

ALLEGATO TECNICO ALLA CONVENZIONE ISS-APSS

IMPATTO DELL'ESPOSIZIONE AMBIENTALE NELLA PROVINCIA DI TRENTO: COORTE DI ADULTI RESIDENTI (60-70 ANNI)

Istituzioni coinvolte:

Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari (APSS):

- Dipartimento di Prevenzione
 - Direzione
 - U.O. Igiene e sanità pubblica
 - U.O. Prevenzione e sicurezza negli ambienti di lavoro
 - Laboratorio di sanità pubblica
- Servizio epidemiologia clinica e valutativa
- Servizio Territoriale
- Servizio Ospedaliero Provinciale

Provincia Autonoma di Trento:

- Dipartimento salute e solidarietà sociale
- Agenzia Provinciale per la Protezione dell'Ambiente (APPA)
 - Settore Laboratorio
 - Settore Tecnico per la Tutela dell'Ambiente – U.O. Aria, agenti fisici e bonifiche
- Servizio Agricoltura

Istituto Superiore di Sanità:

- Dipartimento Ambiente e Salute
- Centro per la Prevenzione delle malattie e promozione della salute

Comitato Tecnico-Scientifico (CTS):

- Fabio Barbone, Direttore scientifico IRCCS Burlo Garofolo di Trieste
- Ivo Iavicoli, Dipartimento di Sanità Pubblica, Università di Napoli Federico II

Responsabili scientifici

Direttore Dipartimento di Prevenzione (per APSS)

Alessandro Alimonti (per ISS)

Gruppo di coordinamento (UUOO leaders)

Gruppo di lavoro (tutti)

Premessa

Questo studio si inserisce nelle attività previste dal Piano per la salute del Trentino 2015-2025. In particolare il macro-obiettivo 2 ("Un contesto di vita e di lavoro favorevole alla salute") prevede un ambito di intervento per l'implementazione definito "Ambiente e salute". In questo specifico ambito "la promozione della salute ambientale comprende la valutazione e il controllo di tutti i fattori dell'ambiente esterno, di natura fisica, chimica e biologica, che possono influenzare la salute". Inoltre il macro-obiettivo 3 ("Un sistema socio-sanitario con la persona al centro") prevede un ambito di intervento per l'implementazione definito "Ricerca ed innovazione". In questo specifico ambito si sottolinea che la ricerca ed innovazione "per essere efficace e produttiva deve essere pervasiva. Deve avere la capacità di incidere trasversalmente e di coinvolgere tutti i professionisti, nella logica di migliorarne le competenze a beneficio delle persone che si rivolgono ai servizi".

Con questa premessa è doveroso trattare, in una prospettiva di sanità pubblica, il tema dell'esposizione a prodotti fitosanitari per i residenti della provincia di Trento.

All'interno della definizione di "prodotti fitosanitari" rientrano formulati contenenti principi attivi tra loro assai eterogenei, che trovano impiego in agricoltura e, in misura inferiore, per utilizzi domestici e hobbistici. In Provincia di Trento, per vocazione economica, il ricorso a questi prodotti è elevato benché, nel corso degli anni, il costante miglioramento della loro gestione abbia comportato, qui come altrove, rilevanti progressi verso un uso più sostenibile per l'ambiente e per la salute e maggiore consapevolezza rispetto ai possibili impatti derivanti da un utilizzo non adeguato.

I rischi per l'uomo correlati all'utilizzo dei prodotti fitosanitari sono stati oggetto di approfondimento da parte della comunità scientifica, in primo luogo per gli effetti sulla salute degli utilizzatori, essendo questa la categoria potenzialmente più esposta; negli ultimi anni, inoltre, si è apprezzato un aumentato interesse per gli eventuali esiti sulla salute della popolazione generale, potenzialmente coinvolta per la diffusione nell'ambiente che deriva dall'uso di questi prodotti.

Se da un lato gli effetti acuti di questi prodotti (intossicazioni) sono eventi noti, descritti dettagliatamente e individuabili in modo relativamente agevole, dall'altro gli effetti a lungo termine sono di valutazione più difficile per varie ragioni; per altro, sono proprio questi esiti a destare le maggiori preoccupazioni nella popolazione, oltre che interesse da parte dei mass-media.

Tra gli effetti sulla salute attualmente più indagati vi sono le malattie croniche degenerative, tra cui i tumori, e altre malattie, tra cui quelle a carico del sistema nervoso e il sistema endocrino. Per quanto riguarda gli effetti cancerogenetici, gli studi effettuati sulla popolazione generale presenti in letteratura forniscono in genere risultati contrastanti, sia per le difficoltà nel controllo dei fattori di confondimento e nel definire in modo riproducibile criteri e livelli espositivi, sia per la necessità di

prevedere periodi di osservazione molto lunghi, specie per quanto concerne gli studi prospettici. La IARC, per altro, ha incluso alcune di queste molecole nelle liste di cancerogeni, certi e probabili. Recenti acquisizioni scientifiche, descritte in letteratura, segnalano inoltre un maggiore rischio di sviluppo di malattie neurodegenerative nell'adulto, in conseguenza di esposizioni di lunga durata.

In Provincia di Trento, l'attività di sorveglianza epidemiologica, garantita dall'Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari, non ha evidenziato particolari situazioni di rischio rispetto all'andamento temporale e spaziale dello stato di salute della popolazione trentina. Se i dati riguardanti le intossicazioni acute da fitosanitari descrivono un fenomeno assolutamente contenuto a livello provinciale, rispetto alle patologie neoplastiche i dati disponibili evidenziano valori provinciali che si allineano con la tendenza riscontrabile nel resto d'Italia e di altri Paesi simili sotto il profilo sociale ed economico. In merito alla distribuzione territoriale dell'incidenza dei tumori (report periodici dell'aggiornamento del Registro Tumori di popolazione e mappature territoriali nell'ambito del progetto Cancer Atlas) i dati non dimostrano (per gli ambiti territoriali utilizzati: comprensorio, distretto sanitario e comunità di valle) sicuri aggregati territoriali, riferibili alla Valle di Non, comprensorio caratterizzato da un'importante vocazione frutticola e conseguente utilizzo di prodotti fitosanitari a scopo produttivo.

