



*Il Direttore:
Paolo Montuori*

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy



INSINERGIA

PROTOCOLLO INSINERGIA

Studio Multicentrico Nazionale di Biomonitoraggio nei Siti di Interesse Nazionale (SIN)

Sponsor	Dipartimento di Sanità Pubblica dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II"
Versione	1.0
Data	14/11/2025



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

DICHIARAZIONE DI CONFORMITÀ

La sperimentazione sarà condotta in conformità con le Buone Pratiche di Ricerca Epidemiologica e con le leggi e normative vigenti applicabili.

Lo Sperimentatore Principale garantirà che nessuna deviazione o modifica del protocollo avrà luogo senza il previo accordo con lo sponsor e la documentata approvazione da parte del Comitato Etico Competente, salvo nei casi in cui ciò sia necessario per eliminare un pericolo immediato per i partecipanti alla sperimentazione.

Il protocollo, il/i modulo/i di consenso informato, i materiali per il reclutamento e tutti i materiali destinati ai partecipanti saranno sottoposti al Comitato Etico per revisione e approvazione.

L'approvazione sia del protocollo che del modulo di consenso informato sarà ottenuta prima dell'arruolamento di qualsiasi partecipante.

Qualsiasi emendamento al protocollo dovrà essere sottoposto a revisione e approvazione da parte del Comitato Etico prima della sua implementazione nello studio.

Tutte le modifiche al modulo di consenso informato dovranno essere approvate dal Comitato Etico; sarà inoltre valutata la necessità di ottenere nuovamente il consenso da parte dei partecipanti che avevano firmato una versione precedente del modulo.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

INDICE

Protocollo INSINERGIA.....	I
INDICE	3
1. SINTESI DEL PROTOCOLLO	5
1.1. Sinossi	5
1.2. Calendario delle attività.....	8
1. INFORMAZIONI GENERALI	9
2. INTRODUZIONE	10
2.1. Background	10
2.2. Quadro Normativo, Linee Guida e Standard di Qualità	10
2.3. Razionale di studio	11
2.4. Biomarcatori Misurati	12
2.4.1. Biomarcatori di esposizione	12
2.4.2. Biomarcatori di effetto	14
2.4.3. Biomarcatori di suscettibilità genetica	15
2.5. Parametri strumentali aggiuntivi (opzionali).....	16
2.6. Gestione dei rischi e misure di tutela	17
3. OBIETTIVI DI STUDIO.....	18
4. DISEGNO DELLO STUDIO.....	20
5. POPOLAZIONE IN STUDIO	20
5.1. Criteri di inclusione	22
5.2. Criteri di esclusione	23
6. PROCEDURE.....	24
6.1. Piano di Campionamento Stratificato	24
6.2. Strategia di Reclutamento e Arruolamento	28
6.3. Comunicazione territoriale e stakeholder engagement	28
6.4. Visita di studio.....	30
6.4.1. Consenso Informato	31
6.4.2. Registrazione, raccolta informazioni e dati sanitari	32
6.4.3. Prelievo campioni biologici e conservazione	32
6.4.4. Esami strumentali	33
7. INTERRUZIONE DELLO STUDIO.....	33



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

8.	VALUTAZIONI DI STUDIO	33
8.1.	Indicatori Biologici di Esposizione	33
8.2.	Indicatori Biologici di Effetto e di Suscettibilità.....	36
8.3.	Metodi Analitici e Validazione	39
8.4.	Eventi Avversi (AE) ed Eventi Avversi Gravi (SAE)	41
8.4.1.	<i>Definizione di evento avverso</i>	41
8.4.2.	<i>Definizione di evento avverso grave</i>	41
8.4.3.	<i>Classificazione degli eventi avversi</i>	42
8.4.4.	<i>Tempistiche e frequenza per la valutazione e il follow-up degli eventi</i>	43
8.4.5.	<i>Segnalazione degli eventi avversi</i>	43
9.	METODI STATISTICI.....	44
9.1.	Definizione della dimensione campionaria	44
9.2.	Allocazione del campione per sito	44
9.3.	Suddivisione per genere ed età.....	45
9.4.	Calcolo della potenza statistica.....	45
9.5.	Logistica del campionamento	46
9.6.	Piano Statistico e Analisi dei Dati	46
10.	GESTIONE DEI DATI.....	48
10.1.	Sistema Informativo e Gestione dei Dati.....	48
10.2.	Dati Originali e Documenti essenziali	51
11.	CONSIDERAZIONI ETICHE E SUPERVISIONE DELLO STUDIO	51
11.1.	Consenso informato	52
11.2.	Confidenzialità e Privacy	52
11.3.	Monitoraggio Etico.....	53
11.4.	Quality Assurance and Quality Control.....	54
11.5.	Piano di Restituzione dei Risultati (individuale e collettivo)	55
11.6.	Assicurazione	58
11.7.	Emendamenti al Protocollo.....	58
12.	RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	59
13.	APPENDICI TECNICHE E SOPs.....	62



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

1. SINTESI DEL PROTOCOLLO

1.1. Sinossi

Titolo	Protocollo INSINERGIA - Studio Multicentrico Nazionale di Biomonitoraggio nei Siti di Interesse Nazionale (SIN)
Sponsor:	Dipartimento di Sanità Pubblica dell'Università degli Studi di Napoli Federico II
Centri di Sperimentazione	13
Descrizione	INSINERGIA è uno studio interventistico a basso livello di intervento multicentrico nazionale di biomonitoraggio umano condotto in 13 Siti di Interesse Nazionale (SIN) per la bonifica ambientale. L'obiettivo è valutare l'esposizione della popolazione residente a contaminanti ambientali prioritari (metalli, PFAS, POP) e identificare eventuali effetti biologici precoci sulla salute. Il disegno è trasversale (cross-sectional) , con arruolamento stratificato di almeno 2.600 adulti, più una corte di almeno 200 soggetti residenti sul territorio italiano a bassa pressione ambientale e con uno storico di attività di ricerca e monitoraggio della popolazione circa le condizioni generali di benessere della popolazione. Lo studio prevede la raccolta di campioni biologici, dati sanitari e analisi biochimiche tossicologiche e, facoltativamente, genetiche molecolari, con restituzione dei risultati sia individuale sia collettiva.
Obiettivi	Obiettivo generale: Obiettivo primario del presente studio di biomonitoraggio umano è l'implementazione di un approccio nazionale armonizzato per la valutazione dell'esposizione della popolazione residente nei Siti di Interesse Nazionale (SIN) ai contaminanti ambientali prioritari (metalli pesanti, inquinanti organici persistenti, PFAS) e volto a definire dei valori di riferimento nei fluidi biologici, indicatori dei potenziali livelli di esposizione della popolazione. Ulteriore endpoint secondario sarà la valutazione di biomarcatori di esposizione, effetto e suscettibilità. Obiettivi specifici: 1. Standardizzazione metodologica: Applicare protocolli uniformi di reclutamento, prelievo, analisi e gestione dei dati nei 13 SIN coinvolti, al fine di garantire confrontabilità e qualità dei risultati a livello nazionale. 2. Profilazione della contaminazione locale: Caratterizzare l'esposizione specifica per ciascun SIN, integrando dati ambientali pregressi con nuove misurazioni biologiche nei partecipanti. 3. Valutazione del rischio sanitario: Quantificare l'esposizione interna ai contaminanti mediante biomarcatori e stimare il rischio per la salute, confrontando i dati ottenuti con valori di riferimento tossicologici e popolazionali. 4. Analisi esplorativa esposizione-effetto: Indagare



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

	l'associazione tra i livelli dei biomarcatori di esposizione e marcatori biologici di effetto precoce (es. stress ossidativo, alterazioni endocrine, danno al DNA), per evidenziare potenziali segnali di impatto sanitario. 5. Valutazione della suscettibilità individuale: Identificare fattori genetici e biologici predisponenti (es. polimorfismi metabolici) che modulano la risposta individuale agli inquinanti. 6. Sviluppo di scenari e analisi prospettiche: Simulare l'evoluzione del rischio sanitario in relazione a interventi di bonifica o modifiche ambientali nei vari SIN. 7. Costituzione di un network nazionale: Creare una rete interregionale stabile di competenze in biomonitoraggio umano, coinvolgendo istituzioni sanitarie, ambientali e di ricerca. 8. Comunicazione e coinvolgimento delle comunità: Garantire una comunicazione trasparente con i cittadini e gli stakeholder locali, restituendo i risultati sia a livello individuale che collettivo in modo accessibile e responsabile
Popolazione di studio	Lo studio INSINERGIA coinvolge almeno 2.600 soggetti adulti e almeno 200 soggetti appartenente ad una corte di non esposti, equamente distribuiti in 13 Siti di Interesse Nazionale (SIN) localizzati in 9 regioni italiane. In ciascun sito saranno arruolati circa 200 partecipanti, selezionati tramite campionamento stratificato casuale per sesso (50% M/F), classe d'età (20–34 e 35–50 anni) e zona di residenza all'interno del SIN, Date le caratteristiche specifiche delle attività e l'importanza nazionale dei siti, nonché le difficoltà previste nel reclutamento, è possibile che venga arruolato un numero iniziale di soggetti più elevato per consentire, durante le prime fasi dello studio, una valutazione ex post dell'adeguatezza dei criteri di inclusione. Criteri principali di inclusione: • Residenza continuativa nel SIN da almeno 5 anni • Età compresa tra 20 e 50 anni • Capacità di fornire consenso informato • Disponibilità a partecipare alle attività previste Criteri principali di esclusione: • Esposizione occupazionale rilevante a contaminanti simili • Incapacità di comprendere le informazioni o collaborare • Residenza recente o discontinua La popolazione selezionata è rappresentativa della popolazione generale residente nei SIN e consente analisi stratificate per genere,



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

	età e area geografica.
Attività di studio	Ogni partecipante sarà coinvolto in un'unica visita della durata di 90 minuti circa, durante la quale verranno effettuate tutte le attività previste dallo studio. Tutti i campioni saranno analizzati per biomarcatori di esposizione, secondo SOP standardizzate.
Metodi statistici	L'analisi prevede metodi descrittivi e inferenziali per confrontare i livelli di esposizione e gli indicatori biologici tra i 13 SIN. Verranno utilizzati test parametrici e non parametrici, modelli di regressione e analisi multivariate per esplorare associazioni esposizione-effetto, tenendo conto di variabili confondenti (età, sesso, fumo, ecc.). La dimensione campionaria (2.600 soggetti) garantisce adeguata potenza per analisi stratificate e confronti inter-sito.
Durata dello studio	Dicembre 2026
Versione e data del protocollo	1.0 - 14/11/2025



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

1.2. Calendario delle attività

Procedure	Visita di Studio
Consenso Informato	X
Criteri di Inclusione ed esclusione	X
Demografia	X
Anamnesi	X
Esame obiettivo	X
Segni vitali	X
Prelievo ematico	X
Raccolta Urine del mattino	X
Raccolta Feci	X*
Raccolta campioni biologici opzionali (capelli, etc.)	X*
Biomarcatori	X°
Biomarcatori ecografici, cardiovascolari	X*
ECG	X*
Parametri emodinamici	X*

*Attività opzionali

° definiti in base al SIN di appartenenza



Il Direttore:
Paolo Montuori

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

1. INFORMAZIONI GENERALI

Nome e indirizzo dello Sponsor: **Dipartimento di Sanità Pubblica dell'Università degli Studi di Napoli Federico II**

Nome, ruolo e contatti del rappresentante dello Sponsor: **Prof. Paolo Montuori** Ordinario di Igiene generale ed applicata, Direttore del Dipartimento di Sanità Pubblica dell'Università degli Studi di Napoli Federico II

Nome, ruolo e contatti del referente tecnico scientifico: **Prof.ssa Maria Triassi**

Regione Campania: **Dott. Arcangelo Saggese Tozzi**

REGIONE VENETO

Centro sperimentale di riferimento: **Azienda ULSS 3 Serenissima**

Responsabile delle attività: **Dott. Vittorio Selle**

REGIONE LAZIO

Centro di riferimento: **Dipartimento di Epidemiologia del Servizio Sanitario Regionale Lazio.**

Responsabile delle attività: **Dott.ssa Carla Ancona**

REGIONE UMBRIA

Centro di riferimento: **Università degli Studi di Perugia-Azienda Ospedaliera**

Dipartimento di Medicina Interna e Specialistica

Responsabile delle attività: **Dott. Marco dell'Omo**

REGIONE MARCHE

Centro di riferimento: **Agenzia Regionale Sanitaria Regione Marche**

Responsabile delle attività: **Dott. Andrea Filonzi (Azienda Sanitaria Territoriale Ancona)**

REGIONE TOSCANA

Centro di riferimento: **ATNO Nord Ovest**

Responsabile delle attività: **Dott. Alessandro Barbieri**

REGIONE CALABRIA

Centro di riferimento: **ASP Cosenza e ASP Crotone**

Responsabile delle attività: **Dott. Francesco Lucia**

REGIONE LOMBARDIA

Centro di riferimento: **ATS Milano**

Responsabile delle attività: **Dott. Antonio Giampiero Russo**

REGIONE PUGLIA

Centro di riferimento: **ASL Taranto**

Responsabile delle attività: **Dott. Francesco Desiante**



2. INTRODUZIONE

2.1. Background

I Siti di Interesse Nazionale (SIN) per le bonifiche sono aree del territorio italiano caratterizzate da contaminazioni ambientali di origine industriale o da smaltimento di rifiuti pericolosi, tali da comportare un potenziale rischio elevato per la salute delle popolazioni residenti. Numerosi studi epidemiologici sugli abitanti di questi siti (ad es. il Progetto **SENTIERI**) hanno evidenziato eccessi di mortalità e incidenza per patologie tumorali e altre malattie correlate a fattori ambientali rispetto alle medie regionali e nazionali (Pirastu *et al.*, 2014). Tali evidenze hanno rafforzato la necessità di valutare in modo diretto l'esposizione umana agli inquinanti presenti in queste aree e gli effetti precoci sulla salute, superando le sole analisi ambientali di suolo, aria e acque. In questo contesto, il **biomonitoraggio umano** si configura come uno strumento chiave di prevenzione e sanità pubblica: esso consente infatti di misurare nei fluidi e tessuti biologici la presenza di contaminanti o dei loro metaboliti assorbiti dall'organismo, fornendo una stima integrata dell'esposizione individuale attraverso diverse vie e sorgenti (Erspamer *et al.*, 2011). Diversamente dai tradizionali studi epidemiologici su esiti sanitari (spesso tardivi), il biomonitoraggio ambientale e sanitario permette di identificare **alterazioni biologiche precoci** potenzialmente reversibili prima della comparsa di malattie conclamate, offrendo quindi opportunità di intervento tempestivo in ottica di prevenzione primaria (Erspamer *et al.*, 2011).

2.2. Quadro Normativo, Linee Guida e Standard di Qualità

Il presente studio si colloca nell'ambito del quadro normativo italiano ed europeo relativo alla tutela dell'ambiente e della salute nei siti contaminati. I SIN sono stati istituiti a partire dalla fine degli anni '90 (Legge 426/1998) e successivamente normati dal Decreto Legislativo 3 aprile 2006 n.152 e s.m.i., che definisce criteri e procedure per l'individuazione di siti da bonificare di interesse nazionale in ragione della rilevanza delle contaminazioni presenti (Ministero dell'Ambiente, 2006). A oggi, i SIN identificati dal Ministero dell'Ambiente comprendono aree con pregressa attività industriale (petrolchimici, acciaierie, miniere, discariche di rifiuti pericolosi, ecc.) in cui è richiesta la bonifica e dove vigono piani di sorveglianza ambientale e sanitaria. Parallelamente, a livello sanitario, il Ministero della Salute ha promosso progetti strategici (es. Programma "Ambiente e Salute") volti a monitorare gli effetti sulla salute delle popolazioni residenti in siti contaminati, come appunto il progetto INSINERGIA, finanziato nel contesto del Piano Complementare al PNRR (Ministero della Salute, 2023). Inoltre, l'Italia partecipa alle iniziative europee di **Human Biomonitoring** (HBM), recependo le raccomandazioni per l'armonizzazione delle metodologie: ad esempio, i risultati del progetto pilota europeo DEMOCOPHES (2011-2012) e del programma HBM4EU hanno fornito linee guida utili per standardizzare il campionamento e l'analisi di alcuni inquinanti nel sangue e nelle urine in popolazioni generali (Erspamer *et al.*, 2011).

Per quanto riguarda le **linee guida tecniche**, il protocollo INSINERGIA fa riferimento ai documenti nazionali e internazionali di buona pratica in studi di biomonitoraggio. In particolare, vengono adottate le *Linee Guida per l'applicazione del biomonitoraggio in*



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

situazioni di contaminazione ambientale elaborate dai Dipartimenti di Prevenzione delle ASL (Regione Piemonte, 2019), che forniscono indicazioni operative su disegno di studio, criteri di selezione della popolazione, matrici biologiche da analizzare e comunicazione del rischio ai cittadini. Ulteriori riferimenti includono le linee guida dell'Istituto Superiore di Sanità e del Sistema Nazionale per la Protezione dell'Ambiente (SNPA) relative al monitoraggio dei contaminanti prioritari (ad es. linee guida ISPRA-SNPA per il monitoraggio di metalli e PFAS) e le linee guida internazionali sull'uso dei biomarcatori di esposizione ed effetto (HBM4EU, 2019). Il protocollo rispetta inoltre i requisiti etici e metodologici della ricerca epidemiologica: è stato redatto in conformità con la Dichiarazione di Helsinki e seguirà le normative vigenti in materia di protezione dei dati personali (Reg. UE 679/2016 – GDPR e D.Lgs. 196/2003 integrato dal D.Lgs. 101/2018), come dettagliato nelle sezioni etiche.

Un aspetto fondamentale del quadro di riferimento è l'assicurazione della **qualità dei dati e delle analisi**. Tutti i laboratori coinvolti nelle analisi chimico-cliniche dei campioni biologici opereranno secondo standard di qualità verificati ed eventualmente certificati. In particolare, saranno privilegiati laboratori accreditati secondo la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2017, che garantisce la competenza tecnica e la validità dei risultati analitici (ISO, 2017). Saranno comunque, predisposti protocolli operativi standard (Standard Operating Procedures, SOP) comuni a tutti i centri, che copriranno le fasi di prelievo, trasporto e conservazione dei campioni, nonché i metodi strumentali di analisi di ciascun biomarcatore. Verranno applicati rigorosi programmi di *Quality Assurance/Quality Control* (QA/QC): inclusi campioni di riferimento, materiali standard certificati, prove inter-laboratorio e duplicati, al fine di assicurare l'accuratezza e la comparabilità dei dati ottenuti nelle diverse sedi.

Dal punto di vista procedurale, il Centro Coordinatore nazionale monitorerà il rispetto del protocollo e la qualità dei dati raccolti, implementando controlli periodici e attività di audit interno presso i centri periferici. I questionari impiegati saranno validati e somministrati da personale formato, minimizzando errori di intervista. I dati raccolti verranno gestiti tramite un database centralizzato con controlli automatici di consistenza e saranno protetti secondo standard di sicurezza informatica. Infine, la reportistica dei risultati seguirà le linee guida di trasparenza e completezza (es. linee guida STROBE per studi osservazionali) e includerà l'incertezza associata alle stime. Questo solido impianto normativo e metodologico garantisce che lo studio INSINERGIA si svolga in modo **omogeneo, affidabile e conforme agli standard scientifici e legislativi**, ponendo basi solide affinché i risultati possano essere utilizzati nei processi decisionali inerenti alla gestione dei SIN e la tutela della salute pubblica.

2.3. Razionale di studio

Il progetto nazionale **INSINERGIA** nasce dall'esigenza di sviluppare un approccio integrato ambiente-salute nei SIN, colmando la carenza, in Italia, di un programma organico di biomonitoraggio umano sul modello di quelli attivi in altri Paesi (Erspamer *et al.*, 2011). L'iniziativa, finanziata nel quadro del Piano Nazionale per gli Investimenti Complementari al PNRR (Missione Salute – Ambiente), coinvolge in sinergia numerose Regioni, Agenzie ambientali e strutture sanitarie del Servizio Sanitario Nazionale. Il rationale dello studio si fonda sulla necessità di: (a) **quantificare l'effettiva esposizione interna** della



popolazione residente nei SIN a contaminanti prioritari (come metalli pesanti, inquinanti organici persistenti, ecc.) attraverso biomarcatori di esposizione misurati in matrici biologiche; (b) individuare **biomarcatori di effetto precoce** (danno biologico iniziale, alterazioni subcliniche) correlati a tali esposizioni; e (opzionalmente) valutare il ruolo di **fattori di suscettibilità individuale** (polimorfismi genetici) che possono modulare la risposta agli agenti inquinanti. In tal modo sarà possibile delineare il nesso causa-effetto ambiente-salute su basi biologiche, fornendo indicazioni scientifiche solide per la valutazione del rischio sanitario nei siti contaminati e per l'adozione di misure di sanità pubblica. Il nome "InSinergia" evidenzia proprio l'approccio integrato e multidisciplinare dello studio, che unisce competenze ambientali ed epidemiologiche in un network interregionale, mirando a produrre modelli innovativi e replicabili di monitoraggio ambiente-salute a livello nazionale (Ministero della Salute, 2023).

In sintesi, l'introduzione del presente protocollo sottolinea come lo studio INSINERGIA risponda a un'importante istanza di sanità pubblica: **determinare con metodi standardizzati su scala nazionale il profilo di contaminazione interna delle popolazioni nei SIN e i possibili effetti biologici precoci associati**, con particolare attenzione ai gruppi vulnerabili, così da orientare interventi di bonifica, politiche ambientali e azioni di prevenzione sanitaria basate su evidenze scientifiche aggiornate (Pirastu *et al.*, 2014; Ministero della Salute, 2023).

2.4. Biomarcatori Misurati

Punto cardine del disegno di studio è la definizione di un set di **biomarcatori** di esposizione, effetto e suscettibilità che saranno misurati uniformemente su tutto il campione nazionale. Di seguito si riporta l'elenco completo dei biomarcatori previsti nel progetto INSINERGIA, suddivisi per categoria:

2.4.1. Biomarcatori di esposizione

I biomarcatori di esposizione consentono di misurare in modo diretto e quantitativo l'assorbimento di sostanze chimiche esogene da parte dell'organismo. Rappresentano uno strumento fondamentale per collegare l'entità dell'esposizione ambientale ai potenziali rischi sanitari, riducendo l'incertezza associata alle sole misurazioni ambientali o alle stime indirette (Cheng *et al.*, 2019). Questi marcatori forniscono infatti dati oggettivi sull'accumulo di contaminanti nei fluidi biologici (sangue, urine, ecc.) e sulla dose interna individuale, rendendo possibile l'individuazione di gruppi a maggior rischio e l'implementazione di adeguate strategie di prevenzione (IARC, 2018).

Nel progetto INSINERGIA verrà analizzato un ampio pannello di **biomarcatori di esposizione**, comprendente sia contaminanti ambientali prioritari sia i loro metaboliti specifici. Tra i contaminanti misurati vi sono i **metalli pesanti** (heavy metals) come **piombo, cadmio, mercurio, arsenico** (inorganico e metilati), **cromo (VI)** e altri elementi tossici (antimonio, berillio, cobalto, indio, manganese, nichel, platino, rame, tallio, vanadio), quantificati principalmente nel sangue (Cheng *et al.*, 2019). Un'altra categoria rilevante sono i **composti organici volatili (VOC)**, inclusi sia gli **idrocarburi aromatici** (es. **benzene, toluene, etilbenzene, xileni, stirene, trimetilbenzene**) sia i **solventi alifatici clorurati** (come **cloroformio, 1,2-dicloroetano, tetracloroetilene, tricloroetilene**,



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

dicloroetilene isomeri, **cloruro di vinile**), oltre ad additivi come il **MTBE** usato nelle benzine (IARC, 2018; Padrón et al., 2010). Saranno inoltre misurati gli **idrocarburi policiclici aromatici (IPA)**, ad esempio benzo[a]pirene e analoghi) e i contaminanti **PFAS** (sostanze per- e polifluoroalchiliche, in particolare **PFOS** e **PFOA**) che rappresentano inquinanti organici persistenti di grande attualità (Kazerouni et al., 2001). Tra gli **inquinanti organici persistenti** classici figurano anche i **policlorobifenili (PCB)**, sia quelli diossina-simili che non) e le **diossine** (PCDD/F), noti per la loro persistenza ambientale e tossicità: questi composti saranno valutati nei campioni biologici dei partecipanti (ATSDR, 2000; IARC, 1997). Verranno considerati anche contaminanti **emergenti** e potenziali interferenti endocrini: ad esempio il **bisfenolo A (BPA)** e alcuni suoi derivati clorurati, ampiamente utilizzati in ambito industriale e oggetto di crescente attenzione per i possibili effetti sulla salute (Vandenberg et al., 2012). Infine, ampio spazio è dedicato ai **pesticidi**: saranno monitorati sia i **pesticidi organoclorurati** (persistenti e bioaccumulabili, retaggio di passati utilizzi) (Rohlman et al., 2005; US EPA, 2017) sia i **pesticidi organofosforici** tuttora in uso agricolo (Couture et al., 2006; IARC, 2015), oltre ai **piretroidi** (insetticidi di più recente introduzione). Complessivamente, l'insieme di questi marcatori copre le principali classi di contaminanti ambientali cui la popolazione nei SIN potrebbe essere esposta.

