’abitato di Valdicastello Carducci. Ogni luogo di prelievo sarà georeferenziato. Per ogni campione sarà compilata, a cura del personale del Dipartimento di Prevenzione dell’Azienda USL 12, una scheda informativa sulle modalità di coltivazione (provenienza sementi, piantine, acqua utilizzata ecc..) e di allevamento (alimenti utilizzati, caratteristica dell’acqua di abbeverata, farmaci utilizzati ecc..)

I campioni saranno analizzati da:

* Laboratorio di Sanità Pubblica Area Vasta Centro – matrici vegetali
* Istituto Zooprofilattico Lazio e Toscana – matrici animali

I metodi di campionamento saranno conformi alle norme comunitarie

Entrambe le strutture laboratoristiche sono accreditate conformemente alla norma EN ISO/IEC 17025; le analisi saranno effettuate mediante prove accreditate.

**Ruoli**

Attività 1 - Studio epidemiologico di coorte retrospettivo:

ARS e ASL: costruzione database

ARS: georeferenziazione, analisi statistica e analisi spaziale

Attività 2 - Monitoraggio matrici animali e vegetali:

Azienda USL 12 – UFC Sicurezza Alimentare e Sanità Veterinaria per il campionamento delle matrici animali e vegetali

Rete dei Laboratori di Sanità Pubblica per l’analisi delle matrici biologiche e delle matrici vegetali

Istituto Zooprofilattico Lazio e Toscana – per l’analisi delle matrici animali

**Costi**:

Personale per analisi statistiche e spaziali: **30.000 euro - ARS**

Attrezzature e materiali di campionamento matrici vegetali ed animali: **3.000 euro Azienda USL 12**

**Tempi**: 6-9 mesi

**Attività a lungo termine**

1. Studio di popolazione con approccio di coorte prospettico dei residenti della frazione di Valdicastello

2. Prosecuzione nel tempo della determinazione delle concentrazioni di tallio ed altri metalli pesanti (Hg – As) nelle matrici animali e vegetali provenienti da alimenti prodotti per autoconsumo a Valdicastello Carducci

**1. Studio di popolazione con approccio di coorte prospettico dei residenti della frazione di Valdicastello**

**Obiettivo**: valutare lo stato di salute e le caratteristiche individuali dei cittadini di Valdicastello, con particolare attenzione ai sottogruppi di popolazione più suscettibili, come le **donne in gravidanza**, i **bambini** e gli **adolescenti**. Valutare l’associazione tra livelli di tallio nelle matrici umane ed effetti sanitari.

**Metodi**: verrà arruolata la **coorte di residenti attuali** di Valdicastello. Si prevede la somministrazione di un questionario dettagliato su informazioni personali, occupazione, abitudini e stili di vita (fumo, alcol etc), uso e consumo di acqua e prodotti locali, abitudini alimentari, consumo di farmaci e stato di salute generale, domande su sintomatologia tipica di esposizione a tallio (alterazioni cutanee, perdita di capelli, unghie, disfunzioni gastrointestinali e cavità orale, sintomi neurologici). Attraverso la collaborazione con i medici di base e pediatri di famiglia potranno realizzati bilanci di salute ad hoc per valutare la presenza di eventuali problemi sanitari connessi all’intossicazione cronica da tallio.

Alla luce dei risultati delle analisi precedenti (monitoraggio biologico e studio di coorte retrospettivo) e attraverso la collaborazione con i medici di base, pediatri di famiglia e specialisti del territorio, sarà valutata l’opportunità di effettuare approfondimenti specifici:

- nella coorte di bambini e adolescenti potranno essere realizzati **bilanci di salute** ad hoc per valutare la presenza di eventuali problemi sanitari connessi all’intossicazione cronica da tallio (effetti neurologici e comportamentali**);**

- per le **donne in gravidanza** si ipotizza un follow-up a breve termine per la valutazione degli esiti della gravidanza (durata della gravidanza, peso e lunghezza neonatale, circonferenza cranica, presenza di evidenti malformazioni fenotipiche), anche ricorrendo ai dati già a disponibili mediante i certificati di assistenza al parto. La crescita fetale potrà essere monitorata mediante l’ecografia fetale nei controlli previsti dai protocolli regionali. Sarà inoltre effettuato un piccolo campionamento per la determinazione del tallio nel latte materno. le cui analisi saranno effettuate dal Laboratorio di Siena.

- valutazione dei possibili effetti legati alla **tossicità riproduttiva del tallio nei maschi** (test di fertilità)

- per la popolazione generale sono ipotizzabili visite mediche per la valutazione dello stato di salute ed eventuale utilizzo di **biomarcatori di effetto organo-specifici**.

.

La bassa numerosità della popolazione nei sottogruppi dei bambini e delle donne in gravidanza consentirà di condurre solo analisi descrittive della situazione epidemiologica.

La valutazione dell’esposizione della popolazione potrà essere integrata anche dalla disponibilità di informazioni su localizzazione ed utilizzo di vecchie fontane, pozzi e sorgenti più o meno controllate.

La disponibilità delle informazioni sui livelli di tallio nelle urine e nei capelli e di tutte le altre informazioni individuali recuperabili al momento dell’arruolamento della coorte consentiranno la conduzione di analisi statistiche specifiche per stimare le possibili relazioni causa-effetto tra esposizione a tallio ed effetti sulla salute.

|  |  |
| --- | --- |
| Punti di forza dello studio   * possibilità di focus specifici su sottogruppi più vulnerabili * possibilità di controllare per altri fattori di rischio importanti * ruolo centrale dei medici di base e pediatri operanti nel territorio | Limiti dello studio   * tempi, risorse e costi sostenuti * possibili perdite di soggetti al follow-up |

**2. Monitoraggio di matrici animali e vegetali**

Proseguiranno le attività di campionamento su matrici vegetali ed animali su un campione statisticamente rappresentativo di orti ed allevamenti per autoconsumo dell’abitato di Valdicastello Carducci.

I campioni saranno analizzati da:

* Laboratorio di Sanità Pubblica Area Vasta Centro – matrici vegetali
* Istituto Zooprofilattico Lazio e Toscana – matrici animali

I metodi di campionamento saranno conformi alle norme comunitarie

Entrambe le strutture laboratoristiche sono accreditate conformemente alla norma EN ISO/IEC 17025; le analisi saranno effettuate mediante prove accreditate.

**Costi**: **250/300.000** euro per medico epidemiologo a tempo pieno (1-2 anni), rimborsi medici e specialisti

N.B.: in questa fase la stima dei costi è molto arbitraria ed è suscettibile di modifiche in seguito a confronto con i medici di base, pediatri e specialisti

**Tempi**: 1-1.5 anni per arruolamento