L'ultimo report reso disponibile fornisce l'aggiornamento dei dati d'incidenza dei tumori in provincia di Trento per il periodo 2009-2012, confermando l'incremento del numero di nuovi casi di tumori in entrambi i generi, spiegabile, tra le altre cose, con l'invecchiamento della popolazione trentina e l'espansione dei programmi di screening: tale fenomeno è rilevabile anche nel resto del Paese ed è per altro coerente con quanto osservabile in tutte le realtà simili sotto il profilo socio-economico. Per altro, correggendo il dato riguardante i nuovi casi di tumore nella popolazione residente per la struttura di età della stessa (Tasso di incidenza standardizzato), si evidenzia un andamento del tasso di incidenza della patologia neoplastica in diminuzione, in modo più sensibile nei maschi, in analogia al dato nazionale. I dati di mortalità registrano una stabilità del numero assoluto di decessi, mentre si rileva una diminuzione del tasso di mortalità standardizzato, più marcato nei maschi rispetto alle femmine. Il trend è confermato anche dal dato nazionale.

Oltre all'ordinaria attività di sorveglianza epidemiologica, il tema fitosanitari-salute è stato anche oggetto di approfondimenti specifici, in particolar modo negli ultimi 10 anni. L'obiettivo comune dei vari progetti è stato quello di verificare l'esistenza di un rischio aggiuntivo per lo sviluppo di malattie nelle popolazioni residenti in comprensori a vocazione frutticola, come ad esempio la Valle di Non.

Al fine di approfondire l'esistenza di una possibile pressione ambientale, riferibile all'immissione nell'ambiente di prodotto fitosanitari, sull'insorgenza di neoplasie, malattie neurodegenerative (Alzheimer e Parkinson) della popolazione trentina, l'Azienda Provinciale per i Servizi sanitari (APSS) ha inoltre predisposto ed effettuato uno specifico studio epidemiologico di tipo ecologico sulla popolazione residente nella Comunità della Valle di Non, distinguendo due aree a diversa vocazione agricola,

coincidenti all'incirca alla Alta e Bassa Valle di Non. Pur considerata l'incertezza che caratterizza questo tipo di studi, la ricerca ha fatto rilevare l'assenza di differenze significative nella salute della popolazione nelle due aree; così pure non si rilevano diversità tra le due aree esaminate e il resto della Provincia.

Particolare importanza riveste, inoltre, il Progetto *Cancer Atlas*, basato sull'utilizzo di una specifica piattaforma in cui convergono informazioni per 36.000 casi per tutte le sedi tumorali relativi al periodo 1995-2006, con georeferenziazione dei casi incidenti. Avvalendosi di tale strumento è stato condotto un approfondimento che va considerato la prosecuzione dello studio sopra citato sugli effetti sulla salute connessi a esposizione a fitosanitari condotto in Val di Non. Il valore aggiunto è quello di poter analizzare e valutare le eventuali associazioni tra la distribuzione della patologia tumorale e lo status socio-economico della popolazione residente, e quello di poter ricostruire i suoi spostamenti sul territorio trentino. Anche questo studio ha confermato l'assenza di elementi di preoccupazione, sotto il profilo epidemiologico, per il Comprensorio esaminato.

L' Azienda Sanitaria ha inoltre condotto un'indagine conoscitiva sull'esposizione delle persone residenti in prossimità di aree a forte vocazione agricola, attraverso la ricerca di fitosanitari all'interno delle abitazioni e dei metaboliti di questi nelle urine. Pur tenendo conto dei limiti derivanti dall'esigua numerosità del campione, l'indagine testimonia la possibilità di una esposizione aggiuntiva nelle persone che risiedono in vicinanza delle aree agricole in coincidenza dei trattamenti con fitosanitari, pur manifestando livelli di metaboliti urinari comunque esigui e non dissimili da quelli mediamente riscontrabili nella popolazione generale esposta per motivi non professionali.

Sia pure in assenza di elementi di particolare preoccupazione per la salute in relazione all'uso di fitosanitari, l'attuale studio, sostenuto dalla Provincia Autonoma di Trento (P.A.T.), con il contributo di tutti i settori interessati della stessa P.A.T. e dall'APSS ed il supporto scientifico dell' Istituto Superiore di Sanità (I.S.S.), mira a valutare in maniera ancora più approfondita ed integrata gli aspetti relativi alla possibilità che l'utilizzo dei prodotti fitosanitari possa tradursi in esposizione della popolazione e, nel caso, se tale esposizione possa determinare mutamenti sullo stato di salute della stessa in termini di patologie a lungo termine, con particolare riguardo per gli aspetti riguardanti le malattie neurodegenerative e le patologie di tipo dismetabolico.

Si tratta di uno studio molto articolato, che valuta gli adulti e che prevede diversi criteri di stima dell'esposizione (misure ambientali, misure e test personali) e di valutazione dei possibili effetti sulla salute.

Tale studio può essere considerato tra i più avanzati realizzati negli ultimi anni rispetto al tema dei fitofarmaci ed è frutto della convergenza di una serie di fattori favorevoli.

- 1) La volontà del decisore di indagare il problema e di prevedere contestualmente un adeguato sostegno finanziario
- 2) Il coinvolgimento di tutte le parti interessate, territoriali e nazionali

- 3) L'integrazione tra l'area ambientale, l'area di esposizione umana e quella sanitaria;
- 4) L'ampio coinvolgimento di tutti i settori di interesse dell'APSS
- 5) Le competenze scientifiche rappresentate dall'ISS
- 6) La possibilità di poter seguire nel tempo la coorte selezionata per valutare i possibili effetti sulla salute di esposizioni croniche anche a basse dosi.