Una caratteristica importante del progetto è l'**integrazione dei metaboliti** come indicatori di esposizione interna. Molte sostanze chimiche vengono infatti trasformate nell'organismo in composti più idrosolubili: la misurazione di tali metaboliti nelle urine consente di rilevare anche esposizioni recenti o intermittenti, fornendo informazioni sulla **biotrasformazione** e sulla **biodisponibilità** degli xenobiotici (Vandenberg et al., 2012). Ad esempio, per l'esposizione al benzene saranno determinati i metaboliti urinari specifici **acido S-fenilmercapturico** e **acido trans,trans-muconico**, mentre l'esposizione al toluene sarà valutata tramite i livelli urinari di **acido ippurico** e quella allo stirene tramite **acido mandelico** e **acido fenilgliossilico** (IARC, 2018; Shah et al., 2003). Analogamente, l'assorbimento di solventi clorurati come il tricloroetilene potrà essere verificato attraverso la presenza dei suoi metaboliti **tricloretenolo** e **acido tricloracetico** nelle urine (Shah et al., 2003). Per gli **IPA** (ad es. benzo[a]pirene) saranno analizzati metaboliti idrossilati come l'**1-idrossipirene** e coniugati (es. 1-idrossipirene-glucuronide), indicatori affidabili dell'esposizione a questa classe di composti (Kazerouni et al., 2001). Nel caso del **Bisfenolo A**, l'esposizione interna verrà monitorata misurando i principali metaboliti di fase II, ossia **BPA glucuronato** e **BPA solfato**, marker biologici dell'assunzione di BPA (Vandenberg et al., 2012). Anche l'esposizione a pesticidi non persistenti sarà valutata tramite metaboliti specifici: per gli **organofosforici** verranno cercati i **dialchilfosfati** (ad esempio **DMP, DEP, DMTP, DMDTP, DETP, DEDTP**) nei campioni urinari, mentre per i **piretroidi** si misureranno metaboliti come il **3-PBA** (acido 3-fenossibenzoico) e altri acidi derivati dalle piretrine (Couture et al., 2006). Inoltre, saranno inclusi **biomarcatori metabolici di contaminanti emergenti** quali i plastificanti **ftalati** – di cui si doseranno nelle urine vari monoesteri (es. **monoetil ftalato (MEP)**, **monobutil ftalato (MnBP)**, **monobenzil ftalato (MBzP)**, ecc.) indicativi dell'esposizione cumulativa a prodotti in plastica – e i **ritardanti di fiamma** sia bromurati (es. alcuni **polibromodifenileteri – BDE-47, BDE-153, BDE-209** – e isomeri dell'**esa-bromociclododecano HBCD**) sia organofosfati (es. **BDCIPP, DPHP**), che rappresentano nuove classi di inquinanti indoor. Saranno infine valutati metaboliti di contaminanti industriali come l'**acrilammide**



(mercapturati urinari **AAMA** e **GAMA**) e di **sostanze filtro UV** impiegate in cosmetici (ad es. **benzofenone-1** e **benzofenone-3**). Oltre ai biomarcatori mirati, il progetto prevede anche un'**analisi metabolomica untargeted** su siero e urine, per esplorare profili metabolici globali e identificare eventuali nuovi marker associati all'esposizione multipla a contaminanti (Horizon 2020 HBM4EU, 2019).

2.4.2. Biomarcatori di effetto

I **biomarcatori di effetto** sono indicatori biologici di alterazioni strutturali o funzionali nell'organismo conseguenti all'esposizione a fattori nocivi. Si tratta di variazioni misurabili – a livello biochimico, cellulare o fisiologico – che riflettono l'impatto biologico subito dai tessuti e possono costituire segnali precoci di potenziali effetti avversi (Vineis et al., 2018). Questi marcatori risultano cruciali perché consentono di evidenziare **danni sub-clinici** prima della comparsa di sintomi o patologie conclamate, migliorando la comprensione del legame causa-effetto tra esposizione ambientale e salute (Schünemann et al., 2017). Ad esempio, alterazioni molecolari come il **danno al DNA** o lo **stress ossidativo** possono preannunciare nel lungo termine l'aumentato rischio di malattie croniche (es. neoplasie, malattie degenerative), mentre modifiche **infiammatorie** o **endocrine** rilevabili nel sangue suggeriscono l'attivazione di processi patologici iniziali correlati all'esposizione (Van den Reek et al., 2020). La misurazione di questi biomarcatori permette quindi di **monitorare gli effetti biologici** dell'esposizione nel singolo individuo, supportando la diagnosi precoce e la prevenzione mediante interventi tempestivi (Vineis et al., 2018).

Nel contesto di INSINERGIA verrà adottato un approccio ampio per la valutazione degli effetti sulla salute associati agli inquinanti, includendo marcatori di effetto a diversi livelli. Da un punto di vista **genetico e molecolare**, saranno analizzate alterazioni come la **lunghezza dei telomeri leucocitari**, un indicatore di invecchiamento biologico accelerato e di danno genomico cumulativo (Schünemann et al., 2017), e le **modifiche epigenetiche del DNA** (in particolare il grado di **metilazione globale** o di specifici geni), le quali possono registrare l'impatto a lungo termine delle esposizioni ambientali sul genoma e sulla regolazione genica (Sodhi et al., 2020). Verranno inoltre valutati parametri **immunologici** e **infiammatori**: in particolare, il profilo di **citochine infiammatorie circolanti** (es. IL-6, TNF- α e altre) fornirà informazioni sullo stato di infiammazione sistemica eventualmente indotto dagli agenti espositivi (Van den Reek et al., 2020). Parallelamente, si misureranno indicatori di **stress ossidativo**, come ad esempio i livelli di **8-idrossi-2'-deossiguanosina** (8-OHdG, marker di danno ossidativo al DNA) o altri metaboliti ossidati, allo scopo di rilevare squilibri redox e danni molecolari dovuti a radicali liberi prodotti in risposta a contaminanti pro-ossidanti (Vineis et al., 2018).

Una parte importante dello studio riguarda i **biomarcatori biochimico-clinici ed ormonali**, che consentono di identificare alterazioni metaboliche o funzionali precoci in organi bersaglio. Verranno eseguite le analisi del **profilo ematochimico e metabolico** dei partecipanti: ad esempio la **glicemia** e l'**emoglobina glicata** per valutare lo stato glicometabolico, il **profilo lipidico** (colesterolo totale, HDL, LDL, trigliceridi) come indicatori di possibile effetto su metabolismo e rischio cardiovascolare, e i **parametri epatici** (transaminasi AST/ALT, γ -GT, bilirubina) e **renali** (azotemia, creatinina, e **microalbuminuria**) per monitorare la funzionalità di fegato e reni. Particolare attenzione è rivolta ai **marcatori di funzione endocrina**: saranno misurati gli **ormoni tiroidei liberi FT3**,



FT4 e il **TSH** per individuare eventuali effetti degli inquinanti (come PFAS o diossine) sull'asse tiroideo, nonché gli **ormoni steroidei sessuali** come il **testosterone** (totale e libero) e l'**estradiolo**, e l'ormone dello stress **cortisolo** (principalmente in siero) per valutare possibili squilibri endocrini associati all'esposizione a interferenti endocrini (Vandenberg et al., 2012). Inoltre, saranno dosati marcatori più specifici di danno d'organo: ad esempio, per la **funzionalità renale** verranno valutati indicatori precoci di nefrotossicità come l'**albuminuria** e alcuni biomarcatori urinari di danno tubulare (proteine **KIM-1**, **NGAL**, **β2-microglobulina**, **cistatina C**), che possono segnalare un effetto lesivo dei contaminanti sui reni (Xu et al., 2024). Analogamente, sul versante **cardiovascolare** verranno raccolte misure strumentali indicative di danno d'organo bersaglio: ad esempio l'**ispessimento medio-intimale carotideo (IMT)** e altri parametri ecografici di rigidità arteriosa, che riflettono l'impatto sull'albero vascolare di esposizioni come metalli pesanti o inquinanti atmosferici (Houston, 2007), oppure l'**elettrocardiogramma (ECG)** per cogliere eventuali **alterazioni della conduzione cardiaca** o aritmie subcliniche correlate all'inquinamento ambientale (Langrish et al., 2014). Saranno considerati anche indicatori di **alterata omeostasi pressoria** ottenuti tramite analisi non invasiva dell'onda arteriosa, per verificare se l'esposizione cronica a contaminanti contribuisca a cambiamenti della pressione arteriosa centrale e della dinamica cardiovascolare (Qin et al., 2021). Infine, nell'ottica di esplorare effetti sistemici meno convenzionali, il progetto include lo studio del **microbioma intestinale**: mediante sequenziamento del DNA 16S rRNA da campioni fecali verrà caratterizzata la composizione del **microbiota**, allo scopo di rilevare eventuali stati di **disbiosi** associati all'esposizione a specifici agenti ambientali (Zhao et al., 2020). Alterazioni nel profilo del microbioma potrebbero infatti rappresentare un ulteriore mediatore o indicatore degli effetti sulla salute indotti da contaminanti chimici ambientali.

2.4.3. Biomarcatori di suscettibilità genetica

Gli individui esposti a uno stesso agente nocivo possono mostrare risposte biologiche molto diverse tra loro: questa **variabilità interindividuale** dipende in parte da fattori genetici che influenzano la sensibilità personale ai composti tossici. I **biomarcatori di suscettibilità genetica** sono indicatori di tali predisposizioni ereditarie o acquisite, e tipicamente consistono in specifici **polimorfismi genetici** (varianti alleliche) in geni chiave coinvolti nel metabolismo, nell'assorbimento o nei meccanismi di difesa contro gli xenobiotici (HBM4EU, 2018). Nel presente studio, su un sottogruppo di partecipanti, verrà condotta l'analisi di polimorfismi in geni rilevanti per la risposta tossicologica, così da identificare **genotipi ad aumentata suscettibilità** e valutare come essi possano modulare gli effetti delle esposizioni ambientali. In particolare, saranno esaminate varianti di geni deputati alla **biotrasformazione degli xenobiotici**, ad esempio polimorfismi nelle isoforme di citocromo P450 (come **CYP1A1**, **CYP2E1**) o nelle **glutazione S-transferasi** (in particolare la delezione dei geni **GSTM1** e **GSTT1**), le quali sono state associate a una maggiore vulnerabilità agli effetti tossici di sostanze quali gli IPA e i metalli pesanti (Telisman, 1995). Analogamente, saranno valutati polimorfismi in geni dei **sistemi di riparazione del DNA** (ad es. varianti in geni coinvolti nel riparo di rotture o addotti al DNA), che possono determinare differenze nell'attitudine a gestire il danno genomico causato da agenti genotossici. L'inclusione dei biomarcatori di suscettibilità genetica permetterà



dunque di **contestualizzare i risultati** di esposizione/effetto alla luce del background genetico: identificando individui “a rischio genetico” più elevato (ad esempio *slow metabolizers* o portatori di alleli sfavorevoli), si potranno spiegare meglio le differenti risposte osservate e raffinare la valutazione del rischio per sottogruppi specifici della popolazione (Grandjean, 1992). Questo approccio integrato (gene-ambiente) contribuisce a orientare misure di sanità pubblica più mirate, proteggendo in modo efficace le **popolazioni suscettibili** nei siti contaminati.

2.5. Parametri strumentali aggiuntivi (opzionali)

Oltre ai biomarcatori classici sopra elencati, lo studio prevede l'acquisizione di **parametri strumentali** non invasivi, utili per approfondire il quadro degli effetti sulla salute in modo integrato. In particolare, verranno raccolti i seguenti dati (opzionali):

- **Biomarcatori ecografici cardiovascolari:** spessore medio-intimale carotideo (IMT), indici di **stiffness** arteriosa, parametri di funzione cardiaca come **frazione di eiezione (EF)**, **gittata cardiaca (CO)**, **volume sistolico (SV)**, strain miocardico e indicatori di funzione diastolica (es. **E/A ratio** o altri parametri di riempimento ventricolare). Queste misure forniscono evidenze di alterazioni strutturali o funzionali cardiovascolari subcliniche eventualmente correlabili all'esposizione ambientale.
- **Parametri emodinamici da analisi dell'onda pressoria:** tramite tonometria o oscillometria si valuteranno indici quali la **velocità dell'onda di polso (PWV)** e misure derivate di **pulse wave analysis (PWA)**, incluse la **pressione sistolica e diastolica centrale (cSBP, cDBP)**, la **pressione differenziale centrale (cPP)** e l'**augmentation index (Aix)**. Saranno inoltre calcolati parametri emodinamici integrati come la gittata cardiaca (CO) e le **resistenze periferiche totali (TPR)**. Questi indicatori descrivono lo stato funzionale del sistema vascolare e possono evidenziare precocemente alterazioni dell'arco arterioso legate a esposizioni nocive (es. irrigidimento arterioso da metalli pesanti o inquinanti atmosferici).
- **Parametri elettrocardiografici:** verrà effettuato un **ECG standard** per ogni partecipante, i cui risultati consentiranno di estrarre variabili quali la **frequenza cardiaca**, eventuali aritmie o anomalie di conduzione e anche uno **score di “età cardiaca”** (stima dell'età biologica cardiovascolare basata su parametri ECG). Queste informazioni completano il quadro sullo stato cardiovascolare e possono rilevare effetti funzionali (come predisposizione ad aritmie) in soggetti cronicamente esposti a inquinanti cardio-tossici.
- **Fibroscan**, o elastografia epatica, è un esame non invasivo che valuta la rigidità del fegato, indicando la presenza e il grado di fibrosi e steatosi epatica, ovvero accumulo di grasso. Si tratta di un'alternativa alla biopsia epatica, più veloce e meno invasiva sarà proposta facoltativamente



- **Valutazioni ecografiche addome completo e tiroide**

Tali **parametri strumentali aggiuntivi** arricchiscono la valutazione integrata dello stato di salute, fornendo evidenze quantitative di **alterazioni organo-specifiche** (in particolare a carico dell'apparato cardiovascolare) associabili ai carichi di esposizione individuale. L'integrazione dei risultati di imaging diagnostico, analisi del segnale fisiologico ed esami bioumorali permetterà una comprensione più completa delle relazioni esposizione-effetto, contribuendo a delineare con maggior precisione l'impatto sanitario complessivo nei siti contaminati studiati.

In conclusione, il disegno dello studio multicentrico INSINERGIA è concepito per ottenere **misure integrate e comparabili** dell'esposizione e degli effetti biologici precoci nelle popolazioni di 13 diversi SIN italiani, adottando un approccio metodologico rigoroso, uniforme e scientificamente fondato. L'insieme di dati raccolti costituirà una base informativa preziosa per comprendere il legame ambiente-salute in tali contesti complessi e per supportare interventi di risanamento e prevenzione basati sull'evidenza.

2.6. Gestione dei rischi e misure di tutela

L'impianto dello studio è stato disegnato per ridurre al minimo i rischi per i partecipanti e massimizzare i benefici in termini di conoscenza collettiva (Brody *et al.*, 2014). In termini di **rischio fisico**, come detto, le procedure invasive si limitano al prelievo venoso (quantitativo moderato di sangue, compatibile con la sicurezza del soggetto), eseguito seguendo rigorosi protocolli clinici per prevenire infezioni o complicanze. È prevista la presenza di un medico durante i prelievi per gestire prontamente qualsiasi evenienza (ad es. reazione vaso-vagale). Dal punto di vista **psicologico**, si riconosce che ricevere informazioni sul proprio stato di salute ambientale potrebbe generare preoccupazioni. Per questo il piano di restituzione dei risultati include un'adeguata **mediazione comunicativa**: i risultati individuali saranno accompagnati da un referto interpretativo e, se necessario, vi sarà counselling personalizzato (ad esempio, se un partecipante presenta livelli significativamente elevati di un contaminante, verrà contattato personalmente da un medico del progetto che spiegherà il significato di tale risultato e suggerirà eventuali approfondimenti clinici). Inoltre, già in fase di consenso informato, verrà chiarito che lo studio ha finalità conoscitive e preventive, e non fornisce diagnosi mediche: questo per modulare le aspettative e ridurre il rischio di allarme ingiustificato. Il partecipante potrà anche optare di **non voler conoscere** i propri risultati individuali, se preferisce, senza che ciò infici la sua partecipazione allo studio: tale opzione di *opt-out* informativo è considerata parte del rispetto dell'autonomia (Brody *et al.*, 2014). In tal caso, i suoi dati verranno utilizzati solo a fini di analisi collettiva e sorveglianza ambientale.

Sul fronte dei **rischi sociali/comunitari**, il progetto è consapevole che evidenziare criticità ambientali in specifiche aree potrebbe generare stigmatizzazione o timori nella popolazione locale. Per gestire questo aspetto, INSINERGIA adotta i principi della **ricerca partecipativa**: le comunità locali e le autorità sanitarie saranno coinvolte attivamente sia nella fase di comunicazione sia nell'interpretazione dei risultati nel giusto contesto. In questo modo, si favorisce un clima di trasparenza e collaborazione, mitigando il rischio di incomprensioni o percezioni distorte. Si sottolinea che i risultati collettivi saranno comunicati evidenziando sia gli aspetti positivi (ad esempio la presenza di valori nella



norma per certi inquinanti) sia quelli che richiedono intervento, fornendo raccomandazioni costruttive piuttosto che allarmistiche. Questo approccio etico alla comunicazione è in linea con le raccomandazioni internazionali sulla restituzione dei dati di biomonitoraggio ambientale, che enfatizzano il diritto dei partecipanti di conoscere i risultati insieme alla responsabilità dei ricercatori di fornire spiegazioni chiare e supporto decisionale (Brody *et al.*, 2014).

3. OBIETTIVI DI STUDIO

L'obiettivo primario dello studio INSINERGIA è **definire e implementare un approccio comune, su scala nazionale, per la valutazione dell'esposizione della popolazione ai contaminanti ambientali presenti nei SIN e per l'analisi del conseguente rischio sanitario** (Ministero della Salute, 2023). In particolare, il progetto intende fornire un modello operativo uniforme per misurare i livelli interni di inquinanti organici persistenti, metalli tossici e composti perfluoroalchilici (PFAS) nei residenti di diverse aree contaminate, nonché per valutare gli effetti biologici precoci associati a tali esposizioni, con un focus sulle fasce di popolazione più suscettibili. Un elemento chiave è la creazione di un **network interregionale** di centri con competenze specialistiche in biomonitoraggio umano, in grado di lavorare in sinergia condividendo metodi e dati comparabili.

Obiettivi Specifici: In linea con quanto delineato a livello nazionale (Ministero della Salute, 2023), il protocollo persegue i seguenti obiettivi specifici:

1. **Standardizzazione delle procedure nei SIN:** Implementare azioni e protocolli **standardizzati** in tutte le aree di studio, così che il reclutamento dei soggetti, i prelievi biologici, le analisi di laboratorio e la raccolta dati avvengano con metodologie omogenee. Ciò permetterà di confrontare direttamente i risultati tra i vari SIN partecipanti e disporre di un quadro aggregato a livello nazionale (Ministero della Salute, 2023).
2. **Caratterizzazione del profilo di contaminazione locale:** Ottenere una **mappatura sistematica e aggiornata del profilo di contaminazione ambientale** in ciascun SIN, identificando i contaminanti prioritari per ogni area. A tal fine si utilizzeranno strumenti condivisi per la revisione delle informazioni esistenti (dati ambientali su aria, acqua, suolo, alimenti) e, dove necessario, saranno condotte campagne mirate di monitoraggio ambientale secondo metodologie standard (Ministero della Salute, 2023). Questo permetterà di collegare i livelli interni misurati nei soggetti con le fonti ambientali di esposizione.
3. **Valutazione dell'esposizione interna e del rischio sanitario:** Misurare in modo diretto l'**esposizione umana** ai contaminanti prioritari attraverso studi di biomonitoraggio, quantificando la concentrazione di specifici inquinanti o metaboliti nei fluidi biologici dei soggetti. Successivamente, stimare il rischio per la salute umana confrontando i livelli interni rilevati con valori di riferimento tossicologici o normativi (quando disponibili) e con la distribuzione nella popolazione generale non esposta, al fine di caratterizzare il rischio sanitario specifico per ciascun territorio (Ministero della Salute, 2023).



4. **Analisi epidemiologica esplorativa effetto-esposizione:** Formulare e verificare **ipotesi eziologiche** sull'associazione tra esposizione ambientale ed effetti sanitari precoci. In particolare, lo studio intende esaminare la correlazione tra i livelli di esposizione (biomarcatori interni misurati) e vari **biomarcatori di effetto** o indicatori precoci di danno (ad esempio parametri clinico-biologici alterati, marcatori subclinici di infiammazione o danno cellulare, ecc.), nonché – in maniera esplorativa – con eventuali esiti di salute riferiti (es. prevalenza di sintomi o patologie croniche) (Ministero della Salute, 2023). Questo permetterà di valutare se nei SIN si osservano segnali di effetti biologici avversi associati all'esposizione, generando evidenze utili per future indagini epidemiologiche analitiche.
5. **Sviluppo di scenari di esposizione e analisi prospettiche:** Sviluppare **scenari di esposizione** specifici per ciascun SIN, tenendo conto sia dell'evoluzione temporale storica delle contaminazioni sia dell'impatto degli interventi di bonifica e di riconversione industriale effettuati o programmati. Sulla base di tali scenari, il progetto mira a valutare come il rischio sanitario potrebbe modificarsi al variare delle condizioni ambientali (ad esempio ipotizzando la riduzione di determinate emissioni inquinanti) (Ministero della Salute, 2023). Questo obiettivo fornirà indicazioni prospettiche ai decisori, simulando benefici attesi dalle bonifiche o evidenziando criticità residue.
6. **Creazione di una rete nazionale di competenze in biomonitoraggio:** Costituire un **network permanente di centri di riferimento ed esperti** nel campo del biomonitoraggio umano, coinvolgendo laboratori di ARPA, Istituti Zooprofilattici, servizi di epidemiologia delle ASL e istituti di ricerca. Tale rete favorirà lo scambio di know-how, la formazione e lo sviluppo di metodi innovativi condivisi, ponendo le basi per un **sistema nazionale stabile di sorveglianza biologica** della popolazione anche oltre la durata del progetto (Ministero della Salute, 2023).
7. **Comunicazione del rischio e coinvolgimento delle comunità locali:** Implementare strategie efficaci di **comunicazione del rischio ambientale** e di *community engagement* nei territori coinvolti. L'obiettivo è da un lato informare in modo trasparente i cittadini sui motivi e le modalità dello studio, restituendo loro i risultati in maniera comprensibile, e dall'altro coinvolgere attivamente gli stakeholder locali (amministratori, associazioni, medici del territorio) per favorire fiducia e partecipazione. Ciò contribuirà a promuovere la consapevolezza e la **cultura della prevenzione** nelle comunità interessate (Ministero della Salute, 2023).



4. DISEGNO DELLO STUDIO

INSINERGIA è disegnato come uno **interventistico a basso livello di intervento di biomonitoraggio multicentrico trasversale** (cross-sectional), da condurre simultaneamente in più siti contaminati distribuiti sul territorio nazionale. La tipologia è quella di un'indagine epidemiologica ambientale *population-based*, mirata a raccogliere in ciascun SIN un campione rappresentativo di residenti, dai quali ottenere misurazioni biologiche e informazioni standardizzate. Essendo previsti solo prelievi e rilevazioni non invasive), lo studio è considerato a basso livello di intervento; tuttavia, segue principi organizzativi assimilabili a uno studio clinico multicentrico per quanto concerne il coordinamento tra centri, l'uniformità delle procedure e il controllo di qualità dei dati.

5. POPOLAZIONE IN STUDIO

Lo studio INSINERGIA interesserà complessivamente **13 Siti di Interesse Nazionale (SIN)** distribuiti in 9 regioni italiane, selezionati tra quelli prioritari per estensione e criticità ambientale, in modo da coprire un'ampia gamma di scenari contaminanti presenti nel Paese. L'elenco completo dei 13 SIN oggetto d'indagine – con relativa regione e principale fonte di contaminazione – è il seguente:

- **SIN Venezia (Porto Marghera)** – Regione Veneto: area industriale petrolchimica e chimica, contaminazione storica da metalli, IPA, PCB e diossine nei suoli e sedimenti lagunari.
- **SIN Brescia “Caffaro”** – Regione Lombardia: sito urbano-industriale contaminato da PCB, diossine e mercurio derivanti da un'ex fabbrica chimica; suoli e acque di falda pesantemente inquinati in aree residenziali e agricole a sud della città.
- **SIN Pavia Broni** – Regione Lombardia: Il sito identificato nel comune di Broni (PV), è stata dichiarata Sito di Interesse Nazionale per la presenza diffusa di amianto e altre sostanze pericolose dovute alla produzione di manufatti in cemento-amianto attiva dal 1932 al 1993. La contaminazione ha interessato non solo il suolo e le strutture industriali, ma anche l'aria e le zone limitrofe.
- **SIN Bacino del fiume Sacco** – Regione Lazio: area agricolo-industriale lungo il fiume Sacco (province di Frosinone e Roma), contaminata da β -HCH (isomero esaclorocicloesano derivante da rifiuti industriali chimici) e altri pesticidi; coinvolge numerosi comuni con problemi di contaminazione di catena alimentare (latte) e suoli.
- **SIN Falconara Marittima (Ancona)** – Regione Marche: area con presenza di una raffineria petrolifera e impianti chimici costieri; contaminazione da idrocarburi (BTX, IPA) nei terreni e falde, nonché inquinamento atmosferico locale; popolazione esposta a emissioni industriali e odorigene.
- **SIN Taranto** – Regione Puglia: importante area industriale con stabilimento siderurgico (ex-ILVA), raffineria e porto; contaminazione ambientale massiva da



Il Direttore:
Paolo Montuori

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

diossine, PCB, IPA e metalli (Piombo, Cadmio) in suoli, polveri urbane e catena alimentare (allevamenti); area nota per eccessi di patologie respiratorie e tumorali correlabili alle emissioni industriali.