La sorveglianza dell'andamento della patologia oncologica in provincia di Trento continuerà ad essere garantita dall'attività del Registro Tumori di Popolazione e dallo sviluppo del sistema di georeferenziazione, attraverso il progetto Cancer Atlas.

Razionale

I composti organo-fosforici (OP), comprensivi dei loro prodotti di seconda generazione, vale a dire gli organo-fosforo-tionati (OPT), sono una delle categorie di insetticidi di uso più frequente e l'esposizione a tali composti può rappresentare un problema per la salute della popolazione. A parte casi di intossicazioni acute per le quali i ricoveri ospedalieri legati a questi composti rappresenta fino all'80% (London 2005), i rischi maggiori dipendono da esposizioni a lungo termine a dosi basse. Questi composti hanno attività neurotossica, agendo attraverso l'inibizione della acetilcolinesterasi plasmatica e cerebrale, causando un accumulo di acetilcolina nelle sinapsi con conseguente sovra-stimolazione dei recettori postsinaptici. I dati di letteratura supportano l'ipotesi che esposizione a insetticidi OPT siano un fattore di rischio per l'insorgenza di malattie neurodegenerative, in particolar modo del Parkinson (Pezzoli 2013).

Nell'agricoltura trentina l'ampio utilizzo di OP e carbammati (CB), che hanno un meccanismo di azione simile, suggeriscono la necessità di approfondire modalità e intensità dell'esposizione, primariamente su soggetti esposti non professionalmente. Nei processi di valutazione per l'autorizzazione alla commercializzazione dei prodotti fitosanitari sono presi in considerazione molti aspetti relativi alla protezione della salute e dell'ambiente e specifiche GAP (*Good Agricultural Practice*) sono indicate per la loro sicurezza d'uso; il rispetto di queste *buone pratiche agricole* è di garanzia per quanto riguarda l'esposizione professionale e di quella della popolazione generale (esposta ai pesticidi essenzialmente attraverso i *residui* negli alimenti), per quanto riguarda l'inquinamento delle acque sotterranee che rappresentano la fonte primaria di approvvigionamento per l'acqua potabile, e la protezione dell'ambiente. Tuttavia alcuni aspetti non sono altrettanto dettagliatamente analizzati, tra cui il problema di esposizione della popolazione residente, sia attraverso l'ambiente esterno che quello *indoor*.

Allo scopo di valutare i possibili rischi per la salute della popolazione residente esposta ai suddetti composti, con particolare attenzione alle sostanze utilizzate nella coltivazione di mele, si descrive uno studio di monitoraggio ambientale, biologico e sanitario su una coorte di soggetti adulti.

Ci sono evidenze che l'eziologia di molte malattie neurodegenerative come l'Alzheimer (AD), la malattia di Parkinson (PD) e la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) sia associata a esposizioni a lungo termine, anche a basse dosi, a pesticidi quali OP e CB

(Baltazar 2014). L'azione neurodegenerativa si può spiegare non solo in seguito all'attività colinergica, propria di questa classe di composti (Chen 2012) ma anche a causa di alterazioni nella neurotrasmissione e nelle dinamiche mitocondriali simili a quelle già proposte per la patogenesi di SLA e AD (Reddy 2012). Sono noti i rischi per la salute e le implicazioni per le malattie neurodegenerative derivanti anche da esposizione a metalli neurotossici come arsenico (As), cadmio (Cd), mercurio (Hg), manganese (Mn), piombo (Pb) della loro capacità di accumularsi in organi target; verranno qui presi in considerazione come possibili fattori insieme all'effetto dei pesticidi. Sarà preso in considerazione, come fattore protettivo almeno per AD e PD, anche il ruolo del Selenio, oltre al rame (Cu) perché utilizzato in alcuni tipi di pesticidi. Per la patogenesi dell'AD lo stress ossidativo è una componente centrale, con i ROS che agiscono in maniera dannosa sulle funzioni mitocondriali, le trasmissioni sinaptiche e il trasporto assonale, oltre ad essere stimolatori dell'infiammazione. Diversi studi sull'uomo hanno riportato associazioni tra declino cognitivo e livelli di selenio (Se): la concentrazione di Se eritrocitario negli anziani con lieve handicap cognitivo (MCI) e/o AD diminuisce al diminuire delle funzioni cognitive.

Nel Parkinson i neuroni dopaminergici sono particolarmente vulnerabili al danno ossidativo, probabilmente a causa della loro propensione ad accumulare ferro con l'età. In questo modo lo stress ossidativo presenta un ruolo centrale anche nella patogenesi di questa malattia; anche se è importante il ruolo giocato dall'alterazione dell'omeostasi del rame, diventa anche qui fondamentale la funzione dell'attività antiossidante delle seleno-proteine.

Per quanto riguarda la SLA, diversi studi indicano un legame tra fattori genetici e ambientali. È stata osservata una relazione tra il rischio di SLA e la concentrazione di selenito (SeO_3^{2-}) nel fluido cerebro spinale di pazienti con diagnosi recente di SLA, come pure un'associazione inversa con il Se in forma organica (seleno-proteine) (Vinceti 2013). A causa del diverso ruolo giocato nella SLA dal Se organico e inorganico, diventa importante distinguere tra le diverse forme di Se.

I composti oggetto dello studio sono stati selezionati sulla base della loro frequenza e quantità di uso. Saranno considerate, quindi, le esposizioni a: *Clorpyrifos (etile e metile)*, *Fosmet*, *Tiacloprid*, *Captan*, *Fluazinam*, *Buprofezin*, *Imidacloprid* e *Boscalid*¹, *Propineb* e *Metiram*² oltre ai metalli sopracitati, compresa la *speciazione di mercurio e arsenico*.

Comportamenti e stili di vita quali gli effetti del fumo, l'esposizione a fumo passivo, etc., devono anche essere indagati come fattori confondenti.

Obiettivo generale

Lo studio longitudinale proposto ha come obiettivo la valutazione della possibile associazione tra l'esposizione a tossine ambientali e l'insorgenza di condizioni morbose croniche quali le malattie dismetaboliche (diabete, obesità, sindrome metabolica, danni renali), cardiovascolari, respiratorie, neurodegenerative (Demenza, malattia di Parkinson e Mild Cognitive Impairment-MCI) e neoplastiche, in una popolazione adulta

¹ Imidacloprid e Boscalid, limitatamente all'esposizione ambientale;

² Propineb e Metiram, limitatamente alla dose interna (come metaboliti urinari).

(60-70 anni) residente nella PAT. Oltre il punto al tempo zero sono previsti 2 follow-up a 3 e 5 anni.

La popolazione adulta verrà caratterizzata nel suo profilo di salute e di malattia. Quindi l'eventuale presenza di patologie non neurologiche nell'ambito cardiovascolare, renale, (dis)metabolico, polmonare e neoplastiche verranno documentate e segnalate all' Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari

Obiettivi specifici

- 1) Stima dell'esposizione attraverso la valutazione dello stato di contaminazione ambientale su dati recenti dell'APPA e/o su misure ambientali *outdoor-indoor* specifiche.
- 2) Definizione dell'esposizione interna mediante la quantificazione di specifici *biomarkers* in differenti matrici biologiche.
- 3) Valutazione dei fattori di suscettibilità individuale mediante misura di marcatori dell'alterazione del metabolismo di alcuni contaminanti in esame.
- 4) Valutazione del contributo ambientale e degli stili di vita nella manifestazione degli effetti cronici sulla salute (aspetti neurologici e di altre condizioni morbose malattie croniche e tumorali).
- 5) Adeguamento tecnologico e formativo in maniera da mettere in grado le istituzioni territoriali a continuare nel monitoraggio della popolazione per i contaminanti in esame.
- 6) Follow-up a 3 e 5 anni; aggiornamento del questionario.

Metodo

1. Caratterizzazione ambientale e scenari di esposizione

A supporto di uno studio sui rischi per la salute della popolazione adulta esposta, per via inalatoria, a prodotti fitosanitari utilizzati nella coltivazione di meleti, si descrive il protocollo di indagine per la valutazione dei livelli di contaminazione dell'aria, in ambienti *indoor* ed *outdoor*.

Lo studio in particolare è rivolto al campionamento di materiale particellare sospeso PM₁₀, e sedimentabile in postazioni idonee per la successiva attività di valutazione dell'esposizione. Sui campioni prelevati sarà condotta l'analisi chimica per la determinazione delle concentrazioni delle sostanze di interesse (Settimo 2016).

A seguito dei sopralluoghi effettuati nell'area di interesse, delle riunioni avute con gli enti del territorio utili ad acquisire le informazioni relative alle metodologie di utilizzo delle sostanze di interesse sul territorio, valutata inoltre la distribuzione della popolazione sul territorio, lo studio effettuerà:

- l'**identificazione** delle aree *indoor/outdoor* per il monitoraggio della qualità dell'aria in relazione alle sostanze di interesse, in relazione alla tipologia di popolazione che frequenta gli ambienti sottoposti a monitoraggio ed alla individuazione di aree del territorio a differenti livelli di esposizione;

- **definizione di protocolli** operativi da utilizzare per il rilevamento dell'aria *indoor* ed *outdoor* (es. norme UNI, EN, ISO e GdS ISS);
- **valutazione dell'esposizione inalatoria agli inquinanti *indoor* ed *outdoor*** di interesse, sulla base di scenari di esposizione riferiti alla popolazione generale.

Attività di campionamento

Sulla base delle informazioni ricevute durante le riunioni effettuate con gli Enti territoriali e dei sopralluoghi svolti nelle aree interessate dallo studio si propone di effettuare un'indagine conoscitiva sul livello di concentrazione dei prodotti fitosanitari selezionati, in aria *indoor* e *outdoor*. A tal fine è stato pianificato un monitoraggio dell'aria *outdoor* in siti collocati nelle aree urbanizzate della Val di Non e della zona di Aldeno, secondo una distribuzione spaziale della strumentazione che consenta di effettuare stime di esposizione alle sostanze ricercate, secondo la distribuzione della popolazione sul territorio. Ai fini di una stima corretta dell'esposizione si rende necessario eseguire, in contemporanea alle misure *outdoor*, prelievi di PM10 in ambienti *indoor* collocati in aree prossime a quelle sottoposte a misura *outdoor*, per poter ricostruire, secondo idonei scenari di esposizione, l'esposizione totale della popolazione tenendo conto della frequentazione dei diversi ambienti.

Conseguentemente, il piano prevede di sottoporre a monitoraggio **7 siti rappresentativi di aree urbanizzate** secondo un disegno spaziale che tenga conto sia delle aree dove risiede la popolazione sia di dove la stessa popolazione svolge le principali attività quotidiane. In parallelo, accanto ad alcuni siti di monitoraggio *outdoor*, saranno campionati anche 5 ambienti *indoor*. Nella zona della Val di Sole, sarà collocato lo strumento dedicato al monitoraggio di confronto ("bianco") con un'area avente le stesse caratteristiche di quella in studio ma non esposta all'utilizzo delle sostanze indagate.