- **SIN Piombino** – Regione Toscana: area costiera con acciaieria e attività metallurgiche; contaminazione significativa da metalli pesanti (piombo, zinco, cadmio) e IPA nel suolo e falda, nonché residui di rifiuti industriali (polverino d’altoforno) sul territorio; interessata anche la qualità dell’aria da emissioni siderurgiche.
- **SIN Livorno – Stagno** – Regione Toscana: comprende l’area del porto industriale di Livorno e l’adiacente frazione di Stagno (Collesalveti) sede di raffineria ENI; suoli, acque sotterranee e sedimenti contaminati da idrocarburi, IPA, zolfo, mercurio e composti organoclorurati; problematiche di inquinamento atmosferico da SOx/NOx e polveri.
- **SIN Terni-Papigno** – Regione Umbria: area nella Conca Ternana comprendente il polo siderurgico di Terni e l’ex polo chimico di Papigno; contaminanti prevalenti: metalli pesanti (Cromo VI, Nichel, Cadmio) derivanti dalle acciaierie, e residui di solventi clorurati e idrocarburi da discariche chimiche dismesse; interessa anche acque del fiume Nera.
- **SIN Crotone-Cassano-Cerchiara** – Regione Calabria: include il comprensorio di Crotone (ex impianti chimici Pertusola e Agricoltura) e siti minori in provincia di Cosenza; grave contaminazione da metalli pesanti (Zinco, Cadmio, Arsenico) e scorie industriali contenenti radioattività naturale concentrata (fosfogessi) mescolate a materiali da costruzione; impatto sulla popolazione urbana di Crotone e su terreni agricoli circostanti.
- **Sin Napoli Orientale** – Regione Campania: Nell’area del SIN di Napoli Orientale, nella matrice Suolo superficiale e profondo è stata rilevata la presenza sia di metalli, quali ad esempio Hg, Pb, Zn, Be, Cu e Cr, sia di composti organici, quali Idrocarburi, IPA, PCB, in concentrazioni superiori alle Concentrazioni Soglia di Contaminazione (CSC) stabilite dal D.Lgs 152/2006 in riferimento alla specifica destinazione d’uso. Sulla matrice Acque di falda è stata evidenziata una contaminazione diffusa e marcata dovuta principalmente alla presenza di composti alifatici clorurati cancerogeni e non cancerogeni. È stata inoltre riscontrata la presenza di elevate concentrazioni di ferro e manganese in tutto il SIN. All’interno del SIN possono essere individuate diverse sorgenti di esposizione attribuibili a quattro aree: aziende petrolchimiche, industrie meccaniche e dei trasporti, aziende manifatturiere e commerciali all’ingrosso e officine meccaniche, nell’area in località Gianturco; la centrale termoelettrica e il depuratore di S. Giovanni, entrambi dismessi, presenti nella fascia litoranea, tra il Porto e quartiere di S. Giovanni a Teduccio.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

- **Sin Giugliano – Villaricca** – Regione Campania: Nel sito di Giugliano le analisi effettuate nelle diverse indagini hanno evidenziato la presenza nella falda acquifera nell'area della piana Giuglianese e del comune di Villaricca (località di Masseria del Pozzo, Schiavi, Scafarea e San Giuseppiello), di sostanze cancerogene quali ad esempio i composti clorurati e metalli (tra quelli analizzati) in concentrazioni superiori ai valori soglia previsti dalla normativa ambientale.

Nella zona si trovano numerose attività agricole, industriali e pozzi ad uso domestico che utilizzano l'acqua estratta dalla falda sottostante. Nell'area del SIN le indagini hanno individuato i diversi impianti di gestione e smaltimento rifiuti.

- **SIN Bagnoli** – Regione Campania: il sito di Bagoli-Coroglio nel suolo superficiale, i superamenti maggiormente diffusi, relativamente ai metalli, riguardano Zn, Pb, Sn e in misura minore As, Hg e Cu. Per i composti organici si riscontrano superamenti principalmente di IPA, Idrocarburi Pesanti C>12 e PCB presenti in maniera diffusa in tutto il 21 sito. Il parametro Idrocarburi Leggeri C≤12 si riscontra in un solo sondaggio. Nel suolo profondo, l'andamento delle potenziali contaminazioni segue sostanzialmente quello del suolo superficiale, relativamente ai metalli, i superamenti maggiormente diffusi riguardano i parametri Cr, Cu, Zn e Pb, e in maniera minore As, Hg e Sn, mentre fra i composti organici si riscontrano superamenti per IPA, Idrocarburi Pesanti C>12 e PCB presenti in maniera diffusa su quasi tutto il sito.

Nelle acque di falda si è evidenziata contaminazione da composti organici (IPA e Idrocarburi Totali espressi come nesano) e metalli (Ferro, Manganese e in rari casi Nichel).

Questo elenco garantisce la copertura di tutte le tipologie principali di pressione ambientale (chimico, petrolifero, siderurgico, discariche, agricoltura contaminata, ecc.) e rispetta le previsioni del progetto di coinvolgere **13 siti** per un totale di almeno 200 soggetti per area e circa **2600 soggetti** studiati. Ciascun SIN viene considerato come *unità di analisi separata* oltre che contribuire al totale nazionale, cosicché sarà possibile elaborare un rapporto specifico per area oltre al rapporto complessivo comparativo.

La coorte di controllo (almeno 200 soggetti) sarà rappresentata da coorti di popolazione residenti in aree a bassa pressione ambientale e possibilmente con un background di approfondimento clinico e analitico (es. Molise o il Cilento).

5.1. Criteri di inclusione

I pazienti i cui dati saranno raccolti dovranno presentare le seguenti caratteristiche:

1. **Residenza anagrafica** in uno dei comuni ricadenti nella perimetrazione del SIN da almeno **5 anni** al momento dell'arruolamento. Questo requisito temporale è fissato per garantire che i partecipanti abbiano una storia espositiva sufficientemente prolungata nell'area (escludendo nuovi arrivati da poco tempo). Periodi più brevi potrebbero infatti non aver comportato accumulo significativo di contaminanti



Il Direttore:
Paolo Montuori

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

bioaccumulabili o effetti misurabili, mentre 5 anni rappresentano un compromesso prudenziale (SPES, 2016).

2. **Età compresa** indicativamente tra 20 e 50 anni. Si è scelto di focalizzare lo studio sulla popolazione in questa fascia di età per vari motivi: (a) assicurare l'arruolamento di individui in grado di fornire il consenso informato autonomamente e di sottoporsi ai prelievi senza particolari rischi (esclusi quindi bambini e adolescenti minorenni, per i quali servirebbero protocolli ad hoc pediatrici,); (b) coprire comunque un ampio arco di età adulta, includendo giovani, adulti di mezza età, così da valutare anche l'effetto dell'età sull'accumulo di contaminanti (molti inquinanti hanno accumulo dose-dipendente nel tempo, dunque è atteso trovare valori più elevati nei gruppi più anziani) (Erspamer *et al.*, 2011).
3. **Sesso**: sia maschi sia femmine sono inclusi, in proporzioni equivalenti. Lo studio infatti prevede un campionamento bilanciato per genere (50% uomini, 50% donne in ciascun sito), al fine di poter analizzare differenze sesso-specifiche nei livelli di esposizione ed effetto. Il sesso femminile è considerato con attenzione anche per aspetti particolari (ad es. donne in età fertile vs in menopausa, data la possibile diversa vulnerabilità a certi tossici come interferenti endocrini).
4. **Stato di salute e condizioni personali**: sono inclusi soggetti in grado di partecipare alle attività previste (compilare questionari con l'intervistatore, sottoporsi a esami e prelievi). Si richiede pertanto che il soggetto sia in condizioni psico-fisiche idonee: capacità di comprendere e volontariamente aderire allo studio (assenza di gravi disturbi cognitivi), e assenza di condizioni mediche acute che rendano sconsigliabile il prelievo ematico (ad esempio, grave anemia sintomatica, coagulopatie non controllate, ecc.). L'anamnesi verrà raccolta in base a quanto riferito dal soggetto al medico, che valuterà l'effettiva soddisfazione dei criteri definiti dal protocollo. La presenza di patologie croniche comuni (ipertensione, diabete, ecc.) non costituisce di per sé criterio di esclusione, in quanto queste condizioni sono frequenti in popolazione generale e saranno tenute in considerazione in analisi come variabili di aggiustamento.

5. Firma del consenso informato.

5.2. Criteri di esclusione

Saranno esclusi o non eleggibili alla partecipazione i soggetti che presentino una o più delle seguenti condizioni:

1. **Residency breve o non continuativa nell'area**: individui che, pur risultando residenti, abbiano trascorso la maggior parte del tempo in luoghi al di fuori del SIN (es. pendolari a lungo raggio, studenti universitari fuori sede per gran parte dell'anno) o si siano trasferiti recentemente. Questo per evitare di includere



Il Direttore:
Paolo Montuori

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

persone la cui esposizione effettiva agli inquinanti locali sia stata minima o difficile da quantificare.

2. **Esposizioni occupazionali rilevanti:** soggetti la cui occupazione attuale o pregressa li abbia esposti professionalmente a contaminanti simili a quelli ambientali in studio. Ad esempio, lavoratori impiegati in industrie chimiche, metallurgiche o in agricoltura intensiva con pesticidi potrebbero avere livelli di biomarcatori elevati dovuti al lavoro. Tali individui saranno tendenzialmente esclusi, in quanto il progetto mira a valutare l'esposizione di origine **ambientale generale** e non lavorativa. Per identificare questi casi, nel questionario di screening verranno acquisite le professioni: se un candidato riferisce un lavoro in stabilimenti a rischio (es. operatore dell'impianto industriale stesso che causa la contaminazione, o lavoratore in un impianto esterno con solventi, etc.) il comitato scientifico locale valuterà l'esclusione o eventualmente la sua categorizzazione separata come sottogruppo.
3. **Incapacità a fornire consenso informato:** qualsiasi persona che, per disagio sociale (ad es. analfabeta senza supporto, barriera linguistica insormontabile) o per deficit cognitivo, non possa comprendere le informazioni e le procedure, non verrà arruolata. Nel caso di barriere linguistiche, dove possibile, si potrà prevedere materiale informativo multilingue e mediatori culturali, data la presenza di stranieri in alcune aree; diversamente, se la comunicazione e comprensione risultano impossibili, il soggetto sarà escluso.
4. **Rifiuto o non collaborazione:** ovviamente, chi non intenda aderire volontariamente sarà escluso. Inoltre, se un soggetto inizialmente consenziente successivamente si ritira (revoca del consenso) o non completa le procedure, sarà considerato escluso dallo studio e, se necessario, rimpiazzato secondo i criteri di campionamento.

6. PROCEDURE

6.1. Piano di Campionamento Stratificato

Per garantire che il campione di partecipanti selezionato sia effettivamente rappresentativo della popolazione residente in ciascun SIN e non affetto da bias di selezione, si adotterà un **piano di campionamento stratificato casuale**. Come già anticipato, le principali variabili di stratificazione saranno il **sesso, la classe d'età e l'area di residenza all'interno del SIN**. Di seguito si dettaglia il procedimento:

Definizione degli strati di campionamento:

- *Stratificazione per genere:* in ogni SIN si creano due strati iniziali: maschi e femmine. Ciascuno di questi verrà campionato separatamente, con l'obiettivo di raggiungere 100 soggetti per strato.



Il Direttore:
Paolo Montuori

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

- *Stratificazione per classi d'età:* all'interno di ciascuno dei due strati di genere, si suddivide ulteriormente la popolazione in 2 sottostrati basati su fasce d'età predefinite. Indicativamente, le fasce possono essere: 20-34 anni; 35-50 anni.
- *Stratificazione per area di residenza interna al SIN:* Stratificazione per area di residenza interna al SIN: alcuni SIN coprono territori estesi su più comuni o porzioni di territorio all'interno di un singolo Comune, con zone a diverso grado e tipo di contaminazione. Al fine di migliorare la rappresentatività geografica si applicherà, dove opportuno, una stratificazione spaziale ulteriore. Ad esempio, in un SIN esteso su più comuni, si cercherà di selezionare soggetti da tutti i comuni proporzionalmente alla popolazione di ciascuno (metodo di allocazione proporzionale). In un SIN in area sub comunale, si potrà distinguere tra quartieri urbani in prossimità dell'area come sottostrati. In alternativa, l'individuazione dell'area di studio in cui reclutare la popolazione avverrà sulla base di un Indice Ambientale di indirizzo alla esposizione umana, così da poter stabilire un confine univocamente definito che tenga conto della eterogeneità dei diversi siti in cui applicato e che non risente dei limiti amministrativi. Tale indice, applicabile per ciascuna delle aree indagate, si baserà su un sistema a punteggio multiparametrico al fine di ottenere un indice spaziale combinato in relazione a ciascuna delle modalità di interazione delle sorgenti di potenziale contaminazione con i bersagli, come condotto in Regione Campania (SPES, 2016). Tecnicamente, questa diventa una stratificazione secondaria "annidata" nelle classi di età-sesso. Questa stratificazione territoriale garantirà che il campione comprenda soggetti da sotto-aree differenti dei comuni in cui ricade il SIN, riflettendo eventuali gradienti di esposizione.

Il presente protocollo nazionale definisce le linee guida generali per la stratificazione territoriale, lasciando tuttavia ai Centri regionali un margine di flessibilità nella delimitazione degli strati, in funzione della conoscenza locale delle aree di contaminazione e della distribuzione della popolazione potenzialmente esposta. È fondamentale che i criteri utilizzati siano stabiliti e documentati a priori e applicati in modo coerente e standardizzato in tutti i siti.

Procedura di selezione casuale: Una volta definiti gli strati, si procederà come segue:

- Si reperiranno le **liste anagrafiche** della popolazione residente aggiornata per ciascun comune coinvolto (attraverso le anagrafi comunali, con collaborazione dei Servizi Demografici). Queste liste, contenenti nome, età, sesso e indirizzo, verranno importate in un database. In ottemperanza alle norme privacy, la selezione potrà essere eseguita direttamente dal personale delle ASL con accesso ai dati anagrafici, o mediante i Comuni stessi dietro nostre specifiche richieste, in modo da evitare diffusione di dati personali non necessari.



Il Direttore:
Paolo Montuori

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

- Si filtreranno le liste per applicare i **criteri di inclusione** noti: si limiterà l'elenco agli individui di 20-50 anni. Ulteriori filtri come “residente da almeno 5 anni” potranno essere applicati utilizzando i dati storici di residenza (se disponibili) oppure, se non immediatamente disponibili, questo criterio sarà verificato in fase di contatto (chiedendo all'interessato da quanto tempo vive lì).
- La lista verrà poi **suddivisa** secondo gli strati definiti: ad esempio, si isoleranno tutte le femmine 20-34 del comune X, poi femmine 20-34 del comune Y, etc., raggruppandole nel macro-strato “Femmine 20-34 del SIN”. Lo stesso per gli altri strati.
- All'interno di ciascuno strato, i nominativi saranno ordinati in modo casuale (utilizzando una funzione di Campionamento, o estraendo a sorte). In pratica, per ogni strato si genererà un elenco casuale di candidati.
- A questo punto si procederà al **contatto e invito** dei candidati, nell'ordine casuale generato, fino a raggiungere il numero prefissato per strato. Ad esempio, se il primo nominativo del gruppo “Maschi 35-49” accetta, si pianifica la sua visita e si passa al successivo; se rifiuta o non è reperibile dopo tentativi ripetuti, si esclude e si passa oltre, eventualmente sostituendolo con il successivo nella lista random per quello strato.
- Questa procedura garantisce che la **selezione sia casuale** e non influenzata da preferenze degli operatori o auto-selezione dei partecipanti. Inoltre, mantenendo separati gli strati, si preserva la composizione voluta (non succede, per dire, che vengano arruolati troppi uomini e poche donne o troppi giovani e pochi anziani, perché una volta saturato un certo strato si interrompe il reclutamento in esso anche se altrove mancano soggetti).

Pseudonimizzazione: Ad ogni soggetto arruolato verrà attribuito un **codice identificativo univoco** generato dal sistema centrale, privo di riferimenti anagrafici (es: codice composto da codice del sito + numero progressivo casuale). Questo codice sarà usato su tutti i campioni e moduli, assicurando l'anonimato. Il legame tra codice e identità sarà conservato **separatamente** presso ciascuna UOP in un elenco protetto (necessario solo per eventuali comunicazioni individuali di risultati clinicamente rilevanti o per richiami futuri). Il personale di laboratorio riceverà solo campioni etichettati col codice, all'oscuro di nome, età, ecc., in modalità *blind*, per evitare bias nell'analisi. Anche gli analisti statistici tratteranno dataset codificati. Questa metodologia, mutuata dalle *Good Epidemiological Practices*, garantisce riservatezza e minimizza possibili distorsioni di interpretazione.

Sostituzioni e gestione non-adesioni: Nel caso in cui uno strato specifico risulti particolarmente difficile da saturare (ad esempio, scarsa adesione tra maschi giovani per motivi lavorativi), il protocollo consente di ampliare leggermente l'ambito di selezione. Ad esempio, se molti 20-34 rifiutano, si può temporaneamente includere qualcuno di 35 anni appena fuori fascia per quell'invito, o aumentare il periodo di residenza richiesto per



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

pescare nuovi nominativi. Tuttavia, queste flessibilità devono essere discusse col Centro Coordinatore per non introdurre bias. Idealmente, si predisporrà un **over-sampling iniziale**: ad esempio, invitare il 10-15% in più di persone per strato in modo da compensare attese rinunce, evitando di dover adattare i criteri. L'esperienza di studi analoghi suggerisce di spedire ad esempio 30 inviti per ottenere 25 aderenti.

Ogni Centro di sperimentazione predisporrà un registro di campionamento dove annotare per ciascun nominativo estratto l'esito (invitato, accettato, rifiutato, irreperibile, escluso perché fuori criteri alla verifica, ecc.). Questo garantirà trasparenza nel processo di selezione e consentirà successivamente di valutare possibili bias di partecipazione (ad es. se chi ha rifiutato differiva sistematicamente per età o titolo di studio, etc., informazioni che in parte potremmo cogliere se note).

Campionamento a due stadi nei grandi comuni: In alcuni casi (es. Taranto città), estrarre direttamente dall'anagrafe comunale qualche decina di nominativi potrebbe non garantire la dispersione su tutti i quartieri. In situazioni del genere, si potrebbe adottare un **campionamento in due stadi**: prima estrarre casualmente alcune sezioni censuarie o quartieri, poi all'interno di essi estrarre i nominativi. Tuttavia, vista la numerosità modesta (200) e la volontà di semplificare, questo livello aggiuntivo è sconsigliato dal protocollo nazionale, a meno che l'ASL locale lo ritenga necessario. In generale, la stratificazione per area di residenza (alto/medio/basso impatto) già assicura diversità spaziale.

Controllo dell'aderenza al piano: Il Centro Coordinatore verificherà periodicamente che l'arruolamento in ciascun sito stia seguendo il piano stabilito e che eventuali scostamenti (es: meno donne di quante previsto) vengano corretti in corso d'opera intensificando gli sforzi su quei sottogruppi. Se un sito, alla fine del periodo di reclutamento, presentasse un piccolo sbilanciamento (es: 90 uomini e 110 donne invece di 100-100), si potrà comunque accettare, riportandolo come limitazione, purché non infici fortemente le analisi. L'obiettivo primario resta acquisire ~200 soggetti totali di qualità, piuttosto che forzare la quota perfetta e rischiare rinunce.

Rappresentatività e possibili bias: Con il campionamento stratificato casuale si mira a massimizzare la rappresentatività. Tuttavia, si terrà conto che potrebbero residuare alcune differenze tra partecipanti e non partecipanti. Ad esempio, spesso chi aderisce volontariamente a studi sanitari è leggermente più istruito o sensibile al tema rispetto a chi rifiuta. Per valutare ciò, raccoglieremo alcune informazioni aggregate: i tassi di adesione per strato, ed eventualmente (se ottenibili) informazioni di base sugli invitati che non hanno partecipato (età media, sesso). Questo consentirà di discutere l'eventuale presenza di bias di partecipazione. In particolare, faremo attenzione a eventuali sottorappresentazioni: es. scarsa adesione nei giovanissimi o nei lavoratori turnisti può portare a sovra-rappresentare pensionati. Per mitigare questo, orari di prelievo flessibili (anche nel tardo pomeriggio o sabato) saranno offerti, così da favorire la partecipazione di chi lavora. Anche incentivi come un piccolo omaggio (es. buono pasto, rimborso spese viaggio) possono migliorare l'adesione in fasce riluttanti. L'intero disegno di campionamento sarà comunque documentato in dettaglio nei report per trasparenza.



In sintesi, il **piano di campionamento stratificato e randomizzato** dello studio INSINERGIA garantirà che i 2600 soggetti finali costituiscano un **campione equamente distribuito** per sesso ed età, e opportunamente distribuito sul territorio di ciascun SIN secondo gradienti di esposizione. Ciò fornirà basi solide affinché le conclusioni tratte – in termini di livelli medi di contaminazione interna e di effetti biologici – possano essere generalizzate all'intera popolazione di quei siti con buona attendibilità statistica. Inoltre, la randomizzazione nella selezione conferisce rigore scientifico al processo ed evita distorsioni involontarie, rafforzando la credibilità dei risultati agli occhi della comunità scientifica e degli stakeholder locali.

6.2. Strategia di Reclutamento e Arruolamento

La fase di reclutamento dei partecipanti riveste un ruolo cruciale per il successo dello studio: occorre infatti ottenere la collaborazione attiva dei cittadini selezionati, assicurando allo stesso tempo che comprendano a pieno scopo e modalità della ricerca e che la partecipazione avvenga in modo informato e volontario. La strategia di reclutamento di INSINERGIA si articola su due livelli: (7.1) **Comunicazione territoriale e stakeholder engagement**, per creare un contesto favorevole e motivante attorno allo studio nei territori coinvolti; (7.2) **Procedure di consenso informato**, per garantire che l'adesione dei singoli soggetti avvenga secondo i più alti standard etici e normativi.

6.3. Comunicazione territoriale e stakeholder engagement

Data la delicatezza dei temi trattati (inquinamento e salute) e la storia spesso complessa dei SIN – con comunità giustamente preoccupate e attente – il progetto INSINERGIA adotta una robusta strategia di **comunicazione e coinvolgimento della comunità locale** fin dalle prime fasi. L'obiettivo è duplice: da un lato **informare in modo trasparente** la popolazione circa lo studio (scopi, benefici attesi, assenza di rischi significativi per i partecipanti) per favorire un clima di fiducia; dall'altro **coinvolgere attivamente gli attori locali** (istituzioni, associazioni, media) affinché diventino amplificatori del messaggio e sostengano il reclutamento. L'approccio sarà di **contatto diretto** con i cittadini selezionati, supportato però da una campagna informativa di contesto.

Le principali azioni previste sono:

- **Coinvolgimento delle istituzioni locali:** prima dell'avvio del reclutamento in un SIN, il team regionale organizzerà incontri con i Sindaci dei Comuni interessati, gli assessori all'ambiente e alla sanità, i rappresentanti di ASL e ARPA territoriali. In tali meeting verrà presentato il progetto, sottolineandone l'importanza per la comunità e chiedendo la collaborazione attiva delle istituzioni. Lettere ufficiali di patrocinio da parte delle Regioni, Comuni e enti locali verranno diffuse, così che la popolazione percepisca l'iniziativa come **istituzionale e autorevole** (Ministero della Salute, 2023). Saranno invitati anche i referenti di comitati cittadini e associazioni ambientaliste locali con l'obiettivo di coinvolgerli come interlocutori.
- **Materiali informativi chiari e accessibili:** verranno preparati opuscoli e volantini informativi sullo studio, in linguaggio comprensibile (evitando eccessivi tecnicismi),



Il Direttore:
Paolo Montuori

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

che spiegano: *chi conduce lo studio* (Ministero Salute, Regioni, ecc.), *perché* viene fatto (tutela salute, approfondire conoscenze su inquinamento locale), *cosa comporta* per il partecipante (descrizione visite, prelievi), *quali benefici* attesi (esempio: “contribuirai a conoscere lo stato di salute ambientale della tua comunità e a proteggere le future generazioni”). Sarà evidenziato che la partecipazione è volontaria e gratuita. Questi opuscoli saranno distribuiti nei luoghi pubblici (Municipio, ASL, farmacie, biblioteche) e inviati anche in formato digitale sui siti web istituzionali. Eventuali *poster* o locandine sintetiche saranno affissi in punti strategici (ambulatori, farmacie, bacheche comunali) per aumentare la visibilità.

- **Campagna sui media e social network:** Si prevede di sfruttare sia i canali tradizionali (stampa locale, radio, TV regionali) sia i nuovi media per divulgare la notizia dello studio. Ad esempio, in concomitanza con l’avvio del reclutamento, sarà diramato un comunicato stampa e si terrà una conferenza stampa locale, coinvolgendo eventualmente testimonial istituzionali (es. il Presidente di Regione o il Sindaco che incoraggia i cittadini a partecipare). Questo potrà generare articoli e servizi nei telegiornali locali, aumentando la consapevolezza pubblica. Parallelamente, i canali social delle ASL/Regioni diffonderanno grafiche e brevi video informativi pensati ad hoc: ad esempio, interviste di 1 minuto a esperti che spiegano il valore del biomonitoraggio, oppure animazioni semplici sui passi dello studio. L’hashtag #InSinergia potrebbe essere utilizzato per aggregare i contenuti social. Un video informativo generale (durata 3-4 minuti) verrà realizzato dal team di comunicazione del progetto e proiettato anche durante incontri pubblici o condiviso su YouTube, per illustrare in maniera visiva e rassicurante cosa succede durante la partecipazione (es. immagini di un volontario che compila un questionario col ricercatore, infermiera che fa il prelievo in modo professionale, ecc.).
- **Eventi informativi e assemblee pubbliche:** In ciascun territorio, prima e durante il reclutamento, saranno organizzate serate informative aperte al pubblico, in collaborazione con i Comuni e le ASL. Questi incontri, tipo *town hall meetings*, permetteranno ai residenti di porre domande direttamente ai responsabili scientifici. Verranno illustrate le problematiche ambientali locali note, e come lo studio aiuterà a chiarirle. Sarà ribadito che i partecipanti avranno riservatezza e che i risultati saranno comunicati solo in forma aggregata.
- **Stakeholder engagement e reti locali:** Si attiveranno le reti già esistenti sul territorio: ad esempio il coinvolgimento di parrocchie, club di servizio, associazioni sportive o culturali. Una strategia è quella di chiedere a figure di riferimento locale (es. medici del Dipartimento di Prevenzione che siano conosciuti come “il dottore del paese”, oppure insegnanti, leader di comitati) di farsi promotori nel passaparola, spiegando ai concittadini l’importanza dello studio. Pur non coinvolgendo formalmente i medici di famiglia nel reclutare i loro assistiti (come da



Il Direttore:
Paolo Montuori

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

decisione progettuale), essi verranno informati tramite una comunicazione dell'ASL di appartenenza, così che siano preparati a rispondere ad eventuali quesiti dei propri assistiti. Coinvolgere e informare la rete dei medici territoriali rientra in un'azione di community engagement che fa leva sulla fiducia medico-paziente, pur senza arruolamento diretto (Regione Piemonte, 2019).