Sulla base quindi di quanto sopra descritto e dopo l'ultimo sopralluogo condotto nelle aree interessate ad aprile 2018, si è convenuto di studiare aree abitate a diversa esposizione rispetto ai trattamenti effettuati sulle coltivazioni di mele, collocando gli strumenti di prelievo delle polveri PM₁₀ in ambiente *indoor* e *outdoor*, successivamente sottoposte ad analisi chimica, nelle aree sotto descritte:

4 (IN+OUT) aree a Tuenno: 1 *outdoor* zona centro abitato + 1 *indoor* stessa area, 1 *outdoor* zona palestra + 1 *indoor* stessa area, 1 *outdoor* magazzino mele zona nord + 1 *indoor* in una delle residenze vicine, 1 *outdoor* zona sud di Tuenno + 1 *indoor* nella stessa zona

1 (IN+OUT) area a Cles: 1 *outdoor* centro abitato + 1 *indoor*

1 (OUT) area in Val di Sole: 1 strumento solo per prelievo *outdoor*

1 (OUT) area ad Aldeno: 1 *outdoor* centro abitato

Per la conferma dei posizionamenti specifici si attende un riscontro dall'APPA che si è fatta carico di attivare un contatto con gli amministratori dei comuni interessati dal monitoraggio al fine di poter definire una fattiva collaborazione.

Sarà, inoltre, predisposta una rete deposimetrica (n. 2), in postazioni concordate con i colleghi dell'APSS e APPA, per la raccolta del materiale particellare sedimentabile; si propone di effettuare un'acquisizione mensile delle polveri

sedimentabili utilizzando campionatori di tipo *bulk*. In ognuno dei siti di monitoraggio verrà effettuato il campionamento sia *indoor* che *outdoor* del materiale particolato sospeso PM₁₀.

Tutta l'attività di campionamento non potrà essere inferiore ad un anno, poiché dovranno essere studiate le variabilità stagionali della dispersione in aria delle sostanze utilizzate in agricoltura, anche in periodi lontani dai momenti di specifico utilizzo dei fitosanitari. Per tale motivo sulla base delle informazioni acquisite *in loco*, e sulle peculiarità anche meteorologiche del periodo di indagine, i campioni di PM₁₀ potranno essere analizzati separatamente, nei periodi di trattamento, o utilizzando la tecnica del *pooling*, nei periodi più lontani dai trattamenti per verificare la curva di decadimento delle concentrazioni delle sostanze indagate.

Andrà inoltre valutata la necessità di installare una stazione meteorologica che rilevi i parametri meteo della zona utili a valutare le dispersioni delle sostanze disperse nell'area per i trattamenti eseguiti sulle coltivazioni dei frutteti.

Valutazione dell'esposizione

La conoscenza delle concentrazioni in aria delle sostanze di interesse consente di effettuare una valutazione dell'esposizione della popolazione tramite l'applicazione di scenari di esposizione disegnati sulla base delle abitudini e degli stili di vita, dei comportamenti individuali quali i tempi trascorsi in ambienti esterni o interni, il tipo e la durata delle attività giornalmente condotte. Sarà quindi necessario avvalersi di un questionario che verrà somministrato ad un campione rappresentativo di popolazione per ricavare le informazioni (Soggiu 2006). Infatti, questi dati, opportunamente elaborati ed interpretati, consentiranno di disegnare i *pattern* di attività e i conseguenti scenari di esposizione, inclusa la loro variabilità interindividuale, tramite i quali sarà possibile stimare, l'esposizione per via inalatoria delle sostanze ricercate tramite le attività di campionamento (Soggiu 2011).

Acquisizione delle informazioni del territorio

Il progetto prevede una stretta relazione con gli enti del territorio il cui supporto riveste un ruolo fondamentale per la riuscita del progetto.

In questa prima fase, sarà quindi necessario acquisire dagli enti del territorio una serie di informazioni di base, che al momento sono identificate in:

- dati meteorologici acquisiti nella zona della Val di Non dalla Fondazione E. Mach di San Michele all'Adige ³.
- dati di cartografia tematica dell'area, in particolare con la descrizione dell'uso del suolo, con particolare attenzione alla distribuzione dei frutteti e delle aree di residenza della popolazione, collocazione di edifici sensibili quali scuole ed ospedali, luoghi di aggregazione e ricreativi.
- Analisi dell'uso delle sostanze disperse nelle aree di coltivazione, loro frequenza e quantità.

³ Sulla base dell'analisi condotta dei dati meteo della Fondazione E. Mach, si valuterà la necessità di dover disporre di dati meteorologici di maggior dettaglio rispetto a quelli attualmente raccolti, tramite l'installazione di una stazione dedicata o l'implementazione della stazione meteo già esistente.

- Dati di popolazione a livello censuario, distinti per età, sesso.

2. Monitoraggio biologico

Il monitoraggio biologico prevede il reclutamento di circa 500 persone (stratificate per sesso), prive delle condizioni di interesse alla baseline, 250 di età compresa tra i 60 ed i 64 anni e 250 tra i 65 e 70 anni, arruolati in aree a esposizione potenziale (Val di Non e Aldeno, residenza in vicinanza di coltivazioni); sarà contemporaneamente studiato un idoneo gruppo di controllo residente in altre aree della provincia di Trento (250 persone). L'arruolamento di soggetti comporta la raccolta di informazioni attraverso somministrazione di un questionario, al tempo 0 e nelle valutazioni successive (3 e 5 anni), per la raccolta dei dati demografici, anamnesi, storia familiare sulle patologie in studio, dati socio-economici, e relativi alla dieta (tipo di dieta, consumo di specifici alimenti), storia occupazionale e ambientale, oltre agli stili di vita (comportamenti specifici, utilizzo di prodotti, esercizio fisico, uso di *piercing*, presenza di amalgami e/o otturazioni dentarie, fumo passivo, etc.), al fine di controllare eventuali fattori confondenti.

La valutazione del livello di esposizione interno che sarà considerato come la misura surrogata di esposizioni precedenti (oltre alle informazioni desumibili dai questionari) verrà effettuato attraverso la misura di specifici biomarcatori di esposizione nelle matrici di urina, sangue, capelli, saliva o tampone buccale. La tabella sottostante riporta i metaboliti dei composti parentali utilizzati e i metalli nonché le relative matrici:

<i>Analita</i>	<i>Metabolita</i>	<i>Matrice</i>
Clorpyrifos (etile e metile)	TCP	urina
Fosmet	DAP	urina
Propineb	PTU	urina
Metiram	ETU	urina
Tiacloprid	6-CNA	urina
Captan	3-OH-THPI	urina
Fluazinam	AMPA e DAPA	urina
Buprofezin	-	urina
As	-	urina
Cd	-	urina
Cu	-	urina
Hg		urina- capelli
Mn	-	urina- capelli
Pb	-	sangue
Zn	-	urina
Se	-	urina

TCP: Tricloropiridinolo; DAP: Dialchilfosfati; PTU: Propilene tiourea; ETU: Etilene tiourea; 6-CAN: acido 6-cloronicotinico; 3-OH-THPI: 3-idrossi 4,5 cicloesene 1,2 dicarboximide;

AMPA: 2-(6-amino-3-cloro-a,a,a-trifluoro-2-nitro-p-toluidina)-3-cloro-5-(trifluorometile) piridina; DAPA: 3-(cloro-2-(2,6-diamino-3-cloro-a,a,a-trifluoro-p-toluidina)-5-(trifluorometile) piridina).

Attività di campionamento

Il disegno prevede n. 2 prelievi di urina durante il periodo di trattamento dei meleti e prima dei trattamenti, ed un solo prelievo di sangue e di saliva (o tampone buccale). Verrà effettuata la determinazione dei metaboliti delle sostanze considerate e il profilo dei metalli (As, Cd, Cu, Hg, Mn, Pb, Zn) e l'identificazione di biomarcatori di suscettibilità mediante individuazione dell'alterazione degli enzimi coinvolti nel metabolismo degli OP/OPT. La determinazione di metalli quali Hg e Mn, verrà effettuata anche nei capelli, matrice maggiormente idonea a definire l'esposizione a tali contaminanti. Aliquote di urina e sangue, infine, verranno raccolti per allestimento di una biobanca.

Valutazione della suscettibilità individuale

Tale valutazione sarà effettuata attraverso la misura con tecniche molecolari (RT-PCR, RFLP) di forme polimorfiche della PON1, che determinano differenze interindividuali nella detossificazione degli OPT. Il polimorfismo PON1 Q192R, che determina una sostituzione di un aminoacido nella posizione 192 da glutamina (Q) a arginina (R), porta ad una significativa differenza di attività dell'enzima con conseguente variazione della dose interna, tanto che la sua identificazione è stata utilizzata per modulare il trattamento di pazienti con intossicazione acuta da OPT (Sozmen 2002). Le caratteristiche genetiche individuali permetteranno di identificare in associazione ai livelli identificati dallo studio di biomonitoraggio i soggetti a maggior rischio, ipotizzando le motivazioni associate ad eventuali picchi di dose interna a parità di esposizione esterna e suggerire eventuali misure di prevenzione.

Valutazione clinica

La coorte sarà valutata alla *baseline* coinvolgendo i medici di medicina generale e gli specialisti delle varie discipline sanitarie presenti nel territorio. Particolare attenzione verrà riposta agli aspetti neurocognitivi, uno dei principali target degli OP. A tal riguardo, alla fine del follow-up - dopo circa 2500 anni-persona di osservazione nel gruppo di 500 persone esposte arruolate - si stima di identificare circa 90 casi con MCI, 7 con demenza e circa 5 casi con Parkinson. La diagnosi MCI, demenza e Parkinson sarà eseguita in accordo ai criteri clinici riconosciuti dalla comunità scientifica. Nel corso della valutazione della coorte si potrà utilizzare in una prima fase la somministrazione del MMSE e del questionario *self-reported* sui parkinsonismi per selezionare il numero dei soggetti da inviare nella seconda fase agli specialisti neurologi di riferimento per il territorio. Una batteria di test specifici per la valutazione dei deficit di memoria ed altre funzioni cognitive saranno utilizzati, mentre per le altre patologie saranno effettuate visite specialistiche affiancate dai necessari test biochimici di funzionale di organo sistema.

Analisi statistica e modellistica

Gli effetti dei vari biomarcatori e delle altre variabili ambientali e di stili di vita sugli *outcomes* dei test sulla salute e delle evidenze patologiche verranno studiati attraverso modelli di regressione lineare, regressione logistica, modelli lineari generalizzati (GLM) e modelli di regressione lineare ad effetti misti. Inoltre verrà applicato l'approccio EWAS (*Environmental Wide Association Study*) per individuare le associazioni tra i molteplici fattori e gli effetti sulla salute. L'approccio EWAS è basato sul GWAS (*Genome-WAS*) dove il dominio 'genoma' è sostituito dal dominio 'ambiente' (Patel 2010). Il termine ambiente consiste dei fattori ambientali, cioè della quantità delle singole esposizioni misurate direttamente nell'organismo, delle comuni caratteristiche di benessere come ad esempio la famiglia e lo stato socio economico e della autovalutazione dell'esposizione storica. La struttura dello schema EWAS permette di eseguire un'analisi sistematica della sensibilità, per mezzo della quale fattori validati vengono modellati sotto differenti presupposti o con l'aggiunta di covariate. Sarà esaminata la rete di correlazioni tra i fattori indipendenti, verificando il grado di dipendenza tra i fattori validati attraverso il loro coefficiente di correlazione grezzo (*rho di Pearson*). Queste dipendenze saranno evidenziate ed illustrate con *network plot* circolari che riescono in modo più evidente ad illustrare l'enorme *corpus* di dati derivante dall'approccio esposomico adottato. L'altro approccio modellistico che sarà utilizzato per comprendere l'impatto degli effetti sulla salute è rappresentato dalle ANNs (Boznar 1993).