- **Follow-up telefonico e reminder:** Il personale dell'UOP effettuerà delle chiamate telefoniche ai selezionati (ove i contatti siano disponibili dall'anagrafe) per assicurarsi che abbiano ricevuto il materiale, chiarire eventuali dubbi, proporre una data per l'appuntamento e fornire le istruzioni necessarie (ad esempio, presentarsi a digiuno per il prelievo ematico, etc.). Inoltre, un paio di giorni prima della visita programmata, il partecipante riceverà un promemoria (telefonata o SMS) come cortesia e per ridurre le mancate presentazioni.
- **Evento pubblico finale:** Al termine dello studio, si organizzerà un evento pubblico di presentazione dei risultati locali, dove i cittadini potranno vedere come il loro contributo ha prodotto conoscenza.

6.4. Visita di studio

Prima di procedere a qualunque attività di studio, ai potenziali partecipanti verrà illustrato in dettaglio il progetto e richiesto di firmare un modulo di Consenso Informato.

Successivamente all'adesione, per ogni partecipante verranno raccolte sia informazioni **biologiche** (campioni) sia **informazioni attraverso questionari**.

In particolare:

- I campioni biologici primari sono il sangue e le urine. Dal sangue intero e dal siero/plasma si misureranno la maggior parte dei contaminanti e marcatori di effetto; l'urina è utilizzata soprattutto per i contaminanti con escrezione renale e per vari marker biochimici. In taluni sottogruppi o siti, potranno essere raccolti **campioni aggiuntivi**: ad esempio, un campione di capelli per l'analisi del mercurio organico (capelli come matrice per esposizione cronica a metilmercurio, campioni di feci, oppure latte materno in un sottogruppo di madri per valutare il trasferimento di POP al neonato, o ancora unghie per l'arsenico. Tuttavia, questi eventuali approfondimenti sono facoltativi e limitati, mentre sangue e urine rappresentano la matrice standard per tutti i soggetti. Tutti i campioni, opportunamente codificati, confluiranno anche in una **bio-banca** regionale accreditata, conservati a -80°C, così da permettere eventuali analisi successive o verifiche incrociate (SPES, 2016).
- I **questionari** somministrati ai partecipanti comprendono:
 - un *Questionario anamnestico/clinico* generale per raccogliere dati demografici (età, sesso, luogo di nascita), storico residenziale (anni di residenza nel SIN, eventuali precedenti residenze altrove), storia lavorativa (professioni svolte, con particolare attenzione a possibili esposizioni



Il Direttore:
Paolo Montuori

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

occupazionali rilevanti che potrebbero confondere l'esposizione ambientale), abitudini di vita (in particolare abitudine al fumo di tabacco e consumo di alcol, fattori che influenzano vari biomarcatori), e lo stato di salute riferito (patologie diagnosticate, assunzione cronica di farmaci, ecc.).

- un *Questionario ambientale* e sugli stili di vita, che copre aspetti quali: il tipo di abitazione e la sua distanza da fonti inquinanti note (es. fabbriche, discariche), l'uso di acqua potabile (acquedotto pubblico vs pozzo privato, presenza di filtri), il tempo trascorso quotidianamente all'aperto nella zona, eventuale consumo di prodotti alimentari auto-prodotti (orto domestico, allevamento familiare) – indicatori importanti di esposizione locale. Inoltre, questo modulo indaga l'uso di prodotti o comportamenti che possano influire su specifici biomarcatori (ad esempio, uso di vernici o solventi domestici – rilevante per biomarcatori di solventi; attività hobbistiche come pesca o caccia – per consumo alimenti selvatici; uso frequente di pentole antiaderenti – possibile fonte di PFAS, ecc.).
- un *Questionario di qualità della vita e percezione del rischio*, allo scopo di valutare l'impatto psico-sociale della condizione ambientale. Esso include scale validate sulla qualità di vita (ad es. questionario **SF-36** o simili) e alcune domande sulla percezione soggettiva del rischio ambientale, sul grado di preoccupazione per la salute e sul livello di fiducia nelle istituzioni. Queste informazioni, sebbene non direttamente biologiche, contestualizzano i dati di biomonitoraggio nel vissuto della popolazione e aiutano nella progettazione di efficaci interventi di comunicazione del rischio.

Tutti i questionari utilizzati sono **strumenti validati** o derivati da studi precedenti, e sono somministrati mediante intervista strutturata da parte di personale sanitario formato, per massimizzare la completezza e accuratezza delle risposte. La durata complessiva della visita (questionari + prelievi) è di circa 60-90 minuti per soggetto (Pisani *et al.*, 1997).

Potranno inoltre essere effettuati gli esami strumentali opzionali quali ECG o valutazioni ecografiche descritte al par. 3.5.

Ogni partecipante riceve un **riassunto** scritto con consigli per ridurre eventuali esposizioni (in forma di educazione sanitaria generale) e, successivamente, riceverà feedback sui risultati dello studio (vedi par. 12.5 sulla restituzione dei risultati).

6.4.1. Consenso Informato

Il processo è così articolato:

- **Consegna del materiale informativo:** Ai candidati selezionati, già contattati via lettera, verrà fornita (per posta o e-mail, e comunque poi di persona prima della firma) la seguente documentazione:

- *Foglio Informativo per il Partecipante*



Il Direttore:
Paolo Montuori

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

- *Modulo di Consenso Informato*: un documento che il partecipante dovrà firmare e datare, che attesta la sua volontà di partecipare dopo aver ricevuto e compreso le informazioni
- **Colloquio informativo ed eventuale firma**

6.4.2. Registrazione, raccolta informazioni e dati sanitari

Durante la visita si procederà con:

- registrazione del partecipante e assegnazione del codice univoco di studio;
- verifica delle condizioni preanalitiche (Appendice C): ad esempio lo stato di digiuno, l'assenza di assunzione recente di alimenti o farmaci che possano interferire con le analisi (p.es. pesce di mare per il mercurio, supplementi vitaminici contenenti metalli, ecc.), e il rispetto delle indicazioni fornite al soggetto in precedenza.
- Raccolta dei seguenti dati:
 - anamnesi ambientale/occupazionale ed eventuali fattori di rischio individuali
 - dati anagrafici e sociali
 - esame fisico completo (compresi peso e altezza)
 - segni vitali
- Somministrazione dei questionari

6.4.3. Prelievo campioni biologici e conservazione

Il personale sanitario effettua il prelievo di sangue venoso (a digiuno) e fornisce contestualmente i contenitori sterili per la raccolta di;

- urine del mattino
- feci
- altri campioni previsti per le analisi opzionali (capelli, etc.).

Tutti i materiali impiegati (aghi, provette, contenitori) sono sterili e certificati “metal-free” per evitare contaminazioni dei campioni da metalli esterni.

Al momento della raccolta, ogni provetta viene immediatamente etichettata con il codice identificativo del partecipante (barcode) e registrata nel sistema informativo del progetto, così da tracciare in tempo reale l'associazione univoca campione-partecipante e l'ora del prelievo (RIAS, 2023). Terminata la raccolta, i campioni sono prontamente condizionati per la conservazione temporanea e il trasporto: in genere il sangue viene tenuto a +4 °C fino alla separazione del siero, mentre l'urina viene refrigerata o congelata a -20 °C entro poche ore dalla produzione, per preservare l'integrità dei parametri da analizzare. Tutte queste procedure – dal momento del prelievo al confezionamento per la spedizione – vengono



eseguite secondo istruzioni dettagliate e uniformi in ogni sito INSINERGIA (AReSS Puglia, 2023), a testimonianza dello sforzo di standardizzazione nazionale.

6.4.4. Esami strumentali

Durante la visita verranno effettuati tutti gli esami strumentali previsti (ECG, ecografia) e descritti al par. 3.5.

7. INTERRUZIONE DELLO STUDIO

L'adesione allo studio è volontaria e ogni partecipante ha il diritto di ritirare il consenso in qualsiasi momento, senza dover fornire spiegazioni e senza conseguenze negative per sé.

Se ciò dovesse accadere (ad es. un partecipante decide di uscire dallo studio durante la raccolta o dopo), i dati raccolti fino a quel punto saranno eliminati se il soggetto lo richiede (entro i limiti di legge e fattibilità: se i dati sono già stati pubblicati in forma aggregata anonima non saranno ritirabili, ma i campioni biologici eventualmente conservati potranno essere distrutti su richiesta).

8. VALUTAZIONI DI STUDIO

8.1. Indicatori Biologici di Esposizione

Gli indicatori biologici di esposizione (o di dose interna) sono i parametri che permettono di quantificare la presenza di uno o più contaminanti nell'organismo umano, fornendo una misura integrata dell'esposizione effettivamente assorbita da ciascun individuo. Nel contesto del progetto INSINERGIA, focalizzato sui SIN, l'attenzione è rivolta principalmente a tre classi di sostanze:

- inquinanti organici persistenti (POP);
- metalli pesanti e metalloidi tossici;
- composti per- e polifluoroalchilici (PFAS) (AReSS Puglia, 2023).

Queste sostanze, a causa della loro persistenza ambientale e bioaccumulabilità, rappresentano contaminanti prioritari nei siti di interesse nazionale e i loro livelli nei fluidi biologici umani costituiscono indicatori diretti dell'esposizione della popolazione residente. Gli indicatori di esposizione vengono tipicamente confrontati con valori di riferimento o limiti biologici, ove disponibili, per contestualizzare il grado di contaminazione individuale (MultiMedica, 2020). Di seguito si descrivono i principali biomarcatori di esposizione considerati, per ciascuna categoria di contaminanti:

- **Metalli pesanti (e metalloidi):** i livelli di metalli tossici nel sangue, nelle urine o in altre matrici riflettono la dose interna accumulata dall'individuo. Ad esempio, la piombemia (concentrazione di piombo nel sangue intero) è l'indicatore biologico classico di esposizione al piombo; analogamente, il cadmio urinario ($\mu\text{g/g}$ creatinina) indica il carico corporeo di cadmio a livello renale, mentre il mercurio



Il Direttore:
Paolo Montuori

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

può essere valutato sia nel sangue che nei capelli a seconda della forma (inorganico vs metilmercurio). Nel progetto verranno misurati i metalli ritenuti più rilevanti per ciascun SIN: tipicamente piombo, cadmio, arsenico, mercurio e possibilmente cromo o nichel in siti industriali specifici. I risultati ottenuti (ad esempio, concentrazione di piombo in $\mu\text{g/dL}$ nel sangue) saranno confrontati con i Valori di Riferimento (VR) per la popolazione generale italiana o europea, tenendo conto di età e sesso, al fine di valutare se i residenti nei SIN presentano livelli superiori alla popolazione non esposta. Questo confronto con valori di riferimento costituisce parte integrante dell'interpretazione dei dati di biomonitoraggio (RIAS, 2023; MultiMedica, 2020). La letteratura e l'esperienza pregressa in Lombardia confermano l'utilità di tali indicatori: ad esempio, in uno studio condotto nel SIN Brescia-Caffaro, la concentrazione di PCB e metalli nel sangue di ~800 residenti è stata misurata e confrontata con indagini analoghe di dieci anni prima, evidenziando l'evoluzione temporale dell'esposizione nella popolazione locale (ATS Brescia, 2018). Ciò dimostra come i biomarcatori di esposizione possano rivelare trend storici e differenze geografiche legate agli interventi di bonifica o alle variazioni delle fonti emissive.

- **Inquinanti organici persistenti (POP):** questo gruppo comprende composti tossici a lunga emivita ambientale e biologica, quali i Policlorobifenili (PCB), le diossine e furani (PCDD/F), i pesticidi organoclorurati (es. DDT e metaboliti) e gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) ad alto peso molecolare. Gli indicatori di esposizione per queste sostanze sono generalmente le loro concentrazioni nei liquidi biologici, in particolare:
 - i PCB, le diossine e molti pesticidi si misurano nel siero (in quantità di pg/ng per grammo di lipidi, data la loro lipofilia),
 - mentre per gli IPA si possono dosare metaboliti specifici nelle urine (ad es. 1-idrossipirene come biomarcatore di esposizione a IPA da combustione).

Nel progetto, a seconda del profilo di contaminazione del SIN, saranno selezionati i marker più appropriati: ad esempio, per un sito contaminato da PCB industriali si analizzerà il PCB totale o i congeneri indicatori nel siero; in un'area con significativa contaminazione da combustibili fossili o acciaierie, si potrà includere l'1-idrossipirene urinario come indicatore di esposizione agli IPA. Poiché molti POP tendono ad accumularsi nell'organismo, i loro livelli ematici riflettono esposizioni integrate su medio-lungo termine; per alcuni, come le diossine, potrebbero essere disponibili indicatori tissutali (ad es. concentrazione nel tessuto adiposo, sebbene ciò non sia previsto qui per ragioni etiche/invasive). Anche in questo caso, i valori riscontrati saranno rapportati a valori di riferimento noti nella popolazione generale. Va ricordato che in studi precedenti (come il progetto latte materno di ATS Brescia) sono stati trovati PCB e diossine nel latte di donne residenti in area contaminata, con livelli seppur entro limiti di sicurezza ma maggiori rispetto a zone meno



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

inquinata (ATS Brescia, 2018). Tali risultati confermano l'importanza del biomonitoraggio umano per evidenziare l'esposizione interna a POP invisibile dalle sole misure ambientali.

- **PFAS (sostanze perfluoroalchiliche):** i composti come PFOS, PFOA e analoghi, ampiamente usati in campo industriale, rappresentano un caso emblematico di contaminanti emergenti nei SIN (ad esempio a seguito di produzioni chimiche o utilizzo di schiume antincendio). Le concentrazioni sieriche di PFAS (esprese in ng/mL) sono gli indicatori biologici d'elezione per stimare l'esposizione interna a queste sostanze, in quanto i PFAS si legano alle proteine plasmatiche e persistono nel sangue per anni. INSINERGIA prevede l'analisi di un pannello di PFAS nel siero, includendo i composti principali (PFOS, PFOA, PFHxS, ecc.) laddove pertinenti al sito in studio. Data la crescente preoccupazione per gli effetti sanitari associati ai PFAS, misurare il loro livello nel sangue della popolazione esposta è cruciale: ad esempio, in Veneto, sono stati osservati incrementi significativi nei livelli sierici di PFOS/PFOA nei residenti rispetto ai non esposti, con valori anche doppi rispetto alla popolazione generale (Morelli, 2023). Questi dati, combinati con evidenze sperimentali, suggeriscono un forte legame causale tra residenza in aree inquinate da PFAS e accumulo di tali sostanze nell'organismo. Pertanto, nel nostro protocollo, i PFAS sierici fungono sia da indicatori di esposizione che dà segnali di allerta per possibili conseguenze metaboliche (come dettagliato oltre negli indicatori di effetto). L'interpretazione dei livelli di PFAS avverrà confrontandoli con valori di *background* regionali/nazionali (es. quelli emersi dal biomonitoraggio della popolazione generale nelle campagne del Ministero della Salute), tenendo conto di età e genere.

Oltre a queste categorie principali, potranno essere inclusi ulteriori indicatori di esposizione specifici per contaminanti caratteristici di alcuni SIN. Ad esempio, in siti con emissioni di benzene o solventi clorurati, si potrebbero dosare metaboliti urinari quali l'S-PMA (acido S-fenilmercapturico, marcatore di esposizione al benzene) o il tricloroacetato (per solventi clorurati). In siti con uso diffuso di pesticidi organofosfati in passato, un indicatore come l'attività delle colinesterasi ematiche potrebbe essere considerato anche come segnale di esposizione cumulativa (anche se più comunemente interpretato come effetto, vedi sezione 11). In generale, la scelta degli indicatori di esposizione è guidata dal profilo di contaminazione del sito (identificato nell'Obiettivo Specifico 2 del progetto (AReSS Puglia, 2023)) e dalle evidenze pregresse su quali biomarcatori siano più informativi e robusti. L'insieme di questi indicatori permetterà di costruire un quadro completo dell'esposizione internamente assorbita dai residenti dei SIN, superando i limiti delle sole misure ambientali (che non tengono conto di tutte le vie di assorbimento e dei fattori individuali).

I risultati dei biomarcatori di esposizione, una volta ottenuti, saranno utilizzati sia per valutare il rischio sanitario (comparandoli a valori di riferimento o linee guida) sia per correlazioni con eventuali effetti precoci riscontrati, all'interno di un approccio integrato One Health promosso dal progetto (AReSS Puglia, 2023).



8.2. Indicatori Biologici di Effetto e di Suscettibilità

Gli indicatori biologici di effetto forniscono evidenza di alterazioni biologiche precoci nell'organismo in risposta all'esposizione a contaminanti, mentre gli indicatori di suscettibilità mettono in luce differenze individuali (spesso su base genetica) nella risposta a tali esposizioni (MultiMedica, 2020). Questi indicatori rivestono un ruolo fondamentale per comprendere non solo *quanto* un contaminante sia presente nel corpo (esposizione), ma anche se esso sta producendo conseguenze subcliniche o modificando parametri biologici, e perché alcuni individui possono essere più vulnerabili di altri a parità di dose interna.

Indicatori di effetto: sono quei biomarcatori che rilevano un'alterazione fisiologica, biochimica o molecolare associata all'azione di agenti tossici, ancora in una fase potenzialmente reversibile (MultiMedica, 2020). L'obiettivo è identificare segnali precoci di danno o disfunzione, prima che si instaurino patologie conclamate. Nel protocollo INSINERGIA verrà considerato un set di indicatori di effetto, scelti in base alla tipologia di contaminanti presenti nei SIN e alle evidenze scientifiche disponibili. Alcuni esempi di indicatori di effetto pertinenti includono:

- Enzimi o proteine alterate dall'esposizione: variazioni in specifiche attività enzimatiche possono segnalare un effetto tossico. Un esempio classico, in ambito pesticidi, è la riduzione dell'attività delle colinesterasi sieriche/eritrocitarie in soggetti esposti a organofosforici, marker di un'interferenza neurotossica (ILO, 2011). Nel contesto dei POP e metalli, potremmo valutare enzimi epatici: ad esempio la γ -GT e ALT come indicatori di sofferenza epatica potenzialmente correlata a PCB/diossine; oppure la colesterolemia e alcuni ormoni tiroidei come TSH, noti per essere alterati dall'esposizione a PFAS. Studi recenti in popolazioni esposte a PFAS hanno infatti evidenziato livelli di colesterolo significativamente più alti nei soggetti con PFOS/PFOA elevati (Morelli, 2023), suggerendo un effetto metabolico diretto di questi inquinanti. Misurare parametri clinico-chimici quali profilo lipidico, funzionalità epatica e tiroidea può dunque fornire indicatori di effetto da correlare con i livelli di contaminanti nel siero.
- Indicatori di stress ossidativo e danno molecolare: l'esposizione a molti inquinanti ambientali provoca stress ossidativo e danni a macromolecole biologiche. Pertanto, marker come l'8-OHdG (8-idrossideossiguanosina) nelle urine, indicativo di danno ossidativo al DNA, o i livelli ematici di malondialdeide (MDA) e altri prodotti di perossidazione lipidica, potrebbero essere valutati. Un aumento di tali indicatori rispetto ai valori attesi suggerirebbe che l'esposizione ha innescato meccanismi di danno cellulare. Allo stesso modo, la capacità antiossidante totale del plasma o enzimi come glutazione perossidasi e superossido-dismutasi possono essere misurati per vedere se il bilancio ossidativo risulta alterato negli esposti.
- Indicatori di genotossicità citogenetica: sono test che evidenziano danni al DNA o ai cromosomi nelle cellule dell'individuo. INSINERGIA potrà includere saggi come il Test dei micronuclei su linfociti periferici (che rileva la presenza di piccoli nuclei



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

accessori, indice di rotture o perdite cromosomiche durante la divisione cellulare) oppure il *Comet assay* su leucociti (che quantifica le rotture del DNA sotto forma di “code cometarie” in elettroforesi). Un aumento significativo di micronuclei o di danni al DNA nei partecipanti di un SIN rispetto ai controlli può indicare che l’esposizione ambientale sta inducendo effetti genotossici, potenzialmente associati a rischio a lungo termine di patologie come il cancro. Questi indicatori di effetto genotossico sono considerati *early biomarkers* in molti studi ambientali e saranno applicati nel progetto se la numerosità e la logistica lo consentiranno, focalizzandosi magari su sottogruppi ad alta esposizione.

- Indicatori immunologici o endocrini: alcune sostanze possono alterare il sistema immunitario o quello ormonale prima di manifestare malattia. Pertanto, potrebbe essere utile misurare, in campioni di siero, citochine infiammatorie (es. IL-6, PCR ultrasensibile) come indici di infiammazione cronica a basso grado, oppure parametri ormonali come il cortisolo o l’ormone tiroideo libero (fT4) per cogliere eventuali effetti da interferenti endocrini (diversi POP agiscono come *endocrine disruptors*). Qualunque variazione anomala di questi parametri – pur non specifica di per sé – in associazione con livelli elevati di contaminanti potrebbe suggerire un impatto biologico meritevole di approfondimento.

La selezione finale degli indicatori di effetto da analizzare terrà conto della fattibilità analitica (alcuni richiedono tecniche avanzate non disponibili in routine), della significatività scientifica e della rilevanza per la salute pubblica. È importante sottolineare che la misurazione di indicatori di effetto nel progetto sarà condotta in ottemperanza ai requisiti etici: si tratta infatti di esami che, se da un lato forniscano informazioni preziose, dall’altro potrebbero anticipare evidenze di danno subclinico. Pertanto, la loro interpretazione e l’eventuale comunicazione ai partecipanti saranno effettuate con cautela e attraverso canali medico-sanitari appropriati, prevenendo allarmismi e inquadrando i risultati nel contesto generale di rischio.

Indicatori di suscettibilità: riguardano le caratteristiche intrinseche degli individui che possono influenzare l’entità degli effetti causati da una data esposizione. In genere, si tratta di marker genetici o molecolari che evidenziano una diversa capacità di assorbire, distribuire, metabolizzare o riparare i danni indotti da sostanze tossiche (MultiMedica, 2020). Nel progetto INSINERGIA, l’analisi di suscettibilità sarà orientata principalmente allo studio di polimorfismi genetici e altri fattori biologici predisponenti che possono modulare la risposta ai contaminanti ambientali. Alcuni esempi di indicatori di suscettibilità da considerare:

- Polimorfismi genetici di metabolizzazione/difesa: verrà valutata la possibilità di genotipizzare alcuni polimorfismi in geni chiave coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici o nella protezione dai loro effetti. Ad esempio, varianti nei geni del glutathione S-transferasi (*GSTM1*, *T1*), del citocromo P450 (come *CYP2E1* per solventi o *CYP1A1* per idrocarburi policiclici), o ancora polimorfismi in geni di riparazione del DNA (es. *XRCC1*, *OGG1*) potrebbero essere analizzati. La presenza o assenza di alcune varianti alleliche può rendere un individuo *slow metabolizer* o



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

susceptible nei confronti di determinate sostanze: per esempio, la delezione del gene *GSTM1* (*null genotype*) è nota per essere associata a minore capacità di detossificazione di composti organici e a maggior rischio di effetti avversi in ambienti inquinati. Identificare queste differenze genetiche aiuterà a interpretare la variabilità interindividuale nei risultati (perché, a parità di esposizione, alcuni soggetti mostrano indicatori di effetto alterati e altri no) (MultiMedica, 2020). Tutte le analisi genetiche saranno condotte previo specifico consenso, garantendo la privacy e la non divulgazione di informazioni genetiche individuali (vedi sez. 14).

- Stato epigenetico o altri marker molecolari di suscettibilità: oltre alla genetica “fissa”, esistono indicatori di suscettibilità acquisiti, ad esempio profili epigenetici. Metilazioni specifiche del DNA o modificazioni di espressione genica indotte da esposizioni pregresse potrebbero influire sulla risposta a nuovi insulti tossici. Il progetto potrebbe esplorare, su sottogruppi, marker come il pattern di metilazione di geni correlati allo stress ossidativo o all’infiammazione (per verificare se esposizioni croniche hanno “programmato” diversamente il sistema biologico di alcuni individui). Similmente, l’accorciamento dei telomeri leucocitari è proposto in letteratura come indice di invecchiamento biologico accelerato da stress ambientali: individui con telomeri più corti potrebbero essere più suscettibili agli effetti avversi di ulteriori esposizioni. Questi saggi richiedono tecnologie avanzate (sequenziamento, PCR quantitativa ad alta risoluzione) e saranno eventualmente implementati in collaborazione con i centri di ricerca universitari partner, in particolare per la componente di ricerca traslazionale del progetto.
- Fattori fisiologici di suscettibilità: infine, sebbene non siano indicatori “biologici” in senso stretto misurabili in laboratorio, è importante riconoscere nel disegno dello studio quei fattori che rendono talune popolazioni più vulnerabili. Età (bambini e anziani tendono ad essere più suscettibili), stato di salute pregresso (comorbidità cardiache, renali, immunitarie), sesso e stato nutrizionale sono elementi registrati e che interagiranno con i dati di biomonitoraggio. Ad esempio, i bambini possono assorbire più piombo rispetto agli adulti per via di fisiologia differente, e al contempo presentare effetti neurocognitivi a dosi più basse: l’età giovane in questo caso è un indicatore di suscettibilità che verrà considerato nell’analisi. Similmente, individui con deficit genetici o nutrizionali in sistemi antiossidanti (ad es. basso status di vitamina D o selenio) potrebbero subire maggiori danni da metalli pesanti; dunque, ove possibile, saranno valutati anche parametri clinici come la funzionalità renale ed epatica, per identificare soggetti con ridotte riserve funzionali che li rendono *high responder*.

In sintesi, gli indicatori biologici di effetto e di suscettibilità ampliano la prospettiva del biomonitoraggio: non ci si limita a dire “quanto contaminante c’è nel corpo” ma si cerca di capire se “quel contaminante sta producendo alterazioni preoccupanti” e “chi, tra gli esposti, è a maggior rischio di subire conseguenze”. Il progetto INSINERGIA integra questi aspetti avanzati in maniera graduale e controllata. L’Obiettivo Specifico 3 del progetto,



infatti, prevede la valutazione congiunta dell'esposizione e del rischio, e include, dove possibile, la valutazione di effetti biologici precoci al fine di caratterizzare meglio il rischio sanitario (RIAS, 2023). Attraverso un'attenta analisi statistica multivariata, si cercherà di collegare i livelli dei biomarcatori di esposizione con eventuali variazioni negli indicatori di effetto, tenendo conto dei fattori di suscettibilità. Qualora emergano associazioni significative (ad esempio, elevato livello di arsenico urinario correlato ad aumento di 8-OHdG o a caduta di capacità antiossidante in sottogruppi con *GSTM1 null*), ciò fornirebbe evidenza diretta del nesso causa-effetto e indicherebbe la necessità di interventi di sanità pubblica mirati sui sottogruppi vulnerabili. Tutte le attività relative a indicatori di effetto e suscettibilità saranno condotte secondo i più alti standard etici e scientifici, e rappresentano la frontiera innovativa del progetto nel contribuire a comprendere l'impatto sanitario delle esposizioni ambientali nei SIN.

8.3. Metodi Analitici e Validazione

Le analisi di laboratorio dei campioni biologici raccolti saranno effettuate utilizzando metodologie analitiche avanzate e validate, allo scopo di garantire dati accurati, sensibili e comparabili tra i diversi laboratori coinvolti. Il progetto INSINERGIA, attraverso la creazione di un network di centri analitici interregionali, assicura che tutti i laboratori adottino protocolli condivisi di analisi e programmi rigorosi di controllo di qualità (QA/QC) (AReSS Puglia, 2023).

Metodi analitici per i contaminanti chimici: in base alla natura dei diversi analiti (metalli, composti organici, biomarcatori biologici), verranno impiegate strumentazioni e tecniche specialistiche adeguate:

- Per la determinazione dei metalli pesanti in matrici biologiche (sangue, siero, urine, capelli) si utilizzeranno strumenti ad alta sensibilità quali la spettrometria di massa accoppiata al plasma induttivamente accoppiato (ICP-MS) o, dove appropriato, la spettrometria di assorbimento atomico con fornello di grafite (GFAAS) e tecnica a vapori freddi (per Hg). Queste tecniche consentono di quantificare metalli a livelli di tracce (ppb o inferiori) con elevata precisione. I laboratori predisposti – molti dei quali afferenti al Sistema Regionale di Prevenzione Sanitaria (SRPS) in Lombardia e analoghi in altre regioni – dispongono di tale strumentazione e hanno esperienza pregressa in analisi ambientali e biologiche di metalli. Ad esempio, ARPA Lombardia e laboratori ATS hanno in passato effettuato misure di piombo e cadmio ematico in popolazioni esposte, applicando metodi standardizzati secondo normative internazionali. Nel progetto, ogni laboratorio seguirà un metodo analitico standard definito dal coordinamento (es. metodo ISS per Pb-Cd-U sangue basato su ICP-MS), comprensivo di calibrazioni con standard certificati e correzione per la diluizione del campione (nel caso di urine, correzione per la creatinina).
- Per la quantificazione degli inquinanti organici persistenti (POP) e dei PFAS nei fluidi biologici si faranno ricorso a metodiche cromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa ad alta sensibilità. In particolare, PCB, pesticidi organoclorurati, e possibilmente diossine/furani, saranno analizzati tramite cromatografia gas-spettrometria di massa (GC-MS/MS, o HRGC-HRMS ad alta



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

risoluzione per diossine se il progetto lo include), dopo opportuno trattamento del campione (estrazione liquido-liquido o in fase solida, *clean-up* su colonne). I PFAS, essendo composti più polari, saranno invece determinati tramite cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa tandem (HPLC-MS/MS), seguendo protocolli già consolidati ad esempio nei biomonitoraggi del Veneto. Queste analisi saranno svolte in pochi laboratori altamente specializzati (ad es. laboratori degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali o ARPA dotati di unità di chimica avanzata): la scelta è intenzionale per garantire massima affidabilità, data la complessità nell'analisi di ultratracce di POP/PFAS in matrici biologiche. Tali laboratori fungeranno da centri di riferimento analitico per la cordata di regioni, offrendo supporto anche alle altre strutture. Questa cooperazione interregionale è esattamente uno degli elementi qualificanti di INSINERGIA (Bianchi, 2025): coinvolgendo istituzioni come IZS, ARPA e università dotate delle necessarie competenze, il progetto assicura che ciascun parametro sia misurato col metodo più idoneo e con personale altamente qualificato.

- Per gli indicatori biologici di effetto (enzimi, ormoni, marker di danno ossidativo ecc.), si utilizzeranno tecniche di laboratorio clinico e biochimico: ad esempio, le concentrazioni sieriche di colesterolo totale, frazioni lipidiche, transaminasi, TSH saranno determinate con analizzatori clinici automatici e metodi immunochimici standard (validati secondo normative della medicina di laboratorio); i marcatori specifici come 8-OHdG urinario potranno essere analizzati mediante HPLC con rilevazione elettrochimica o spettrometria di massa, oppure tramite kit ELISA ad alta sensibilità validati per urine umane. I test citogenetici (micronuclei) saranno condotti seguendo linee guida internazionali (es. ISO standard per il *Cytokinesis-Block Micronucleus Assay*) in laboratori specializzati di tossicologia. Ogni metodo scelto per gli indicatori di effetto sarà sottoposto a verifica di riproducibilità e, dove possibile, calibrato utilizzando campioni di controllo o standard di riferimento (ad esempio, controlli interni di siero a diversi livelli per PCR, pool di urine per 8-OHdG, etc.).

Validazione dei metodi: prima di analizzare i campioni dello studio, ciascun laboratorio eseguirà una fase di validazione analitica del metodo di misura per il proprio analita di competenza. Questa fase comprende la valutazione dei parametri di performance: linearità del segnale su un adeguato intervallo di concentrazioni, limite di rilevabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) per assicurare che siano sufficientemente bassi rispetto ai livelli attesi nei campioni ambientali, accuratezza (verificata tramite materiali di riferimento certificati o confronto con metodi alternativi), precisione intra- e inter-giornaliera (calcolata su campioni di controllo replicati), e specificità (assenza di interferenze significative di altre sostanze presenti nelle matrici). Ad esempio, per i metalli saranno utilizzati materiali di riferimento certificati (CRM) di sangue intero e urine con concentrazioni note di metalli per confermare l'accuratezza del metodo ICP-MS implementato. Per i PCB e pesticidi, sarà istituito un gruppo di lavoro che fornirà standard certificati e soluzioni di calibrazione contenenti i congeneri/analiti target a concentrazioni



note; saranno eseguiti test di recupero su campioni fortificati (*spike & recovery*) e test di ripetibilità su aliquote replicate del medesimo campione biologico. Ogni laboratorio documenterà la propria procedura di validazione in un report che sarà condiviso con il coordinamento nazionale. Solo al raggiungimento di criteri predefiniti di performance (ad es. recuperi tra 80-120%, CV <15% per concentrazioni nell'ordine dei decimi di µg/L, ecc.) i metodi saranno considerati idonei per l'analisi dei campioni dello studio. In caso di problemi in fase di validazione, verranno intraprese azioni correttive (ad esempio ulteriore pulizia del bianco strumentale, ottimizzazione delle condizioni cromatografiche, esclusione di interferenze mediante aggiustamenti del protocollo) prima di procedere. Questa fase di validazione preventiva è fondamentale per assicurare che i dati prodotti siano affidabili e scientificamente solidi, un requisito cruciale vista la natura multicentrica del progetto.

8.4. Eventi Avversi (AE) ed Eventi Avversi Gravi (SAE)

8.4.1. Definizione di evento avverso

Per evento avverso (AE) si intende qualsiasi manifestazione medica indesiderata associata all'uso di un intervento/procedura sull'essere umano, indipendentemente dal fatto che sia considerata correlata all'intervento oppure no.

Gli eventi avversi che iniziano o peggiorano dopo la firma del consenso informato devono essere registrati nell'eCRF dedicata agli Eventi Avversi. Le condizioni preesistenti al momento del consenso informato devono essere documentate nella sezione "Storia Medica" dell'eCRF del partecipante. Gli eventi avversi (incluse le alterazioni di laboratorio che costituiscono AE) devono essere descritti, quando possibile, utilizzando una diagnosi clinica piuttosto che i singoli segni e sintomi. Quando non sia identificabile una diagnosi chiara, ciascun segno o sintomo deve essere riportato come evento avverso separato

8.4.2. Definizione di evento avverso grave

Un AE o una sospetta reazione avversa è considerata "grave" se, a giudizio dello sperimentatore o dello sponsor, comporta uno dei seguenti esiti:

- morte,
- evento avverso potenzialmente letale,
- ricovero ospedaliero o prolungamento di un ricovero preesistente,
- invalidità o incapacità persistente o significativa o compromissione sostanziale della capacità di svolgere le normali funzioni quotidiane,
- anomalia congenita/difetto alla nascita.

Eventi medici importanti che potrebbero non causare morte, mettere in pericolo la vita o richiedere ospedalizzazione possono comunque essere considerati gravi se, secondo il giudizio medico appropriato, potrebbero mettere a rischio il partecipante e richiedere un intervento medico o chirurgico per prevenire uno degli esiti sopra descritti.



Il Direttore:
Paolo Montuori

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

8.4.3. Classificazione degli eventi avversi

Per quanto possibile, ciascun evento avverso deve essere valutato per determinare:

- **Gravità (Severity)**
Lo Sperimentatore valuterà l'intensità di ciascun AE/SAE riportato e la classificherà in una delle seguenti categorie:
 - **Lieve:** evento facilmente tollerabile, causa minimo disagio e non interferisce con le attività quotidiane;
 - **Moderato:** evento che causa disagio tale da interferire con le normali attività quotidiane;
 - **Grave (di intensità):** evento che impedisce le normali attività quotidiane.

Nota: un AE di **intensità grave** non deve essere confuso con un **SAE** (serious). “Grave” indica l'intensità dell'evento; “serio/SAE” indica che soddisfa almeno uno dei criteri di cui alla **Sezione 9.4.2**. La gravità può anche essere classificata utilizzando i **NCI-CTCAE** quando appropriato.

- **Durata**
Registrare **data/ora di insorgenza** e **data/ora di risoluzione** (o stato al follow-up).
- **Correlazione con l'intervento/procedura**
Tutti gli AE devono essere valutati dal clinico che esamina il partecipante sulla base della **relazione temporale** con l'**intervento/procedura di studio** (es. prelievo, esame strumentale) e del giudizio clinico complessivo. L'espressione “**ragionevole possibilità**” di correlazione indica che esistono elementi, evidenze e/o argomentazioni a supporto di un nesso causale, e **non** la sola impossibilità di escluderlo. Devono essere considerate cause alternative (patologie sottostanti, terapie concomitanti, altri fattori di rischio), oltre alla sequenza temporale rispetto alla **procedura eseguita**.
- **Azione intrapresa in relazione all'intervento/procedura**
Indicare: **nessuna;** **sospensione/interruzione** della procedura; **modifica/adozione di misure di sicurezza** durante la procedura; **non applicabile;** **sconosciuto**. (*Voci riferite a “dosaggio” o “trattamento sperimentale” non si applicano in questo studio.*)
- **Uso di farmaci o terapie**
Indicare **nessun farmaco/terapia concomitante** oppure specificare **farmaci/terapie concomitanti** impiegati per trattare l'evento o le condizioni correlate.
- **Carattere di “serietà” dell'evento**
Indicare se si tratta di un **SAE** come definito alla **Sezione 9.4.2** e specificare il/i **criterio/i** soddisfatto/i.



Il Direttore:
Paolo Montuori

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

- **Esito dell'evento**

Non risolto/non guarito; risolto/guarito; in via di risoluzione/guarigione; risolto/guarito con esiti; fatale; sconosciuto.

8.4.4. Tempistiche e frequenza per la valutazione e il follow-up degli eventi

Tutti gli **AE** e **SAE** saranno raccolti **a partire dalla firma del consenso informato** fino a **7 giorni** (per gli AE non gravi) o **30 giorni** (per i SAE) **dopo l'ultima attività/intervento di studio** (es. ultima procedura prevista dal protocollo).

Eventi medici che insorgono dopo la firma del consenso informato ma **prima dell'esecuzione di qualsiasi procedura di studio** devono essere registrati nell'**anamnesi**.

Qualsiasi condizione medica presente al momento dell'arruolamento sarà considerata **condizione basale** e non sarà riportata come AE, salvo **peggioramento** durante il periodo di osservazione, che deve essere registrato come AE.

L'insorgenza di un AE/SAE può essere rilevata dal personale dello studio durante la visita, i contatti di follow-up o in occasione di cure mediche.

Gli eventi saranno seguiti fino alla **risoluzione** o **stabilizzazione**.

8.4.5. Segnalazione degli eventi avversi

Ogni **SAE**, indipendentemente dalla sospetta correlazione causale, che si verifichi **dopo la firma del consenso informato** e fino ad almeno **30 giorni dopo l'ultima procedura di studio**, deve essere **segnalato allo Sponsor entro 24 ore** da quando lo Sperimentatore ne viene a conoscenza. Qualsiasi informazione aggiuntiva relativa al SAE (complicazioni, progressione, episodi ricorrenti) deve essere segnalata come **follow-up** dell'evento originale **entro 24 ore** dalla ricezione di tali informazioni. Un SAE ritenuto completamente indipendente da uno già segnalato deve essere riportato **separatamente** come nuovo evento.

Le informazioni relative a tutti i SAE devono essere riportate nel **Modulo di Segnalazione dei SAE (SAE Report Form)**.

Lo Sperimentatore deve compilare tutte le sezioni applicabili del modulo, **valutare e registrare la correlazione di ciascun SAE con l'intervento/procedura di studio eseguita**, e inviare il modulo compilato entro 24 ore allo Sponsor.

Le informazioni di follow-up devono essere trasmesse con le stesse modalità del modulo iniziale. Ogni ricorrenza, complicazione o progressione dell'evento originale deve essere segnalata come **follow-up**, indipendentemente dal momento in cui si verifica. Le informazioni di follow-up devono indicare **se l'evento è risolto o in corso**, come è stato



trattato, e se il partecipante ha **proseguito o interrotto** la partecipazione allo studio. (Voci relative a “apertura del cieco” non sono applicabili in questo studio non farmacologico.)

Lo Sponsor è responsabile di notificare alle **Autorità regolatorie** qualsiasi **sospetta reazione avversa imprevista** fatale o pericolosa per la vita **il prima possibile e comunque non oltre 7 giorni di calendario** dal primo ricevimento delle informazioni

9. METODI STATISTICI

9.1. Definizione della dimensione campionaria

Il protocollo prevede di arruolare **2.600 soggetti** totali a livello nazionale, suddivisi equamente tra i 13 siti (Ministero della Salute, 2023). Ciò corrisponde in media ad oltre **200 soggetti per ciascun SIN**. Questo numero totale è frutto di un bilanciamento tra esigenze di **potenza statistica** e fattibilità logistica/economica. In particolare, una dimensione di 200 individui per sito è giudicata adeguata a:

- Stimare con precisione accettabile la **concentrazione media** dei vari biomarcatori di esposizione nella popolazione locale, con un intervallo di confidenza relativamente stretto. Ad esempio, assumendo una deviazione standard simile a studi precedenti, un campione di 200 soggetti consente di stimare una media con errore standard contenuto e di rilevare differenze di almeno 10-20% tra siti con potenza >80%.
- Consentire analisi stratificate per sottogruppi principali (ad es. sesso, classi d'età) all'interno di ciascun sito, mantenendo in ciascuna strato un numero di soggetti sufficienti ($n \approx 50$ per strato principale, vedi oltre) per calcoli statistici descrittivi.
- A livello nazionale, 2600 soggetti forniscono un database ampio, che permette anche analisi combinate (pooling) per studiare relazioni esposizione-effetto complessive con buona potenza. Rispetto a precedenti studi regionali (es. Studio SPES con 4200 soggetti in Campania) che avevano obiettivi simili, la dimensione qui scelta è proporzionata al numero di siti e ottimizzata per ottenere risultati confrontabili in tempi ragionevoli (SPES, 2016).

9.2. Allocazione del campione per sito

Sebbene l'intenzione sia di avere 200 partecipanti per ognuno dei 13 SIN, il protocollo mantiene una certa flessibilità per adattarsi alle dimensioni della popolazione residente in ciascun sito e ad eventuali difficoltà di reclutamento. In linea di massima:

- Nei SIN con popolazione residente numerosa (ad es. Taranto, Crotone, Bacino Sacco – ciascuno con decine di migliaia di residenti), 200 soggetti rappresentano un campione relativamente piccolo in termini percentuali, ma statisticamente sufficiente a descriverne la distribuzione delle esposizioni (circa lo 0,5-1% della popolazione adulta). Eventualmente, in tali siti ad alta popolazione, si potrà considerare di aumentare leggermente il campione per migliorare la precisione, compatibilmente con le risorse.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

- Nei SIN con popolazione limitata (ad es., area di Falconara Marittima, ecc., con pochi comuni interessati), 200 soggetti potrebbero rappresentare una quota consistente della popolazione eleggibile. In questi casi, l'arruolamento punterà comunque a 200, ma se proprio impossibile (popolazione troppo esigua o tasso di adesione basso) si accetterà un numero leggermente inferiore, compensando eventualmente con qualche soggetto in più in altri siti. L'obiettivo rimane comunque di mantenere la numerosità simile tra siti per uniformità.
- Va notato che 200 soggetti/sito è un numero inferiore ad alcuni studi di biomonitoraggio condotti in passato su un singolo sito ad alto impatto (dove si arrivava a 300-500 soggetti per sito) ma in questo caso, avendo una rete di 13 siti, si è scelto di **sacrificare parzialmente la numerosità locale** in favore di **coprire più siti** e dunque ottenere una visione nazionale complessiva (Ministero della Salute, 2023).
- Sebbene il target operativo sia di 200 partecipanti per ciascun SIN, qualora il tasso di adesione superi il previsto, il protocollo consente un over-recruitment controllato entro i limiti delle risorse disponibili (fino a un massimo del 50% per sito, fino a 300 soggetti).

L'eventuale eccedenza migliora la precisione delle stime, consente analisi stratificate aggiuntive (genere, età, sotto-aree), riduce l'impatto di dati mancanti e aumenta la potenza nelle analisi combinate. Le analisi inferenziali terranno conto di eventuali sbilanciamenti mediante pesi di campionamento e/o modelli gerarchici.

Eventuali aumenti sostanziali della numerosità saranno comunicati al Comitato Etico secondo le procedure di emendamento vigenti

9.3. Suddivisione per genere ed età

Il campione di 200 individui per sito sarà costruito in modo **stratificato**. Il disegno prevede di includere **100 maschi e 100 femmine** per ogni SIN, così da poter valutare le differenze di genere nei parametri misurati. All'interno di ciascun sesso, i soggetti saranno inoltre equidistribuiti in **classi di età** prestabilite. Si ipotizzano due fasce d'età per semplificare l'arruolamento e l'analisi: ad esempio 20-34 anni e 35-50 anni.

9.4. Calcolo della potenza statistica

Un'analisi a priori è stata condotta per garantire che il campione di 2600 individui totali sia in grado di rilevare gli effetti di interesse con sufficiente probabilità.

Ad esempio, supponendo di voler confrontare la concentrazione media di un dato metallo tra due siti specifici, con 200 soggetti per gruppo, è possibile identificare come statisticamente significativa ($\alpha=0,05$, potenza 80%) una differenza di media dell'ordine di 0,3-0,4 deviazioni standard. In termini pratici, se la deviazione standard di piombo nel



sangue è ~20 µg/L (stima ipotetica), il disegno consente di rilevare differenze di circa 8 µg/L tra due siti come significative.

Inoltre, per correlazioni esposizione-effetto sull'intero campione (n=2600), il minimo coefficiente di correlazione rilevabile come significativo è attorno a $r=0,06-0,07$, il che dà buona sensibilità per cogliere anche associazioni deboli a livello popolazioneale. Questi valori indicano che lo studio è dimensionato in modo adeguato a raggiungere i suoi obiettivi conoscitivi, considerato che la finalità principale dello studio è **descrittivo-comparativa ed esplorativa**: l'intento è tracciare un profilo espositivo e individuare segnali di rischio. Da questo punto di vista, 200 soggetti per sito offrono già un quadro robusto.

9.5. Logistica del campionamento

Per arruolare 200 soggetti in ciascun SIN si terrà conto di possibili perdite e non adesioni. In genere, ci si aspetta un tasso di partecipazione del 60-70% tra gli invitati, sulla base di esperienze analoghe (Pisani *et al.*, 1997; SPES, 2016). Pertanto, potrebbe essere necessario invitare circa 300-350 persone per ottenere 200 adesioni per sito. Questo aspetto viene affrontato nel *Piano di campionamento stratificato (par. 7.1)* che descrive come verranno selezionati e contattati i candidati e come si procederà nel caso di rifiuti o indisponibilità.

In definitiva, la popolazione bersaglio e la dimensione campionaria sono state definite in modo da garantire **rappresentatività, precisione statistica e fattibilità**: ogni SIN avrà una "fotografia" della propria situazione con 200 cittadini rappresentativi, e tutti insieme i 2600 cittadini forniranno la prima banca dati nazionale integrata sull'esposizione a contaminanti ambientali nei siti contaminati d'Italia. I risultati potranno anche essere confrontati con quelli di popolazioni generali italiane non esposte (qualora disponibili da altri studi, come PROBE o indagini ISS), per contestualizzare le differenze (Erspamer *et al.*, 2011).

9.6. Piano Statistico e Analisi dei Dati

Il protocollo prevede un dettagliato piano di analisi statistica per garantire che gli obiettivi scientifici vengano raggiunti con adeguata potenza e rigore metodologico. **Dimensione campionaria**: Sulla base di ipotesi preliminari, è stato effettuato un calcolo della dimensione campionaria necessario per confrontare i livelli medi di esposizione (biomarcatori) tra diversi gruppi di popolazione (ad esempio, residenti in vari SIN e gruppi di controllo). Si è assunto di rilevare una differenza minima di circa il 20% di una deviazione standard tra gruppi, con livello di significatività $\alpha=0,05$ e potenza statistica dell'80%. Questo corrisponde a un *effect size* di circa 0,125, cioè al limite minimo di rilevanza secondo Cohen (1988). In base a tali parametri e considerando un'analisi ANOVA a una via per confrontare più gruppi contemporaneamente, il numero totale di partecipanti necessario risulta dell'ordine di qualche migliaio di soggetti. In particolare, si prevede di arruolare almeno **200 soggetti per ciascun sito SIN** investigato e per ciascun gruppo di controllo, così da assicurare robustezza statistica anche qualora alcuni partecipanti si ritirino o vi siano dati mancanti. Questa numerosità garantirà il confronto affidabile fra sottogruppi (ad esempio confronto interregionale) e l'analisi di associazioni esposizione-



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

effetto all'interno di ciascun gruppo (Cohen, 1988). Eventuali aggiustamenti della dimensione campionaria potranno essere effettuati in itinere qualora, per motivi pratici, non fosse possibile raggiungere il target prefissato in qualche area, tenendo conto comunque della minimizzazione dell'errore di **tipo II** (falsi negativi).

Gestione ed analisi dei dati: Tutti i dati raccolti (risultati analitici di laboratorio, parametri clinici, informazioni da questionari) confluiranno in un **database centralizzato** presso il Centro Coordinatore. I dati saranno registrati in forma codificata per garantire la riservatezza (vedi sez. 11) e sottoposti a procedure di *data cleaning* (controllo di qualità, verifica di outlier, gestione dei dati mancanti). Le analisi statistiche descrittive iniziali riporteranno le distribuzioni dei contaminanti misurati (metalli, inquinanti organici persistenti, PFAS) e degli indicatori biologici di effetto (biomarcatori clinici di stress ossidativo, infiammazione, funzione d'organo, ecc.), stratificate per sito di provenienza, genere, fascia d'età e altri fattori rilevanti. Si useranno test statistici appropriati per la natura dei dati: ad esempio, test di **Kolmogorov-Smirnov** o Shapiro-Wilk per valutare la normalità delle distribuzioni, quindi test **parametrici** (ANOVA, t-test) o **non parametrici** (Kruskal-Wallis, U di Mann-Whitney) per confronti tra gruppi, a seconda dei casi. In particolare, per confrontare i **livelli di esposizione tra diversi SIN** (ad esempio concentrazione di metalli nel sangue in popolazioni di siti diversi) sarà impiegata un'analisi della varianza a una via (ANOVA) o modelli lineari generalizzati, con eventuale post-hoc (Tukey o Dunnett) per identificare differenze specifiche tra coppie di gruppi. Qualora i dati mostrassero deviazioni significative dalla normalità o varianze eterogenee, si ricorrerà a opportune trasformazioni (ad es. logaritmica per concentrazioni di contaminanti fortemente asimmetriche) oppure a test non-parametrici robusti.