I dati relativi alla suscettibilità individuale, alla valutazione della possibile associazione tra l'esposizione a tossine ambientali e l'insorgenza di condizioni morbose croniche quali le malattie dismetaboliche, cardiovascolari, respiratorie, neurodegenerative e neoplasie saranno espressi in termini di rischio relativo (RR) ed *odds ratio* (OR) con relativi IC95%. Lo studio si configura quindi come uno studio di coorte al termine del quale sarà possibile effettuare anche uno studio caso-controllo *nested* tra i casi identificati e i controlli.

Sebbene sia difficile poter stimare una dimensione campionaria in uno studio con molteplici *end-point* sanitari si può considerare che, per il raggiungimento del primo obiettivo generale (associazione tra sostanze contaminanti e patologie neurodegenerative) saranno necessari circa 126 casi e 252 controlli per poter evidenziare un OR di interazione tra i fattori genetici di suscettibilità pari al 30% e quelli di esposizione ambientale pari al 30% nei controlli con una potenza dell'80% e con una significatività del 5% (Hwang 1994). In generale il numero complessivo di 750 persone incluse nello studio potrà consentire di valutare il peso di numerose interazioni genetiche-ambientali nell'insorgenza delle patologie croniche in esame.

Pianificazione operativa delle attività

La definizione operativa comprendente la suddivisione anche temporale delle attività verrà predisposta, sia per la valutazione dell'esposizione ambientale che per gli aspetti riferiti al monitoraggio biologico e alla valutazione clinica, dal "gruppo di coordinamento" previsto dal progetto. Le attività di monitoraggio biologico e di valutazione clinica verranno effettuate dai Servizi dell'APSS (Dipartimento di Prevenzione, Servizio Territoriale e Servizio Ospedaliero Provinciale) in collaborazione con l'ISS: la spesa per l'APSS non è al momento quantificabile.

L'attività di campionamento e di analisi dei principi attivi verrà effettuata dall'APPA in collaborazione con l'ISS; la spesa prevista per l'APPA è di circa 165.000 euro comprensiva di personale, attrezzature e materiale di consumo.

Durata prevista: 5 anni

Piano economico in base alla suddivisione delle attività

CAPITOLI DI SPESA						
UNITA' OPERATIVE	<i>Personale</i>	<i>Attrezzature</i>	<i>Consumabili Funzionamento</i>	<i>Elaborazione dati/modelli</i>	<i>Disseminazione Incontri/Missioni</i>	TOTALE
1-ISS A Alimonti/ E de Felip	Predisposizione materiali per comitato etico (note informative, consenso informato, etc.); sviluppo questionari ad hoc; coordinamento studio sulla coorte; protocolli di prelievo; dose interna di microinquinanti inorganici (urine, sangue, capelli); speciazione As e Se; modelli statistici; predisposizione biobanca; disseminazione					
	52.000	58.000	110.000	20.000	10.000	250.000
2-ISS D Attard	Analisi in matrice urina (dose interna di microinquinanti organici); disseminazione					
	-	184.000	6.000	-	5.000	195.000
3-ISS E Soggiu/ G Settimo	Coordinamento dello studio degli scenari di esposizione agli inquinanti indoor ed outdoor (disegno, identificazione delle aree, definizione dei protocolli, campionamenti, etc.); caratterizzazione ambientale dei contaminanti connessi alle attività agricole in studio; disseminazione					
	26000	50.000	-	15.000	24.000	115.000
4-ISS E Testai	Collaborazione per la definizione e la determinazione dei metaboliti da determinare nello studio di biomonitoraggio; polimorfismi per OPT; valutazione del rischio; disseminazione					
	26.000	55.000	74.000	15.000	10.000	180.000
5-ISS N Vanacore	Somministrazione test neuro-comportamentali : 1 ricercatore per supporto clinico-epidemiologico; sviluppo questionari ad hoc; analisi statistiche e data-management dei test; disseminazione					
	78.000				12.000	90.000
TOTALE						830.000
Over-head (7 %)						58.000
TOTALE ISS						888.000

FINANZIAMENTO:

50% (inizio attività)

20% (a presentazione relazione del primo anno)

10% (a presentazione relazione del secondo anno)

20% (a presentazione relazione finale)

Bibliografia

- Ashley-Martin J, Levy AR, Platt RW, Marshall JS, Dodds L. Maternal exposure to metals and persistent pollutants and cord blood immune system. *Environmental Health* (2015) 14:52.
- Badin HG, Hibbs BF, Pohl HR Breast-feeding exposure of infants to cadmium, lead, and mercury: a public health view point. *Toxicol Industrial Health* (1997); 134 :495-517.
- Baltazar MT, Dinis-Oliveira RJ, de Lourdes Bastos M, Tsatsakis AM, Duarte JA, Carvalho F. Pesticides exposure a setiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases — A mechanistic approach. *Toxicology Letters* 230 (2014), 85–103.
- Bellinger D.C. Prenatal Exposures to Environmental Chemicals and Children's Neurodevelopment:An Update. *Saf Health Work* 2013;4:1-11.
- Berkowitz, G.S., Wetmur, J.G., Birman-Deych, E., Obel, J., Lapinski, R.H., Goldbold, J.H., Holzman, I.R., Wolff, M.S., 2004. In Utero pesticides exposure, maternal paraoxonase activity, and head circumference. *Environ. Health Perspect.* 112, 388–391
- Boznar, M., Lesjak, M., Mlakar, P., 1993. A neural network-based method for short-term predictions of ambient SO₂ concentrations in highly polluted industrial areas of complex terrain. *Atmospheric Environment. Part B. Urban Atmosphere.* 27, 221-230.
- Byrne SL, Shurdut BA, Saunders DG. Potential chlorpyrifos exposure to residents following standard crack and crevice treatment. *Environ Health Perspect.* 1998;106(11):725-31.
- Engel SM, Berkowitz GS, Barr DB, Teitelbaum SL, Siskind J, Meisel SJ, Wetmur JG, Wolff MS. Prenatal organophosphate metabolite and organochlorine levels and performance on the Brazelton Neonatal Behavioral Assessment Scale in a multiethnic pregnancy cohort. *Am J Epidemiol.* 2007 Jun 15; 165(12):1397-404.
- Eotsinidis M, Alexopoulos A, Kostopoulou-Farri E. Toxic and essential trace elements in human milk from Greek lactating women: association with dietary habits and other factors. *Chemosphere.* 2005 Oct;61(2):238-247.
- Eskenazi B, Marks AR, Bradman A, Harley K, Barr DB, Johnson C, Morga N, Jewell NP. Organophosphate pesticide exposure and neurodevelopment in young Mexican-American children. *Environ Health Perspect.* 2007 May; 115(5):792-8.
- Gundacker, C., S. Frohlich, K. Graf-Rohrmeister, B. Eibenberger, V. Jessenig, D. Gicic, S. Prinz, K.J. Wittmann, H. Zeisler, B. Vallant, et al. 2010. Perinatal lead and mercury exposure in Austria. *Sci. Total Environ.* 408(23):5744–5749.
- Harnly ME, Bradman A, Nishioka M, McKone TE, Smith D, McLaughlin R, Kavanagh-Baird G, Castorina R, Eskenazi B Pesticides in dust from homes in an agricultural area. *Environ Sci Technol.* 2009 Dec 1; 43(23):8767-74.
- Hwang SJ, Beaty TH, Liang KY, Coresh J, Khoury MJ. Minimum sample size estimation to detect gene-environment interaction in case-Am J Epidemiol. 1994 Dec 1;140:1029-37.
- Khanna, R., and G. N. Johri. 1991. Lead and immunity: II. Suppression of humoral immune response to *Hymenolepis nana* in mice. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 35(1):1–7.
- Logdberg, B., M. Berlin, and A. Schutz. 1987. Effects of lead exposure on pregnancy outcome and the fetal brain of squirrel monkeys. *Scand. J. Work. Environ. Health* 13(2):135–145)
- London, L, Flisher, AJ, Wesseling C, Mergler D, Kromhout H. Suicide and exposure to organophosphate insecticides: cause or effect? *Am. J. Ind. Med* 2005; 47(4) 308–21
- Marks AR, Harley K, Bradman A, Kogut K, Barr DB, Johnson C, Calderon N, Eskenazi B. Organophosphate pesticide exposure and attention in young Mexican-American children: the CHAMACOS study. *Environ Health Perspect.* 2010 Dec; 118(12):1768-74.
- McKone TE, Castorina R, Harnly ME, Kuwabara Y, Eskenazi B, Bradman A. Merging models and biomonitoring data to characterize sources and pathways of human exposure to organophosphorus pesticides in the Salinas Valley of California. *Environ Sci Technol.* 2007 May 1; 41(9):3233-40.
- NRC National Research Council. *Toxicological Effects of Methylmercury*, Academic Press, Washington DC; 2000
- Patel, C. J., Bhattacharya, J., Butte, A. J., 2010. An environment-wide association study (EWAS) on type 2 diabetes mellitus. *PLoS one.* 5, e10746.
- Pezzoli G, Cereda E. Exposure to pesticides or solvents and risk of Parkinson disease. *Neurology.* 2013; 80 (22): 2035-41

Perera, F.P., Rauh, V., Tsai, W.Y., Kinney, P., Camann, D., Barr, D., Bernert, T., Garfinkel, R., Tu, Y.H., Diaz, D., Dietrich, J., Whyatt, R.M., 2003. Effects of transplacental exposure to environmental pollutants on birth outcomes in a multiethnic population. *Environ. Health Perspect.* 111, 201–205.

Reddy PH, Tripathi R, Troung Q, Tirumala K, Reddy TP, Anekonda V, Shirendeb UP, Calkins MJ, Reddy AP, Mao PZ, Manczak M. Abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration as early events in Alzheimer's disease: implications to mitochondria-targeted antioxidant therapeutics. *Biochim Biophys Acta* 2012; (1822) 639–49

Scientific Opinion on The safety of dental amalgam and alternative dental restoration materials for patients and users. 2015 http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_046.pdf

Vinceti M, Solovyev N, Mandrioli J, Crespi CM, Bonvicini F, Arcolin E, Georgouloupoulou E, Michalke B. *Neurotoxicology* 2013; (38) 25–32

Whyatt, R.M., Rauh, V., Barr, D.B., Camann, D.E., Andrews, H.F., Garfinkel, R., Hoepner, L.A., Diaz, D., Dietrich, J., Reyes, A., Tang, D., Kinney, P.L., Perera, F.P., 2004. Prenatal insecticide exposures and birth weight and length among an urban minority cohort. *Environ. Health Perspect.* 112, 1125–1132.

Wolff, M.S, Engel, S., Berkowitz, G., Teitelbaum, S., Siskind, J., Barr, D.B., Wetmur, J., 2007. Prenatal pesticide and PCB exposures and birth outcomes. *Pediatr. Res.* 61, 243–250.

Young, J.G, Eskenazi, B., Gladstone, E.A., Bradman, A., Pedersen, L., Johnson, C., Barr, D.B., Furlong, C.E., Holland, N.T., 2005. Association between in utero organophosphate pesticide exposure and abnormal reflexes in neonates. *NeuroToxicology* 26, 199–209.