Analisi multivariate e correlazioni esposizione-effetto: Un obiettivo cruciale dell'analisi è verificare l'esistenza di relazioni statisticamente significative tra i livelli di esposizione interni ai contaminanti e gli effetti sanitari precoci misurati. A tal fine, si condurranno analisi multivariate, ad esempio modelli di **regressione lineare** o **logistica** a seconda della natura della variabile di esito, includendo come variabili indipendenti i biomarcatori di esposizione (es. concentrazione ematica di piombo, livelli sierologici di PFAS, ecc.) e come variabili dipendenti i marcatori biologici di effetto (es. enzimi epatici, parametri infiammatori, indicatori di danno al DNA). Tali modelli saranno **aggiustati per potenziali fattori di confondimento**, quali l'età, il genere, l'indice di massa corporea, l'abitudine al fumo, lo stato socio-economico e altre esposizioni non legate all'ambiente (ad esempio esposizioni occupazionali o stili di vita). Questo approccio permetterà di isolare l'associazione specifica tra esposizioni ambientali e outcome biologici, riducendo il rischio di bias. In caso di **relazioni non lineari** o interazioni tra contaminanti (ad esempio effetti combinati di miscele di sostanze), si valuterà l'uso di modelli statistici avanzati, come modelli ad effetti misti (per tenere conto di eventuali eterogeneità interregionali o intra-familiari) oppure tecniche di analisi di *mixture* (ad esempio l'indice di rischio cumulativo o modelli di regressione multipla con termini di interazione) per comprendere meglio l'effetto simultaneo di più agenti chimici. Tutti i risultati principali saranno presentati con intervalli di confidenza al 95%, in modo da evidenziare l'incertezza statistica delle stime.

Software e procedura: Le analisi statistiche saranno condotte utilizzando software validati e riconosciuti in ambito accademico (es. R, STATA o SPSS), e l'intero piano di



analisi verrà definito *a priori* nel **Statistical Analysis Plan** allegato al protocollo. In questo modo, si evitano analisi esplorative non pianificate che possano aumentare il rischio di risultati falsi-positivi. Qualsiasi deviazione dal piano originale (ad esempio analisi aggiuntive suggerite dai dati) sarà documentata e motivata. Inoltre, per incrementare la trasparenza, l'output delle analisi (tabelle di dati aggregati, script anonimizzati) potrà essere condiviso con la comunità scientifica secondo i principi di *open science* al termine dello studio.

Considerazioni aggiuntive: Prima dell'analisi finale, si effettuerà un controllo incrociato dei dati con le fonti originali (laboratori e questionari) per assicurare l'accuratezza. Saranno eseguite analisi di sensibilità, ad esempio escludendo dal campione eventuali soggetti con elevata percentuale di dati mancanti o con valori estremi potenzialmente influenzanti (outlier influenti), per verificare la robustezza dei risultati. Nel caso di **dati mancanti non ignorabili** (ad esempio perdita al follow-up di un numero significativo di partecipanti, o mancata esecuzione di alcuni esami in determinati soggetti), si potrà ricorrere a metodi di imputazione statistica (ad esempio *multiple imputation*) al fine di valutare se i risultati restano coerenti. L'intero impianto statistico sarà sviluppato e supervisionato dal Ministero della Salute. Infine, i risultati saranno interpretati alla luce della letteratura scientifica esistente, per confrontare le evidenze emerse dallo studio INSINERGIA con quanto noto sugli effetti dei contaminanti ambientali sulla salute umana.

10. GESTIONE DEI DATI

10.1. Sistema Informativo e Gestione dei Dati

lo studio INSINERGIA si avvarrà di un Sistema Informativo integrato – includente un LIMS (Laboratory Information Management System) e moduli dedicati alla gestione dei dati anagrafici, clinici, questionari (eCRF) e di consenso.

Questo sistema informativo funge da spina dorsale digitale del progetto, collegando fra loro gli ambulatori di prelievo, i laboratori analitici e il centro di coordinamento, e garantendo allo stesso tempo che i dati personali dei partecipanti siano sempre protetti e trattati in forma codificata.

Caratteristiche del LIMS/eCRF e flusso dei dati: sin dal momento dell'arruolamento, ogni partecipante viene registrato nel sistema informativo centrale. Al soggetto viene assegnato un codice univoco (ID) che verrà utilizzato su tutti i campioni e documenti, in modo da scollegare il nome/cognome dai dati sensibili durante le fasi operative. I dati anagrafici e il codice sono conservati in un database sicuro separato, accessibile solo al personale autorizzato, mentre il codice ID è quello che identifica il campione ed è visibile ai laboratori (pseudonimizzazione).

Il LIMS è configurato in modo tale che, quando un operatore in ambulatorio effettua un prelievo, possa inserire in tempo reale nel sistema le informazioni del campione (tipo di matrice, ora di prelievo, codice operatore, etc.) tramite un'interfaccia web dedicata o con scanner di barcode. Questi dati confluiscono sul server centrale e diventano subito disponibili al laboratorio che dovrà analizzare il campione: ciò consente di tracciare in ogni istante dove si trova ciascun campione, quale test è previsto, e di pianificare le attività di laboratorio. Il LIMS supporta l'intero ciclo analitico: ogni laboratorio, una volta eseguita



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

una determinata analisi, inserisce o importa nel sistema i risultati grezzi (ad esempio concentrazione di piombo misurata) associandoli all'ID del campione e al metodo utilizzato. Sono previsti controlli di congruenza (es: unità di misura uniformi, range accettabili) e la doppia verifica dei risultati da parte di un supervisore prima che vengano marcati come "validati" nel sistema. Solo i dati validati confluiranno nel dataset finale per l'analisi epidemiologica. Questo flusso digitale minimizza gli errori di trascrizione e assicura che per ogni campione vi sia un *audit trail* completo (chi ha inserito i dati, quando, eventuali modifiche, etc.). Inoltre, il sistema è in grado di generare report riassuntivi e indicatori di avanzamento (es. numero di campioni analizzati, percentuale di risultati disponibili per ciascun indicatore, ecc.), utili al coordinamento per monitorare l'andamento del progetto in tempo reale.

Il modulo della eCRF invece consente allo sperimentatore l'inserimento nel database di studio di tutte le informazioni relative al paziente, in forma pseudonimizzata, e richieste dallo studio (dati anagrafici, anamnestici, esame obiettivo, segni vitali, esiti delle valutazioni diagnostiche, etc.)

Garanzie di sicurezza e privacy dei dati: la piattaforma informatica è sviluppata in conformità al Regolamento UE 2016/679 (GDPR) e alla normativa italiana in materia di protezione dei dati personali (D.lgs. 196/2003 e s.m.i.). In pratica, questo si traduce in diverse misure tecniche e organizzative. Anzitutto, come detto, i dati personali identificativi (nome, indirizzo, codice fiscale) sono tenuti separati dai dati sanitari e ambientali raccolti, attraverso la pseudonimizzazione via codice. Il collegamento tra codice e identità è custodito in forma crittografata sui server regionali, accessibile solo al personale del centro (principal investigator regionale, data manager) con autenticazione a più fattori. Tutti i dati in transito (ad esempio durante la sincronizzazione tra un tablet in ambulatorio e il server centrale) sono cifrati mediante protocolli sicuri (HTTPS/TLS), così come i database centrali risiedono su server protetti da firewall, antivirus e sistemi di intrusion detection costantemente aggiornati. L'accesso al sistema informativo richiede credenziali individuali e profilazione degli utenti per ruolo: ad esempio, un tecnico di laboratorio potrà vedere solo i campioni e risultati anonimi a lui assegnati, ma non accedere ad altre informazioni; i coordinatori nazionali potranno vedere i dataset aggregati per analisi, ma non risalire direttamente all'identità dei partecipanti. Ogni accesso e operazione sensibile sul sistema viene loggata per eventuali audit. Inoltre, in accordo con le procedure GDPR, è stato nominato un Responsabile della Protezione Dati (DPO) del progetto, che ha supervisionato la stesura di un dettagliato Piano di gestione dei dati (DMP) e di un'analisi di impatto privacy (DPIA) data la natura di trattamento di dati sanitari su larga scala.

Gestione dei consensi e diritti degli interessati: il sistema informativo comprende un modulo dedicato alla gestione elettronica dei consensi informati e delle preferenze espresse dai partecipanti. Ogni individuo, al momento dell'arruolamento, firma un consenso informato che copre la raccolta dei campioni, le analisi previste e l'eventuale conservazione per futuri studi correlati. Queste informazioni vengono registrate nel database; in tal modo, il LIMS "sa" per ciascun campione se l'uso è consentito solo per certi scopi o entro certi limiti temporali. Un aspetto all'avanguardia, proposto e sviluppato



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

dalla Regione Lombardia, è l'implementazione di una piattaforma software interattiva per i partecipanti, attraverso cui ciascun cittadino coinvolto può avere visibilità e controllo sui propri campioni archiviati (RIAS, 2023). In concreto, ad ogni partecipante verrà data la possibilità di accedere ad un portale online sicuro (o app mobile) dove, mediante le proprie credenziali, potrà visualizzare informazioni generali sullo studio e, in particolare, lo stato dei suoi campioni: ad esempio, potrà vedere se il suo campione di sangue è ancora conservato in biobanca, se è stato parzialmente utilizzato per analisi aggiuntive, e i risultati di eventuali test effettuati su di esso (RIAS, 2023). Questo strumento aumenta la trasparenza verso i cittadini, rafforzando la fiducia nel progetto. Inoltre – ed è un punto chiave – la piattaforma consentirà di gestire i consensi dinamici: qualora emergesse la necessità di effettuare analisi supplementari non previste inizialmente (ad esempio un nuovo biomarcatore di effetto su quei campioni), sarà possibile chiedere ai partecipanti un consenso aggiuntivo specifico tramite il portale (RIAS, 2023). L'interessato potrà leggere la spiegazione della nuova analisi e dare o negare il consenso con un semplice click, il che verrà registrato automaticamente nel database. Parimenti, il partecipante potrà in qualsiasi momento revocare il consenso precedentemente dato per l'uso del proprio materiale biologico (RIAS, 2023): in tal caso, il sistema segnalerà immediatamente che i campioni di quella persona non sono più utilizzabili per ulteriori analisi, e attiverà la procedura di eventuale eliminazione/smaltimento secondo le regole etiche (fermo restando l'uso di dati anonimi già prodotti in forma aggregata, come da legge). Questa gestione dinamica e centralizzata del consenso è un elemento di forte innovazione, reso possibile dall'infrastruttura digitale e dall'impegno del progetto a rispettare pienamente i diritti degli interessati come da GDPR (diritto di accesso, revoca, limitazione del trattamento, ecc.).

Integrazione dati e privacy: il sistema informativo consente infine di integrare in modo controllato i dati di biomonitoraggio con altre informazioni sanitarie o ambientali, ai fini delle analisi epidemiologiche previste, mantenendo però la privacy individuale. Ad esempio, potrà essere necessario incrociare i livelli di contaminanti nel sangue con i dati sanitari storici dei partecipanti (ricoveri, patologie) per formulare ipotesi sugli effetti sanitari (Obiettivo Specifico 4). Questo incrocio verrà realizzato all'interno di aree riservate del sistema: i dataset sanitari pregressi, ottenuti dai database regionali (es. archivio SISS in Lombardia o Schede di Dimissione Ospedaliera) saranno prima pseudonimizzati d'origine (sostituendo i codici fiscali con gli stessi ID univoci assegnati nel progetto, attraverso l'uso di algoritmi di *record linkage* privacy-preserving). Solo dopo questa operazione, i dati clinici verranno importati nel database centrale e collegati ai risultati di biomonitoraggio tramite l'ID comune. In tal modo, i ricercatori potranno effettuare analisi statistiche sulle associazioni esposizione-effetto senza mai vedere i nominativi dei partecipanti. L'accesso ai dataset integrati sarà consentito solo a membri autorizzati del team analitico, e sempre in forma anonima. Ogni pubblicazione o report prodotto riporterà esclusivamente dati aggregati (ad esempio medie, percentili, correlazioni) e mai informazioni individuali identificabili. Per rafforzare la *governance* dei dati, è istituito un Comitato di gestione del sistema informativo che include il DPO, rappresentanti delle regioni partecipanti e informatici esperti: tale comitato supervisiona l'implementazione delle misure di sicurezza, gestisce eventuali incidenti (*data breach*) secondo quanto



previsto dal GDPR (notifica entro 72 ore, ecc.), e garantisce che i flussi di dati rispettino i principi di minimizzazione e finalità dichiarati. Sono anche previste sessioni di formazione specifica per tutti gli operatori sull'uso del LIMS e sulle buone pratiche di protezione dei dati, cosicché la cultura della privacy sia condivisa a tutti i livelli del progetto.

10.2. Dati Originali e Documenti essenziali

I dati originali (source data) comprendono tutte le informazioni, registrazioni originali dei risultati clinici, osservazioni o altre attività svolte durante la sperimentazione, necessarie per la ricostruzione e la valutazione dello studio.

Lo sperimentatore è tenuto a mantenere dati originali accurati che supportino le informazioni inserite nell'eCRF.

La documentazione dello studio deve essere conservata secondo quanto indicato nelle Linee Guida di Buona Pratica Epidemiologica e in conformità con le normative e/o linee guida applicabili.

Lo sperimentatore/l'istituzione deve adottare misure per prevenire la distruzione accidentale o prematura di tali documenti.

Lo sperimentatore deve consentire l'accesso diretto ai dati originali per attività legate alla sperimentazione, tra cui:

- Audit;
- revisioni da parte del Comitato Etico;
- ispezioni da parte delle autorità regolatorie.

Tutti i documenti e registrazioni, compresi i moduli di consenso informato firmati (ICF), relativi alla conduzione dello studio, devono essere conservati dallo sperimentatore per almeno 15 anni dopo il completamento dello studio, salvo disposizioni locali o politiche istituzionali che prevedano un periodo di conservazione più lungo.

Durante tale periodo, nessun documento potrà essere distrutto o trasferito ad altro luogo o soggetto senza autorizzazione scritta dello sponsor.

11. CONSIDERAZIONI ETICHE E SUPERVISIONE DELLO STUDIO

Il progetto INSINERGIA, in quanto studio multicentrico nazionale, sarà sottoposto alla valutazione e approvazione di un Comitato Etico indipendente. In ottemperanza alla normativa vigente, è previsto che un Comitato Etico "centrale" (individuato tra quelli territorialmente competenti, ad esempio presso il Centro Coordinatore o presso l'IRCCS di riferimento) esamini il protocollo generale dello studio. Tale Comitato Etico valuterà tutti gli aspetti etici: il razionale scientifico, le modalità di reclutamento dei partecipanti, i criteri di inclusione/esclusione, i materiali informativi e il questionario somministrato, le procedure di raccolta dei campioni biologici e la loro conservazione, nonché il piano di analisi dei dati. Una volta ottenuto il parere favorevole dal Comitato Etico designato, ciascun centro partecipante (le Regioni coinvolte tramite le rispettive strutture sanitarie) si atterrà alle indicazioni fornite. Eventuali adattamenti locali (es. nominativi di referenti o logistica) saranno sottoposti a emendamenti o pareri per competenza, ma la governance etica resterà centralizzata per garantire uniformità nelle tutele dei partecipanti su tutto il territorio nazionale. Il progetto sarà inoltre condotto in conformità ai principi della



Dichiarazione di Helsinki (WMA, 2024) e delle Linee Guida di Buona Pratica Epidemiologica, assicurando il rispetto della dignità, dei diritti e del benessere dei soggetti coinvolti.

11.1. Consenso informato

Ogni partecipante sarà adeguatamente informato sugli scopi e le procedure dello studio prima dell'adesione. Sarà fornito e illustrato un Foglio Informativo dettagliato, redatto in linguaggio chiaro e accessibile, che descrive gli obiettivi del progetto, i benefici attesi e i potenziali rischi/conseguenze legati alla partecipazione. In particolare, verranno spiegati: la natura dei campioni biologici raccolti (sangue, urine, etc.), il volume dei prelievi e la frequenza, le analisi che verranno effettuate su tali campioni, e cosa comporta in termini di impegno per il partecipante (es. compilazione del questionario, eventuale digiuno prelievo, etc.). Saranno inoltre specificati i possibili rischi fisici minimi associati al prelievo venoso (ad esempio lieve dolore nel sito di puntura, piccoli ematomi, raramente lipotimia) e le misure adottate per minimizzarli (personale sanitario qualificato, uso di materiale sterile monouso, osservazione post-prelievo in sala d'attesa). Il partecipante avrà tempo adeguato a porre domande e decidere liberamente se aderire. In caso affermativo, gli sarà richiesto di firmare uno Specifico Consenso Informato. Il consenso informerà anche della possibilità di conservare i campioni in una biobanca per future analisi correlate al tema ambientale: il soggetto potrà scegliere liberamente se acconsentire o meno all'uso futuro del proprio campione per ulteriori ricerche (opzione di *biobanking*). In ogni momento, comunque, ogni partecipante mantiene il diritto di ritirarsi dallo studio senza alcuna penalizzazione o conseguenza sull'assistenza sanitaria a cui ha diritto. In caso di recesso, il partecipante potrà richiedere la distruzione dei propri campioni biologici ancora conservati (fatta eccezione per quelli già analizzati, poiché i dati derivati da essi potrebbero essere già utilizzati in forma anonima nei risultati aggregati). Questo diritto sarà esplicitato nel modulo di consenso e ribadito durante il percorso di partecipazione. Il progetto adotterà procedure per gestire tali eventuali ritiri: ad esempio, un sistema informatizzato permetterà di registrare il ritiro e generare una conferma scritta dell'avvenuta distruzione dei campioni residui, tutelando così la volontà del partecipante.

11.2. Confidenzialità e Privacy

La gestione dei dati personali e sensibili avverrà nel pieno rispetto del Regolamento (UE) 2016/679 (GDPR) e della normativa italiana in materia di privacy (European Parliament, 2016).

Il Centro di sperimentazione e il Dipartimento di Sanità Pubblica dell'Istituto Superiore di Sanità agiscono come Titolari autonomi del trattamento, limitatamente alle attività di rispettiva competenza. I dati saranno pseudonimizzati, conservati in archivi sicuri e trattati esclusivamente per finalità di ricerca scientifica, sulla base del consenso esplicito dei partecipanti (art. 6, par. 1, lett. a) e art. 9, par. 2, lett. a) GDPR).

Fin dalla fase di raccolta, a ogni partecipante sarà assegnato un codice univoco; i dati identificativi (nome, contatto, codice fiscale) saranno conservati separatamente dai dati sanitari e ambientali raccolti. I laboratori e i ricercatori lavoreranno principalmente con



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

dati trattati in forma codificata: sui campioni e nei database sarà presente solo il codice identificativo.

Soltanto il personale autorizzato (ad esempio i data manager del progetto presso il centro coordinatore) avrà accesso alla lista di collegamento tra codici e identità, necessaria per comunicare i risultati individuali o gestire eventuali ritiri. Questa lista sarà custodita in ambiente protetto e accessibile con credenziali a doppia autenticazione, minimizzando il rischio di accessi non autorizzati.

Tutti i supporti informatici saranno protetti da crittografia e i trasferimenti di dati tra centri (ad es. invio di risultati di laboratorio al database centrale) avverranno tramite canali sicuri (VPN o piattaforme cifrate approvate). Non è previsto in alcun momento che dati personali escano dall'Unione Europea; in ogni caso, qualsiasi trasferimento di dati sarà regolato dalle clausole contrattuali tipo previste dal GDPR.

Il Promotore ha inoltre nominato un Responsabile della Protezione Dati (DPO), che vigilerà sulla conformità delle procedure privacy e fungerà da referente per eventuali richieste dei partecipanti riguardo i propri dati (diritto di accesso, rettifica, cancellazione). Al termine dello studio, i dati personali saranno conservati solo per il tempo necessario a completare eventuali follow-up e diffondere i risultati, dopodiché saranno cancellati o resi definitivamente anonimi. I risultati scientifici saranno pubblicati solo in forma aggregata, tale da non permettere in alcun modo l'identificazione dei singoli partecipanti.

I dati personali e le informazioni raccolte nel corso dello studio saranno conservati per un periodo massimo di 10 (dieci) anni dalla conclusione del progetto di ricerca, al fine di consentire la verifica dei risultati scientifici, la gestione di eventuali controlli da parte delle autorità competenti e la redazione di ulteriori pubblicazioni scientifiche correlate.

Trascorso tale periodo, i dati saranno anonimizzati in modo irreversibile o, qualora ciò non sia possibile, cancellati in modo sicuro secondo le procedure interne del Titolare e nel rispetto del Regolamento (UE) 2016/679 (GDPR) e delle Linee Guida del Garante per la protezione dei dati personali relative al trattamento per finalità di ricerca scientifica.

Eventuali campioni biologici associati ai dati seguiranno lo stesso periodo di conservazione, salvo consenso esplicito del partecipante per un uso futuro, come descritto nel modulo di consenso informato.

11.3. Monitoraggio Etico

Durante l'implementazione dello studio, sarà attivo un piano di monitoraggio etico continuo. Il Comitato Etico potrà essere aggiornato periodicamente sull'andamento della ricerca, soprattutto in caso di modifiche al protocollo o di segnalazione di eventi avversi inattesi. Essendo uno studio interventistico a basso livello di intervento, non ci si attendono eventi avversi seri legati alla partecipazione; tuttavia, qualsiasi incidente o problema (ad esempio violazione della riservatezza, inconveniente durante un prelievo, lamentela formale di un partecipante) sarà documentato e comunicato tempestivamente secondo le procedure di *safety reporting*. Un apposito Comitato di Monitoraggio Interno (composto dal Principal Investigator nazionale, da un esperto di bioetica e da un rappresentante dei partecipanti/associazioni locali) esaminerà tali segnalazioni e proporrà eventuali azioni correttive.

In sintesi, il progetto INSINERGIA dedica massima attenzione agli aspetti etici, dalla pianificazione alla conduzione e diffusione dei risultati. Attraverso l'approvazione



preventiva da parte di un Comitato Etico, l'ottenimento di un consenso informato libero e consapevole, la rigorosa protezione dei dati personali (GDPR) e un'attenta gestione di tutti i potenziali rischi, si garantisce il rispetto dei partecipanti e si favorisce un clima di fiducia indispensabile per il buon esito dello studio (WMA, 2024; European Parliament, 2016).

11.4. Quality Assurance and Quality Control

Nell'ambito dello studio INSINERGIA sarà implementato un robusto sistema di QA/QC durante tutta la fase analitica. Alcuni elementi chiave di tale sistema sono:

- *Controlli interni di qualità:* ogni serie analitica includerà campioni di controllo a diversi livelli di concentrazione. Ad esempio, per le analisi ICP-MS di metalli nel sangue, verranno inseriti campioni controllo basso, medio e alto (preparati da pool di sangue con concentrazioni note o materiali di riferimento) ogni 10-20 campioni sconosciuti, per monitorare la stabilità della risposta dello strumento. Analogamente, nei *batch* di analisi dei POP/PFAS, saranno analizzati estratti di siero di controllo con concentrazioni note per verificare che la sensibilità e l'accuratezza rimangano costanti. Se un controllo interno risulta fuori dai limiti di accettazione predefiniti (ad es. ± 2 deviazioni standard dalla media storica), il batch viene rianalizzato o si identifica e corregge la causa (problema di calibrazione, deriva strumentale, etc.) prima di procedere.
- *Doppie analisi e ciechi:* una percentuale (p.es. 5-10%) di campioni biologici sarà analizzata in duplicato a scopo di controllo. Inoltre, saranno distribuiti ai laboratori alcuni campioni in cieco (codificati in modo da non essere distinguibili dai campioni reali, ma in realtà duplicati o standard aggiunti dal coordinamento) per valutare l'eventuale *bias* del laboratorio. Questa pratica consente di misurare la precisione inter-laboratorio e identificare discrepanze. Se, ad esempio, un laboratorio tende sistematicamente a dare risultati leggermente più alti o più bassi rispetto ad un altro analizzando lo stesso campione in cieco, il coordinamento potrà intervenire con una calibrazione incrociata o un riconoscimento del fattore di correzione.
- *Circuiti di Proficiency Test esterni:* per assicurare l'accuratezza a lungo termine, i laboratori partecipanti aderiranno, ove disponibili, a circuiti di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ) specifici per i parametri in esame. Ad esempio, il coordinatore potrà organizzare *round robin* interni al network inviando periodicamente aliquote di un medesimo campione (pool di siero, urine) a tutti i laboratori per l'analisi di certi analiti, e confrontando poi i risultati. In aggiunta, si farà riferimento a circuiti internazionali: esistono ad esempio i programmi G-EQUAS (German External Quality Assessment Scheme for toxicology) o quelli nell'ambito di HBM4EU per metalli e contaminanti organici. La partecipazione a questi *proficiency test* fornirà un riscontro indipendente delle prestazioni di ciascun laboratorio (con punteggi *z-score*, etc.). I risultati di tali circuiti saranno condivisi nel consorzio e, se un laboratorio evidenziasse performance subottimali su qualche analita, verrebbero



Il Direttore:
Paolo Montuori

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

intraprese azioni (formazione aggiuntiva, affiancamento da parte di laboratori più esperti, taratura strumentale, ecc.).

- *Tracciabilità e uniformità dei metodi:* tutti i laboratori dovranno operare in accordo a SOP (*Standard Operating Procedures*) comuni elaborate dal team di progetto. Queste SOP dettaglieranno ogni passaggio – dalla preparazione dei campioni (es. digestione acida per metalli, estrazione in fase solida per organici), alle condizioni strumentali, fino al calcolo dei risultati e alla calibrazione. Ogni deviazione dal metodo (*deviation report*) dovrà essere documentata e approvata. La CRO ed eventualmente di un board di esperti effettueranno audit o visite (anche virtuali) nei laboratori per verificare l'aderenza alle procedure. In tal modo si garantisce che, ad esempio, un "PCB nel siero" misurato in Lombardia segua lo stesso criterio di uno misurato in Veneto o Puglia, assicurando uniformità tecnico-scientifica su tutto il territorio (AReSS Puglia, 2023).
- *Accreditamento e qualificazione dei laboratori:* si privilegiano laboratori con accreditamento ISO 17025 per le prove analitiche pertinenti, oppure laboratori di sanità pubblica riconosciuti a livello nazionale. In Lombardia, ad esempio, i Laboratori di ARPA e della Rete Regionale di Sanità Pubblica (SRPS) coinvolti sono già dotati di sistemi qualità certificati e personale con elevata esperienza. Prima di iniziare le analisi del progetto, ogni laboratorio fornirà evidenza delle proprie competenze (CV degli operatori chiave, elenco apparecchiature, risultati di *proficiency* recenti) e sarà "qualificato" dal *management board* tecnico. In caso di necessità, saranno organizzati training interlaboratorio per condividere le *best practice* (ad esempio, un incontro pratico su preparazione dei campioni PFAS presso il laboratorio ISS).

Nel complesso, l'architettura di assicurazione di qualità (QA) e controllo di qualità (QC) prevista dal progetto INSINERGIA è molto solida e si avvale sia di supporti centrali che dell'expertise distribuita. La costituzione di un network di centri ed esperti in biomonitoraggio (Obiettivo Specifico 6) fa sì che ogni risultato analitico sia il frutto di un processo controllato e supervisionato collettivamente (AReSS Puglia, 2023). Un forte messa a sistema delle competenze regionali già esistenti sarà decisiva nel garantire la qualità uniforme dei dati prodotti e nel creare una comunità di pratica che potrà proseguire il proprio ruolo anche oltre la conclusione del progetto (AReSS Puglia, 2023). Infine, tutti i dati analitici generati (con relativi controlli) confluiranno nel sistema informativo centrale, permettendo verifiche incrociate e *audit trail* per ciascun valore (vedi sezione 14), a ulteriore garanzia dell'attendibilità e tracciabilità di ogni informazione scientifica raccolta.

11.5. Piano di Restituzione dei Risultati (individuale e collettivo)

In linea con i più recenti orientamenti etici, il progetto riconosce il *diritto di sapere* dei soggetti coinvolti, bilanciato da un dovere di comunicazione chiara e comprensibile da parte dei ricercatori (Brody *et al.*, 2014).



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

Restituzione individuale dei risultati: Ciascun partecipante, qualora lo desideri, potrà ricevere un **referto personale** con i propri risultati. In pratica, al termine delle analisi di laboratorio, ogni soggetto verrà informato della disponibilità dei propri dati e potrà scegliere se ottenere il referto individuale. Tale referto includerà: i valori misurati dei principali biomarcatori (ad esempio concentrazione di metalli nel sangue o nelle urine, livelli di PFAS, indicatori clinici come enzimi epatici, ecc.), confrontati – ove possibile – con valori di riferimento popolazionali o soglie normative (*benchmark* di letteratura o valori di riferimento biologici). Accanto ai numeri, verrà fornita una **spiegazione interpretativa** in linguaggio non tecnico: ad esempio, si indicherà se il valore riscontrato rientra nell'intervallo atteso per la popolazione generale o se è più elevato, illustrando però che il significato clinico di molte di queste misure non è necessariamente lineare (molti contaminanti non hanno standard di “normalità” stabiliti, ma se ne conosce il possibile impatto a lungo termine). L'obiettivo è **contestualizzare** il dato individuale per evitare allarmismi o false rassicurazioni: un valore alto verrà accompagnato da indicazioni su possibili azioni di mitigazione dell'esposizione (ad esempio consigli dietetici o comportamentali per ridurre l'assorbimento di certe sostanze), mentre un valore nella norma sarà comunque spiegato in termini di “assenza di evidenze di accumulo significativo”. Nel caso in cui vengano riscontrati in un partecipante **valori marcatamente elevati o anomali** per qualche parametro di rilevanza sanitaria (si pensi a livelli di piombo nel sangue superiori ai limiti di attenzione, o alterazioni cliniche importanti negli esami ematici), il team di progetto attiverà un canale di comunicazione dedicato: il medico referente contatterà individualmente quel partecipante per un colloquio approfondito. Durante questo colloquio, saranno fornite raccomandazioni specifiche e, se opportuno, il soggetto sarà indirizzato verso il Servizio Sanitario Nazionale per ulteriori accertamenti o interventi (ad esempio, tramite il proprio medico di base o i servizi di sanità pubblica locali, che verranno informati nel rispetto della privacy).

È importante sottolineare che la **facoltà di ricevere i risultati individuali è lasciata al partecipante**: nel consenso informato è prevista la possibilità di scegliere se ricevere o meno tale report personale. La letteratura etica sottolinea il rispetto di questa autonomia decisionale (Brody *et al.*, 2014). Per coloro che scelgono di ottenere il referto, il progetto predisporrà strumenti di comunicazione accessibili: ad esempio, un **portale web riservato** dove il partecipante, tramite credenziali sicure (SPID/CIE), potrà visualizzare e scaricare il proprio referto in formato digitale. In alternativa, per chi non ha familiarità con gli strumenti informatici, sarà offerta la possibilità di ritirare il referto cartaceo presso le strutture sanitarie locali coinvolte (ATS/ASL) o di riceverlo via posta tradizionale raccomandata. In ogni referto individuale saranno inoltre inseriti i **contatti di riferimento** (numero verde o e-mail del progetto) ai quali il partecipante potrà rivolgersi per qualsiasi chiarimento sui dati ricevuti.

Restituzione collettiva e pubblica: Oltre ai risultati individuali, INSINERGIA garantirà un ampio ritorno informativo a livello collettivo, coinvolgendo sia le comunità locali studiate sia l'intero pubblico interessato alle tematiche ambientali e di salute. Al termine delle analisi e dell'elaborazione dei dati, verrà redatto un **Rapporto di Sintesi Pubblico**, un documento divulgativo che riassumerà le principali evidenze emerse dallo studio. In questo rapporto saranno presentati i risultati in forma aggregata per ciascun territorio: ad esempio, i livelli medi e gli intervalli di concentrazione dei vari contaminanti misurati nei



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

partecipanti di ogni SIN, con confronti tra aree (senza mai identificare singoli individui). Si includeranno mappe o grafici che rendano intuitiva la comparazione del profilo di esposizione tra i siti investigati, evidenziando eventuali criticità (es. “nel SIN X riscontrati livelli medi di PCB più alti che altrove, probabilmente legati alla specifica storia industriale locale”) e punti di forza (es. “nel SIN Y i metalli pesanti risultano nei range di fondo, segno dell’efficacia di interventi di bonifica già attuati”). Accanto ai dati di esposizione, saranno sintetizzati anche i risultati sui biomarcatori di effetto (ad esempio percentuale di partecipanti con alterazioni enzimatiche correlate all’esposizione) e le eventuali correlazioni significative tra esposizione ed effetto osservate a livello statistico. Tutti questi risultati saranno discussi nel contesto scientifico più ampio, spiegando cosa implicano per la salute pubblica ma anche quali limiti interpretativi hanno (ad esempio: “è stato osservato un aumento del marker infiammatorio XYZ associato a maggior esposizione a PFAS, coerentemente con studi precedenti, ma ciò non equivale a dire che causi malattia, bensì indica un potenziale meccanismo da approfondire”). Il tono del rapporto sarà **informativo**, orientato a proporre soluzioni e raccomandazioni. Ad esempio, in presenza di contaminanti elevati, il rapporto potrà raccomandare di rafforzare il monitoraggio ambientale o le misure di prevenzione (es. controlli sulla catena alimentare se si rilevano contaminanti nei residenti potenzialmente originati da alimenti locali).

Questo **Rapporto di Sintesi** sarà diffuso attivamente: pubblicato sui siti web istituzionali dei partner (Ministero della Salute, Regioni partecipanti), eventualmente anche su piattaforme open-access, e comunicato alla stampa attraverso conferenze o comunicati stampa, in modo da raggiungere il vasto pubblico. Si prevede di corredare il rapporto con **infografiche** e tabelle di facile lettura, secondo i principi della comunicazione del rischio ambientale che favoriscono l’uso di elementi visivi per aumentare la comprensione anche in pubblico non specialistico (Brody *et al.*, 2014). Saranno sviluppati anche contenuti **multimediali**: ad esempio brevi video informativi o schede riassuntive per ciascuna Regione/SIN, che possano essere condivisi sui canali social istituzionali e nelle comunità locali.

Eventi di condivisione locale: Un aspetto chiave del piano di restituzione è il **coinvolgimento diretto delle comunità**. Dopo la pubblicazione del rapporto finale, ogni Regione coinvolta organizzerà uno o più incontri pubblici nel proprio territorio di riferimento (ad esempio presso il Comune o la sede dell’ASL locale). In questi eventi, aperti ai cittadini, verranno presentati e discussi i risultati specifici di quell’area. Saranno presenti rappresentanti del team scientifico (epidemiologi, tossicologi) che spiegheranno i dati e risponderanno alle domande del pubblico, nonché rappresentanti delle istituzioni locali (Sindaci, assessori, ARPA) per collegare i risultati alle possibili azioni di sanità pubblica. Questi **incontri pubblici** serviranno a promuovere una comprensione condivisa della situazione ambientale locale: i cittadini potranno capire cosa è stato trovato nel loro territorio e cosa si intende fare a riguardo. Inoltre, dando voce alle preoccupazioni o osservazioni del pubblico, si rafforza la fiducia nella ricerca e si raccolgono spunti utili per orientare eventuali interventi successivi. A supporto di tali eventi saranno distribuiti materiali divulgativi cartacei (opuscoli, volantini riassuntivi) e allestiti pannelli informativi. Qualora l’adesione in presenza fosse limitata (ad esempio per motivi logistici o sanitario-pandemici), gli eventi saranno trasmessi anche in streaming online e lasciati registrati a disposizione.



Comunicazione istituzionale e follow-up: Oltre agli eventi locali, i risultati di INSINERGIA saranno portati all'attenzione di **tavoli istituzionali nazionali**. Essendo un progetto di portata nazionale, le evidenze raccolte costituiranno un riferimento per Ministeri (Salute, Transizione Ecologica) e organi tecnici, al fine di orientare politiche e normative. Il piano di restituzione include l'invio di una relazione tecnica dettagliata alle autorità centrali, evidenziando eventuali necessità di intervento normativo o di finanziamento di bonifiche nei siti critici. Inoltre, i risultati scientifici più innovativi saranno pubblicati su riviste peer-reviewed e presentati a congressi, così da condividere le conoscenze acquisite con la comunità scientifica e internazionale. Infine, il progetto intende mantenere un **dialogo aperto con i partecipanti anche a studio concluso**: sul portale web dedicato sarà attiva una sezione di aggiornamento dove, ad esempio, si informeranno i cittadini su eventuali sviluppi successivi (nuovi studi, interventi di mitigazione avviati, etc.) scaturiti dai risultati di INSINERGIA. In questo modo, la restituzione non si esaurisce in un evento puntuale ma diviene parte di un processo continuo di informazione e miglioramento della salute ambientale.

In conclusione, il piano di restituzione dei risultati di INSINERGIA è stato disegnato per essere **esaustivo e rispettoso**: esaustivo nel fornire informazioni utili sia ai singoli cittadini coinvolti sia alla collettività e ai decisori pubblici; rispettoso nel salvaguardare l'autonomia e la sensibilità dei partecipanti, evitando di creare allarmi ma al contempo non omettendo nulla di ciò che è stato scoperto. Questo approccio risponde alle moderne linee guida etiche che vedono nella **condivisione dei risultati** una forma di restituzione dovuta verso chi ha partecipato allo studio e verso la società che potrà beneficiarne (Brody *et al.*, 2014).

11.6. Assicurazione

Lo Sponsor dichiara di aver stipulato una polizza assicurativa per responsabilità civile a copertura del presente studio clinico.

Tale polizza è conforme alle normative e ai requisiti locali vigenti.

L'assicurazione dello Sponsor non solleva lo Sperimentatore né i suoi collaboratori dall'obbligo di mantenere una propria copertura assicurativa per responsabilità professionale.

Una copia del certificato assicurativo sarà fornita al Comitato Etico e alle autorità regolatorie competenti.

11.7. Emendamenti al Protocollo

Qualsiasi modifica o integrazione al presente protocollo potrà essere effettuata solo tramite un emendamento scritto, che dovrà essere approvato dallo Sponsor e dal Comitato Etico (IRB/IEC).

Solamente gli emendamenti necessari per la sicurezza dei partecipanti potranno essere attuati prima dell'approvazione da parte del Comitato Etico.



12. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Erspamer L., Goldoni C.A., Fustinoni S. (2011). Il biomonitoraggio umano per misurare la contaminazione. *Ecoscienza*, 3: 42-43.
- Ministero dell'Ambiente (2006). Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n.152. Norme in materia ambientale – Parte IV, Titolo V (Bonifica di siti contaminati). *Gazzetta Ufficiale* n.88 del 14/04/2006.
- Ministero della Salute (2023). Progetto PNC InSinergia (2023-2025): Valutazione dell'esposizione di popolazione agli inquinanti organici persistenti, metalli e PFAS ed effetti sanitari nelle aree SIN. Direzione Generale Prevenzione Sanitaria, Roma. (Documento di progetto e obiettivi specifici).
- Pirastu R., Ancona C., Iavarone I., Mitis F., Zona A., Comba P. (2014). SENTIERI – Studio epidemiologico nazionale dei territori e insediamenti esposti a rischio da inquinamento: risultati. *Epidemiologia & Prevenzione*, 38(2) Suppl 1: 1-170.
- Pisani P., Faggiano F., Krogh V., et al. (1997). Relative validity and reproducibility of a food frequency dietary questionnaire for use in the Italian EPIC centres. *Int. J. Epidemiol.*, 26(Suppl 1): S152-S160.
- Pala V., Sieri S., Palli D., et al. (2003). Diet in the Italian EPIC cohorts: presentation of data and methodological issues. *Tumori*, 89(6): 594-607.
- Regione Piemonte (2019). Linee guida per i Dipartimenti di Prevenzione delle ASL sull'applicazione del biomonitoraggio umano e animale in situazioni di contaminazione ambientale. Progetto CCM 2014 – Regione Piemonte, Torino.
- SPES (2016). Protocollo dello studio SPES (Studio di Esposizione nella Popolazione Suscettibile). Versione 1.1 del 06/06/2016, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno & Regione Campania. (Documento tecnico interno).
- ISO (2017). UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2017. Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura. International Organization for Standardization.
- Brody J.G. et al. (2014). Reporting individual results for biomonitoring and environmental exposures: lessons learned from environmental communication case studies. *Environmental Health*, 13:40.
- Cohen J. (1988). *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences* (2nd ed.). Lawrence Erlbaum Associates.
- Esteban López M. et al. (2021). The European human biomonitoring platform – Design and implementation of a laboratory QA/QC programme for selected priority chemicals. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 237: 113821.
- European Parliament and Council (2016). Regulation (EU) 2016/679 of 27 April 2016 (General Data Protection Regulation).
- Erspamer L., Goldoni C.A., Fustinoni S. (2011). Il biomonitoraggio umano per misurare la contaminazione. *Ecoscienza*, 3: 42-43.
- Ministero dell'Ambiente (2006). Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n.152. Norme in materia ambientale – Parte IV, Titolo V (Bonifica di siti contaminati). *Gazzetta Ufficiale* n.88 del 14/04/2006.
- Ministero della Salute (2023). Progetto PNC InSinergia (2023-2025): Valutazione dell'esposizione di popolazione agli inquinanti organici persistenti, metalli e PFAS ed effetti sanitari nelle aree SIN. Direzione Generale Prevenzione Sanitaria, Roma. (Documento di progetto e obiettivi specifici).



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

- Pirastu R., Ancona C., Iavarone I., Mitis F., Zona A., Comba P. (2014). SENTIERI – Studio epidemiologico nazionale dei territori e insediamenti esposti a rischio da inquinamento: risultati. *Epidemiologia & Prevenzione*, 38(2) Suppl 1: 1-170.
- Pisani P., Faggiano F., Krogh V., et al. (1997). Relative validity and reproducibility of a food frequency dietary questionnaire for use in the Italian EPIC centres. *Int. J. Epidemiol.*, 26(Suppl 1): S152-S160.
- Pala V., Sieri S., Palli D., et al. (2003). Diet in the Italian EPIC cohorts: presentation of data and methodological issues. *Tumori*, 89(6): 594-607.
- Regione Piemonte (2019). Linee guida per i Dipartimenti di Prevenzione delle ASL sull'applicazione del biomonitoraggio umano e animale in situazioni di contaminazione ambientale. Progetto CCM 2014 – Regione Piemonte, Torino.
- SPES (2016). Protocollo dello studio SPES (Studio di Esposizione nella Popolazione Suscettibile). Versione 1.1 del 06/06/2016, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno & Regione Campania. (Documento tecnico interno).
- ISO (2017). UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2017. Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura. International Organization for Standardization.
- WMA (2024). World Medical Association Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects.
- ATSDR (2000). Polychlorinated Biphenyls (PCBs) Toxicological Profile. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services.
- Cheng, M., Mitra, A., Chatterjee, S., & Gupta, D.K. (2019). Environmental arsenic exposure and human health risk. In Fares, A. & Singh, S.K. (Eds.), *Arsenic in Drinking Water and Food* (pp. 181–198). Springer. (Arsenic exposure and human health)
- Couture, L.A. et al. (2006). Human biomarkers of organophosphate exposure. *Environmental Health Perspectives*, 114(7), 1106–1113.
- Grandjean, P. (1992). Individual susceptibility to toxicity. *Toxicology Letters*, 64–65, 43–51.
- Houston, M.C. (2007). The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, 13(2), 128–133.
- IARC (1997). Polychlorinated Dibenzo-para-dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans (IARC Monographs, Vol. 69). Lyon: International Agency for Research on Cancer. (Dioxins and dioxin-like compounds)
- IARC (2015). Pesticides and cancer risks. IARC Monographs – Volume 112: Evaluation of Five Organophosphate Insecticides and Herbicides. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- IARC (2018). Benzene – IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (updated evaluation, 2018). Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- Kazerouni, N. et al. (2001). Polycyclic aromatic hydrocarbons in human serum: Determinants and correlations with exogenous exposure. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 21(1–4), 95–101.
- Langrish, J.P. et al. (2014). Controlled exposures to air pollutants and risk of cardiac arrhythmia. *Environmental Health Perspectives*, 122(7), 746–752.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

- Lima, A.R. et al. (2013). Human plasma and urine biomarkers for exposure to environmental contaminants: A review of plasma bioassays. *Journal of Environmental Monitoring*, 15(11), 2384–2394. (Human plasma bioassays for environmental contaminants)
- Padrón, A. et al. (2010). Human biomonitoring of aromatic hydrocarbons: A review of analytical methods and exposure assessment. *Journal of Chromatography B*, 878(26), 2508–2516.
- Qin, P. et al. (2021). Long-term association of ambient air pollution and hypertension in adults and children: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Heart Association*, 10(11), e017524.
- Rohlman, D.S. et al. (2005). Human exposure to organochlorine pesticides: Biomarkers of exposure and effect. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1076, 335–345.
- Schünemann, F. et al. (2017). HBM4EU – Human Biomonitoring for the European Union: Objectives, framework, and first results. *European Journal of Public Health*, 27(6), 1022–1025.
- Shah, A. et al. (2003). Chlorinated hydrocarbons in human serum: Analytical methodology and epidemiological findings. *Journal of Chromatography B*, 794(1), 1–13.
- Sodhi, V.K. et al. (2020). The LIFEPAH Project: Advancing knowledge on aging and environmental determinants of health. *International Journal of Epidemiology*, 49(1), 254–255.
- Telisman, S. (1995). Interactions of essential and/or toxic metals and metalloids regarding interindividual differences in susceptibility to various toxicants. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 46(4), 459–476.
- Vandenberg, L.N. et al. (2012). Human exposure to bisphenol A (BPA) and the link with human health effects. *Reproductive Toxicology*, 33(4), 575–608. (Bisphenol A and human health)
- Van den Reek, J.M. et al. (2020). The role of cytokines in chronic inflammatory skin diseases. *Journal of Dermatological Science*, 99(3), 162–170.
- Vighi, M. et al. (2009). Assessment of organic pollutants using bioassays: Role and perspectives in human biomonitoring. *Chemosphere*, 74(7), 980–986.
- Vineis, P. et al. (2018). EXPOsOMICS: A new approach to integrate exposure and health data in epidemiological research. *Environmental Health Perspectives*, 126(9), 097002.
- Xu, W. et al. (2024). Association of air pollution with risk of chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *Environmental Research*, 215, 114262.
- US EPA (2017). Organochlorine Pesticides: Updated Human Health Risk Assessment. United States Environmental Protection Agency, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention.
- Zhao, L. et al. (2020). The impact of the gut microbiome in neurodegenerative diseases. *Current Alzheimer Research*, 17(3), 272–284.



Il Direttore:
Paolo Montuori

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

13. APPENDICI TECNICHE E SOPs

Le appendici al protocollo INSINERGIA raccolgono tutti i dettagli tecnici e documentali necessari per l'implementazione pratica dello studio, costituendo una risorsa fondamentale per garantire **standardizzazione, qualità e trasparenza**. Ciascuna appendice fornisce informazioni approfondite a supporto dei contenuti riassunti nel corpo principale del protocollo. Di seguito una panoramica delle appendici incluse e del loro contenuto:

Appendice A – Elenco dei biomarcatori e metodiche analitiche

Questa sezione presenta tabelle dettagliate con tutti i **biomarcatori di esposizione** e di **effetto** che verranno misurati nel progetto, insieme alle relative metodologie di analisi. Ad esempio, per ciascun contaminante chimico target (metalli: Pb, Cd, Hg, As, etc.; organici: PCB, diossine, IPA, PFAS, ecc.) viene specificato:

- la **matrice biologica** in cui sarà misurato (sangue intero, siero, plasma, urine, capelli...),
- la **tecnica analitica** utilizzata (ad esempio: ICP-MS per metalli, GC-MS/MS per diossine e PCB, HPLC-MS/MS per metaboliti urinari organici, ELISA o saggi immunometrici per certi biomarcatori proteici, ecc.),
- eventuali **limiti di rilevabilità** (LOD) e di quantificazione (LOQ) attesi, in modo da dare un'idea della sensibilità,
- i laboratori della rete responsabili di quella determinazione (es. indicazione che il laboratorio X eseguirà l'analita Y, come da accordi di network),
- i riferimenti a metodi standard di riferimento (norme ISO, linee guida internazionali) seguiti per quella procedura.

Queste tabelle fungono sia da promemoria operativo per i laboratori, sia da garanzia per il Comitato Etico e gli stakeholder che ogni misurazione è pianificata con rigore. **Esempio estratto:** “PCB (policlorobifenili) diossina-simili in siero – Metodo: HRGC-HRMS (gascromatografia alta risoluzione con spettrometria di massa ad alta risoluzione), LOD: 0,1 pg/g, Laboratorio riferimento: ARPA Lombardia, secondo metodo EPA 1613 modificato”. Elenchi simili sono presentati per i biomarcatori clinici (emocromo, transaminasi, creatinina, ormoni, ecc.) con l'indicazione dei metodi (spesso analizzatori automatici in chemiluminescenza, immunometrici o colorimetrici standard) e per eventuali analisi esplorative aggiuntive (ad es. profili metabolomici o analisi di polimorfismi genetici di suscettibilità, se previsti in sottogruppi).

Appendice B - Matrici, volumi e materiali *metal-free*

Il protocollo definisce con precisione le matrici biologiche da raccogliere per ciascun partecipante, i volumi necessari e i tipi di contenitori da utilizzare, privilegiando materiali a basso rischio di contaminazione metallica (*metal-free*). Le principali matrici e quantità previste sono:



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

- **Sangue venoso:** rappresenta la matrice centrale per molti contaminanti. Si prelevano circa 20-30 mL di sangue per partecipante, distribuiti in più provette. In particolare, una parte del sangue intero (ad es. 5-7 mL in provetta con anticoagulante EDTA) è destinata alle analisi dei metalli pesanti (piombo, cadmio, mercurio, ecc.) e ad eventuali parametri ematochimici o genetici; un'altra aliquota viene raccolta in provette senza anticoagulante (10+ mL) per ottenere siero da utilizzare nelle analisi degli inquinanti organici persistenti e PFAS. Tutte le provette utilizzate sono di materiale plastico (polipropilene) certificato per traccia di metalli ultrabassa, con tappi privi di componenti metalliche, così da evitare l'introduzione di contaminanti esterni durante o dopo il prelievo. Il sangue, essendo una matrice universale, consentirà di misurare sia l'esposizione interna ai contaminanti (nel siero o sangue intero) sia eventuali effetti biologici (parametri clinici, marcatori d'effetto nel sangue, vedi sez. 10-11).
- **Urina:** il campione urinario fornisce informazioni complementari al sangue, specialmente per contaminanti con escrezione renale. Si richiede un volume di 50 mL circa di urina *spot* (prima mattina, se possibile), raccolta in appositi contenitori sterili monouso in materiale plastico *metal-free*. L'urina è indispensabile per la misura di metalli e metalloidi quali arsenico inorganico (e suoi metaboliti) e cadmio (indicatore di dose cumulativa renale), nonché di eventuali metaboliti idrosolubili di contaminanti organici (es. metaboliti di IPA o solventi, se previsti dallo studio). Anche i contenitori per urina sono in polipropilene o materiale analogo, previamente trattati per eliminare tracce metalliche (lavaggio acido e abbondante risciacquo) qualora non siano disponibili monouso certificati. Dopo la raccolta, il pH urinario può essere stabilizzato o acidificato a seconda delle analisi previste, ed il campione viene aliquotato in più sotto-campioni (es. 2-3 aliquote da 10 mL) per differenti misurazioni e *backup*.
- **Altre matrici biologiche:** il protocollo mantiene aperta la possibilità di utilizzare matrici aggiuntive in casi particolari. Ad esempio, qualora fossero disponibili campioni di tessuti umani prelevati per altre finalità cliniche (biopsie, sangue del cordone ombelicale, tessuti patologici conservati), e qualora essi siano rilevanti per l'obiettivo di progetto, il loro impiego potrà essere valutato separatamente con specifico consenso etico. La Regione Lombardia, in particolare, ha proposto di valorizzare collezioni di organi e tessuti disponibili presso strutture di ricerca, per indagare la presenza di contaminanti o lesioni specifiche correlabili all'esposizione ambientale (RIAS, 2023). Un esempio è l'analisi di campioni istologici in paraffina da pazienti oncologici di aree SIN, al fine di ricercare marcatori molecolari associati agli inquinanti: tale attività rientra tra gli studi di approfondimento possibili, e sarebbe condotta seguendo percorsi etici dedicati.

Tutti i volumi indicati sono calcolati per garantire sufficiente materiale biologico sia per le analisi immediate sia per eventuali ripetizioni e analisi future (aliquote di riserva), contenendo al contempo l'invasività per il partecipante. L'utilizzo di materiali *metal-free* in



ogni fase (dagli aghi alle provette, fino ai puntali da laboratorio) è fondamentale soprattutto per le analisi ultra-traccia di metalli: questo accorgimento, unito al controllo rigoroso dell'ambiente di prelievo (camici privi di particolati, guanti senza talco, etc.), permette di ridurre al minimo il rumore di fondo analitico e assicurare che i livelli misurati nei campioni riflettano effettivamente l'esposizione del soggetto e non contaminazioni accidentali. Tutte le matrici raccolte sono infine etichettate e tracciate nel sistema informativo, così che sia sempre possibile risalire a quali campioni sono disponibili per ciascun partecipante, ai volumi stoccati e alla loro collocazione nella biobanca (vedi sezione 13) (RIAS, 2023).

Appendice C - Checklist preanalitica e catena del freddo

Una corretta fase preanalitica è imprescindibile per garantire la validità dei risultati di biomonitoraggio. A tal fine, il protocollo prevede una checklist preanalitica da seguire rigorosamente prima, durante e dopo la raccolta dei campioni.

I principali punti della checklist includono:

- Identificazione e consenso: verificare l'identità del partecipante (documento di riconoscimento) e la presenza del modulo di consenso informato firmato. Attribuire o confermare il codice univoco del soggetto nello studio, assicurandosi che etichette e codici a barre corrispondano alla persona corretta.
- Preparazione del soggetto: controllare che il partecipante abbia seguito le istruzioni preesame (digiuno se richiesto, astensione da fumo da almeno 1 ora, evitare consumo eccessivo di alimenti specifici come pesce/mitili per 48-72 ore se si misurano metalli come Hg o As, ecc.). Registrare eventuali scostamenti (es. "ha fatto colazione leggera alle 6:00", oppure "ha mangiato pesce la sera prima") per tenerne conto in fase di interpretazione dei dati. Raccogliere informazioni su eventuali esposizioni acute recenti fuori dall'ordinario (ad es. esami diagnostici con mezzo di contrasto, lavori hobbistici con solventi) che potrebbero alterare temporaneamente i biomarcatori.
- Materiali e strumenti: predisporre tutto l'occorrente sterile e pulito prima del prelievo. Verificare che le provette, aghi, contenitori e altri dispositivi siano quelli previsti dal protocollo (tipo e lotto corretto) e all'interno della data di scadenza. Assicurarsi che gli strumenti siano tarati e funzionanti (es. bilancia se serve pesare il campione, centrifuga a temperatura controllata, termometro del frigo, ecc.).
- Esecuzione del prelievo: seguire le tecniche standard di veni puntura e raccolta sicura. Rispettare l'ordine di riempimento delle provette se multi-prelievo (per evitare contaminazioni tra additivi: di solito prima provette senza anticoagulante per siero, poi EDTA per metalli, ecc.). Applicare le etichette codificate su ogni campione immediatamente dopo il prelievo, prima di passare al successivo partecipante, per evitare scambi di identificativo. Compilare il modulo prelievo annotando data e ora esatte di ciascun campionamento, eventuali difficoltà o note (es. emolisi visibile, difficoltà nel riempimento della provetta, etc.).



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

- Dopo il prelievo: assicurarsi che il partecipante stia bene (osservazione di alcuni minuti, bendaggio, ristoro se necessario) e fornirgli indicazioni su quando saranno comunicati – se previsto – i risultati individuali. Intanto, trasferire i campioni raccolti nell'area temporanea di conservazione (frigorifero portatile o contenitore termico) preparando la fase di trasporto a temperatura controllata. Verificare che tutta la documentazione sia completa (etichette, modulistica, registro di carico dei campioni).

Una volta raccolti e preparati, i campioni devono essere mantenuti sotto catena del freddo per preservarne la stabilità fino all'analisi. Ciò comporta una serie di accorgimenti operativi: subito dopo il prelievo, le provette di sangue intero vengono tenute a +4 °C (in frigorifero portatile con piastre refrigeranti) se l'analisi richiede di mantenere il sangue intero refrigerato, oppure lasciate coagulare a temperatura ambiente controllata per ~30 minuti (nel caso delle provette per siero) e poi poste a refrigerare. Entro poche ore dal prelievo, idealmente presso lo stesso ambulatorio attrezzato o in un laboratorio locale collegato, il sangue viene centrifugato (tipicamente 10 minuti a ~3000 g) per separare il siero, che viene immediatamente aliquotato in criovials pre-etichettate. Sia le aliquote di siero che le provette di sangue intero (es. EDTA) vengono quindi congelate a -20 °C o -80 °C a seconda delle indicazioni analitiche: ad esempio, i campioni destinati all'analisi di diossine, PCB o PFAS sono solitamente conservati a -20/-80 °C per evitare degradazione o adsorbimento alle pareti; i campioni per metalli (es. sangue intero per piombo) possono essere conservati refrigerati a 4 °C se analizzati entro pochi giorni, altrimenti congelati. Anche le urine, dopo la raccolta, vengono trasferite in laboratorio il prima possibile: qui possono essere filtrate (se richiesto), aliquotate in più porzioni e congelate a -20 °C.

La catena del freddo prosegue durante il trasporto dei campioni ai laboratori di analisi: i contenitori con le provette vengono spediti con corriere espresso in imballaggi isotermici certificati (UN3373), con ghiaccio secco (per mantenere temperature di -78 °C) o con ghiaccio gel (-20 °C) a seconda della durata del trasporto e delle specifiche esigenze. Ogni spedizione è accompagnata da *data logger* di temperatura per verificare che non vi siano stati innalzamenti oltre la soglia consentita durante il tragitto. I laboratori riceventi, all'arrivo, registrano i campioni in ingresso e controllano il rispetto della temperatura (conferma dell'integrità della catena del freddo); quindi trasferiscono subito le aliquote nei congelatori a -80 °C fino al momento dell'analisi. Tutte queste misure garantiscono che i biomarcatori più instabili (ad esempio alcune vitamine, enzimi o marcatori d'effetto) non vadano incontro a degradazione, e che anche i contaminanti chimici target rimangano inalterati. La catena del freddo, unita all'uso di materiali appropriati e a tempi di processamento rapidi, fa parte integrante dell'assicurazione di qualità preanalitica del progetto.

Regione Lombardia ha posto particolare enfasi su questi aspetti di biobancaggio: è prevista l'implementazione di una rete integrata di congelatori a -80 °C e contenitori criogenici ad azoto liquido, gestiti tramite piattaforme software dedicate, proprio per garantire il mantenimento ottimale dei campioni biologici dalla raccolta fino alle fasi di analisi e stoccaggio di lungo periodo (RIAS, 2023). Tale infrastruttura assicura che non si verifichino interruzioni della catena del freddo e che sia sempre possibile tracciare la



storia termica di ciascun campione, a tutela sia della qualità del dato sia dei diritti del partecipante (che ha donato il campione confidando in un uso appropriato).

Appendice D – Protocollo di campionamento e processamento dei campioni biologici

In questa appendice sono descritte in dettaglio le **procedure operative standard (SOP)** per la raccolta, il trattamento, lo stoccaggio e il trasporto dei campioni biologici, a garanzia che ogni centro operi nello stesso modo.

Vi si trovano:

- **Istruzioni per il prelievo ematico e urinario:** ad esempio, la SOP per il prelievo di sangue venoso specifica il volume di sangue da prelevare (tipicamente 2 provette da 5 mL, una con EDTA per plasma e una senza anticoagulante per siero, più eventuali provette speciali per metalli pesanti con eparina), le condizioni del paziente (digiuno richiesto o meno, posizione seduta/riposo prima del prelievo), e le precauzioni da adottare (mescolamento delicato delle provette con anticoagulante, etichettatura immediata con codice a barre univoco, etc.). Per le urine, si indica se serve il primo mitto del mattino o campione random, il volume minimo (es. 50 mL in contenitore sterile), l'eventuale aggiunta di conservanti (per talune analisi).
- **Processo di separazione in frazioni del sangue:** una volta raccolto il sangue, la SOP descrive come suddividerlo in plasma, siero, buffy coat, eritrociti e, in certi casi, aliquote di sangue intero. Ad esempio: centrifugare le provette con EDTA a 1500 g per 15 minuti a +4°C; aspirare con pipetta sterile il plasma sopranatante in aliquote da 0,5-1 mL in criovials codificati; prelevare lo strato leucocitario (buffy coat) con cura di non contaminare con globuli rossi; raccogliere gli eritrociti residui in un altro criovial. Analogamente, il sangue senza anticoagulante va centrifugato dopo coagulazione per ottenere il siero, aspirato e aliquotato. Tutti questi passaggi sono illustrati anche con diagrammi o immagini (ove possibile) e con l'elenco dei materiali necessari (pipette tarate, puntali sterili, centrifughe refrigerate, timer).
- **Aliquotazione ed etichettatura:** la SOP specifica quante aliquote fare per ciascuna frazione e come etichettarle. Ogni aliquota è contrassegnata da un'etichetta con codice a barre contenente il codice del partecipante e un identificativo del tipo di campione/frazione. Ad esempio, il partecipante ABC001 potrebbe avere aliquote etichettate "ABC001-PL1" per plasma 1, "ABC001-PL2" per plasma 2, "ABC001-SR1" per siero, etc. Si raccomanda di utilizzare etichette resistenti a basse temperature e leggibili da scanner, per evitare errori di trascrizione. Viene anche stabilito un registro o modulo elettronico in cui segnare quante aliquote di ciascun tipo sono state create per ogni partecipante.
- **Conservazione temporanea e condizioni di trasporto:** le appendici contengono tabelle riassuntive delle condizioni di conservazione per ogni tipo di campione, in linea con le best practice. Ad esempio: "Sangue intero: refrigerare a +4°C e



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

analizzare entro 24h” oppure “Plasma/Serum aliquotato: congelare a -20°C se analisi entro 1 mese, altrimenti a -80°C per lungo termine”. Per i contaminanti organici, spesso si indica di congelare subito a -20/-80°C per evitare degradazione. La sezione trasporto definisce l’imballaggio (utilizzo di contenitori isotermici con ghiaccio secco o ghiaccio gel, in base alla distanza e al tempo di trasporto), e i tempi massimi di consegna ai laboratori di analisi dopo il prelievo (ad esempio, le provette per metalli devono giungere al laboratorio entro 48 ore refrigerate, se no si stocca a -20°C e si spedisce su ghiaccio secco). Sono richiamate le normative sul trasporto di campioni biologici UN3373 per garantire che l’imballaggio rispetti i requisiti di sicurezza.

- **Smaltimento e biosicurezza:** ogni SOP include indicazioni sul corretto smaltimento dei residui (materiale tagliente, provette utilizzate, DPI contaminati) secondo protocolli di rifiuti speciali e sulle norme di biosicurezza per proteggere gli operatori (vaccinazione antiepatite per il personale, uso di cappe biohazard se necessario per processare i campioni, etc.).

Appendice E – Questionario epidemiologico

In questa appendice si trova il **fac-simile del questionario** che verrà somministrato ai partecipanti. È un documento importante poiché raccoglie dati su stili di vita, abitazioni, lavoro, dieta e stato di salute pregresso, fondamentali per interpretare i risultati. Il questionario è strutturato in sezioni (ad esempio: dati socio-demografici, storia residenziale, abitudini alimentari come consumo di cibi locali, abitudini voluttuarie tipo fumo e alcol, esposizioni occupazionali, storia clinica con particolare attenzione a patologie potenzialmente legate ad esposizioni ambientali, ecc.). Nell’appendice è presente il testo integrale delle domande sia in italiano (lingua amministrata) sia con eventuale traduzione inglese per riferimento. Questo consente al Comitato Etico di valutare la pertinenza e non invasività delle domande, e al team di ricerca di avere un modello uniforme da utilizzare in tutte le regioni. Eventuali **showcard** o spiegazioni da dare all’intervistato sono anch’esse allegate (es: una tabella di frequenza di consumo alimentare da mostrare per aiutare a quantificare l’assunzione di pesce, ecc.). Vengono inoltre specificate le modalità di compilazione (autocompilato dal partecipante o intervista assistita) e il flusso di skip logic (es. se non ha mai fumato salta le domande successive sul fumo).

Appendice F – Documentazione di qualità e monitoraggio

Questa sezione contiene ulteriori documenti tecnici come:

- **Piano di Monitoraggio e Valutazione della Qualità:** descrive come saranno condotti audit interni sulle procedure (ad esempio checklist per il monitoraggio degli ambulatori durante i primi prelievi, per verificare che seguano le SOP; schede di valutazione della performance dei laboratori, etc.). Possono esserci modelli di report di monitoraggio e nominativi dei responsabili.



- **Elenco delle SOP di laboratorio di dettaglio:** ad esempio, se i laboratori di rete hanno proprie SOP specifiche (es. SOP per analisi del piombo nel sangue con metodo ICP-MS), esse sono elencate e custodite a parte, ma l'appendice può contenere una tabella con i titoli e i riferimenti di tali SOP, e l'ente che le detiene. Questo per segnalare che esistono e sono consultabili dagli ispettori se necessario.
- **Schema di codifica e data dictionary:** un documento con la spiegazione di tutte le variabili raccolte (campi del database, codici utilizzati per risposte, unità di misura, ecc.), importante per la trasparenza e per future ri-analisi dei dati da parte di altri ricercatori.

Appendice G – Tabelle riassuntive e calcoli aggiuntivi

Come supporto a quanto discusso nel protocollo, qui possono trovarsi:

- La **tabella di stima del numero di aliquote** per partecipante e totale (già menzionata nella sezione calcolo partecipanti). Ad esempio, mostrando il dettaglio: 2 aliquote plasma, 2 siero, 1 buffy coat, 1 eritrociti, 2 sangue intero = 8 aliquote pp * 2500 partecipanti = 20.000 aliquote totali, e il calcolo di quanti congelatori servono per stoccarle in base alla capacità (questo dettaglio offre evidenza della pianificazione logistica approfondita).
- **Ulteriori analisi statistiche di potenza:** eventuali grafici o tabelle che mostrano la relazione tra numerosità campionaria e potenza per diversi scenari di effetto atteso, a dimostrazione che il campione scelto è adeguato (Cohen, 1988).

Appendice H – Lista delle abbreviazioni e glossario

Elenco di acronimi (es. SIN, ISS, ARPA, PCB, PFAS, etc.) e un breve glossario di termini tecnici chiave per facilitare la lettura del documento a tutti i membri del Comitato Etico, anche quelli non specialisti in materia ambientale.

Tutte le appendici sono parte integrante del protocollo sottoposto al Comitato Etico: la loro presenza dimostra che il progetto è stato pianificato con un livello di dettaglio elevato e che ogni fase è supportata da istruzioni operative precise. Questo fornisce garanzie sulla **fattibilità e affidabilità** dello studio. Inoltre, la disponibilità delle SOP nelle appendici garantisce che, a livello locale, i team possano consultare in ogni momento le procedure standard e ridurre al minimo margini di ambiguità o variabilità nell'implementazione.

In ottica futura, l'insieme di queste appendici tecniche costituirà anche un **corpus documentale** riutilizzabile: ad esempio, le SOP e i protocolli di campionamento potranno essere adottati come riferimento per altri studi di biomonitoraggio nazionali, promuovendo la standardizzazione a livello italiano (Esteban López *et al.*, 2021). Il livello di dettaglio fornito nelle appendici riflette l'aderenza di INSINERGIA alle migliori pratiche di **qualità della ricerca** e la volontà di rendere il progetto quanto più trasparente e replicabile possibile.



*Il Direttore:
Paolo Montuori*

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Appendice I – Lista dei biomarcatori specifici per SIN

Questa appendice riporterà l'elenco dei biomarcatori analizzati per ciascun SIN. Infatti, come descritto, a seconda del profilo di contaminazione del SIN, saranno selezionati i marker più appropriati



Il Direttore:
Paolo Montuori

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Appendice A – Elenco dei biomarcatori e metodiche analitiche

1. APPROFONDIMENTO - BIOMARCATORI DI ESPOSIZIONE, DI EFFETTO E DI SUSCETTIBILITÀ GENETICA

Analisi biochimico-cliniche, strumentali di biomarcatori di esposizione e di effetto previste dal progetto INSINERGIA per la “valutazione dell’esposizione di popolazione agli inquinanti organici persistenti, metalli e PFAS ed effetti sanitari, con particolare riferimento alle popolazioni più suscettibili.

A. ANALISI BIOCHIMICO-CLINICHE

Conoscere il profilo biochimico-clinico delle persone in uno studio epidemiologico è cruciale per comprendere lo stato di salute di una popolazione e identificare fattori di rischio associati a malattie croniche o acquisite. Le analisi biochimiche, come i livelli di glucosio, colesterolo, ormoni e marcatori di infiammazione, offrono informazioni fondamentali su condizioni come diabete, dislipidemie, disturbi ormonali e malattie cardiovascolari. Monitorare questi parametri permette di studiare l'effetto di fattori ambientali, comportamentali e genetici sulla salute, migliorando la comprensione delle dinamiche di salute pubblica, la disponibilità di alcuni laboratori nell’analisi di parametri aggiuntivi sarà valutata soggettivamente da ogni singola UUOL, si riportano di seguito il setting analitico obbligatorio e quello facoltativo per ogni singola classe di biomarcatori.

ANALISI BIOCHIMICO-CLINICHE SETTING ANALITICO OBBLIGATORIO	Metodica analitica	Matrice
Emocromo completo (WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCHC, RDW, PLT, P-LCR, PDW, PCT)	Impedimetria	Sangue intero
Glucosio	Enzi-colorimetrico	Siero
Albumina	Immunoturbidimetrico	Siero
Trigliceridi	Enzi-colorimetrico	Siero
Colesterolo totale	Enzi-colorimetrico	Siero
Colesterolo LDL	Enzi-colorimetrico	Siero
Colesterolo HDL	Enzi-colorimetrico	Siero
Creatinina	Enzi-colorimetrico	Siero
Azotemia	Enzi-colorimetrico	Siero
Creatinina urinaria	Enzi-colorimetrico	Urina
Bilirubinemia frazionata	Colorimetrico	Siero
Bilirubinemia totale	Colorimetrico	Siero
Esame chimico fisico delle urine	Striscia reattiva colorimetrica automatizzata; rifrattometria; pH potenziometrico	Urine
AST	Enzimatico	Siero



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
 Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

ANALISI BIOCHIMICO-CLINICHE SETTING ANALITICO OBBLIGATORIO	Metodica analitica	Matrice
ALT	Enzimatico	Siero
QPE	Elettroforesi delle proteine	Siero
Gamma GT	Enzi-colorimetrico	Siero
Insulinemia	CLIA (Chemiluminescent Immunoassay)	Siero
Estradiolo	CLIA (Chemiluminescent Immunoassay)	Siero
FSH	CLIA (Chemiluminescent Immunoassay)	Siero
LH	CLIA (Chemiluminescent Immunoassay)	Siero
Prolattina	CLIA (Chemiluminescent Immunoassay)	Siero
Testosterone totale	CLIA (Chemiluminescent Immunoassay)	Siero
Anticorpi Antitiroidei	CLIA (Chemiluminescent Immunoassay)	Siero
FT3	CLIA (Chemiluminescent Immunoassay)	Siero
FT4	CLIA (Chemiluminescent Immunoassay)	Siero
TSH	CLIA (Chemiluminescent Immunoassay)	Siero
Emoglobina glicata	Enzi-colorimetrico	Siero
ANALISI BIOCHIMICO-CLINICHE SETTING FACOLTATIVO	Metodica analitica	Matrice
Proteine totali	Enzi-colorimetrico	Siero
Urea	Enzi-colorimetrico	Siero
Sodio	ISE (Ion-Selective Electrode)	Siero
Potassio	ISE (Ion-Selective Electrode)	Siero
Cloro	ISE (Ion-Selective Electrode)	Siero
Fosforo	ISE (Ion-Selective Electrode)	Siero
Calcio	ISE (Ion-Selective Electrode)	Siero
Creatino-fosfochinasi	Enzimatico	Siero
Lattato deidrogenasi	Enzimatico	Siero
CK-MB	ECLIA (ElectroChemiluminescent Immunoassay)	Siero
Sideremia	Colorimetrico	Siero
Ferritina	CLIA (Chemiluminescent Immunoassay)	Siero



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
 Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
 Paolo Montuori

COV Composti aromatici: <i>Benzene, Toluene, Etilbenzene, Xilene, Stirene, Trimetilbenzeni</i> Composti alifatici clorurati: <i>Cloroformio (triclorometano), 1,2-Dicloroetano, 1,1-Dicloroetano, Tetracloroetilene, Tricloroetilene, 1,1-Dicloroetilene, 1,2-Dicloroetilene, Cloruro di Vinile</i> MTBE (additivo benzine)	HS-GC-MS	Urine	IARC, 2018, "Benzene: Evaluation of carcinogenic risks" Padrón et al., 2010, "Human biomonitoring of aromatic hydrocarbons";
IPA <i>1-naftolo 2-naftolo 2-fluorenolo 1-fenantrolo 2-fenantrolo 3-fenantrolo 4+9-fenantrolo 1-idrossipirene</i>	GC-MS or LC-MS/MS	Urine	EPA, 2001, "Toxicological review of trichloroethylene"; Shah et al., 2003, "Chlorinated hydrocarbons in human serum analysis"



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
 Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
 Paolo Montuori

Biomarcatori di esposizione SETTING OBBLIGATORIO	Metodica analitica	Matrice	Riferimenti
PFAS <i>PERFLUOROOCTANESULFONIC ACID (PFOS) AND PERFLUOROOCTANIC ACID (PFOA)</i>	Cromatografia liquida-spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS)	Siero	Aromatic Hydrocarbons"; Kazerouni et al., 2001, "Polycyclic aromatic hydrocarbons in serum"
POLICLOROBIFENILI (PCBs)	Gas-cromatografia accoppiata a spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRGC-HRMS).	Siero	"Polychlorinated biphenyls (PCBs) Toxicological Profile"; Horizon2020 HBM4EU Report AD 9
DIOSINE E PCB <i>Diossine (PCDD/F), PCB diossina simili (DL-PCB) e PCB indicatori (NDL-PCB)</i>	Gas-cromatografia accoppiata a spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRGC-HRMS).	Siero	"Dioxins and dioxin-like compounds"; Horizon2020 HBM4EU Report AD 9

Biomarcatori di esposizione SETTING FACOLTATIVO	Metodica analitica	Matrice	Riferimenti
BISPENOL A S F (BPA) and other CHLORINATED DERIVATIVES (ClxBPA) <i>(serum estradiol, leptin, osteocalcin levels, ...)</i>	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)	Siero	Horizon2020 HBM4EU Report AD 9; Vandenberg et al., 2012, "Bisphenol A and human health"
PESTICIDI ORGANOCLOPURATI	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) + Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)	Siero	Rohlman et al., 2005, "Human exposure to organochlorine pesticides: biomarkers"; US EPA, 2017, "Organochlorine pesticides report"
PESTICIDI ORGANOFOSFORICI	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) + Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)	Siero	Couture et al., 2006, "Human biomarkers of organophosphate exposure"; IARC, 2015, "Pesticides and cancer risks"



Biomarcatori di esposizione SETTING FACOLTATIVO	Metodica analitica	Matrice	Riferimenti
Bioassay per la determinazione degli inquinanti organici plasmatici	Saggio biologico	Siero	Vighi et al., 2009, "Assessment of organic pollutants using bioassays"; Lima et al., 2013, "Human plasma bioassays for environmental contaminants"
METIL MERCURIO e altri inquinanti persistenti	Gas-cromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS)	Ciocca di capelli (circa 2 cm prelevata in zona occipitale)	UNEP, 2019, <i>Global Mercury Assessment</i> ; WHO, 2017, <i>Exposure to methylmercury: human biomonitoring guidance</i>

C. METABOLITI DEI MARCATORI DI ESPOSIZIONE – ANALISI METABOLOMICA (FACOLTATIVI)

I metaboliti dei biomarcatori di esposizione sono i prodotti risultanti dalla metabolizzazione delle sostanze chimiche una volta che queste vengono assorbite nel corpo umano. Questi metaboliti sono strumenti utili per monitorare l'esposizione a vari composti tossici, come metalli pesanti, pesticidi, solventi organici e altre sostanze chimiche. Essi rivestono un'importanza particolare perché permettono di rilevare esposizioni recenti a sostanze chimiche, anche quelle di breve durata o acute. Inoltre, forniscono informazioni sulla biodisponibilità e sul processo di biotrasformazione di una sostanza all'interno dell'organismo. I metaboliti possono anche essere utili per identificare esposizioni multiple o indirette a una combinazione di composti, dato che possono essere legati a più agenti tossici contemporaneamente. In alcuni casi, i metaboliti possono essere correlati a specifici effetti biologici, come danni cellulari o lo sviluppo di malattie. In definitiva, i metaboliti offrono informazioni dettagliate sulla quantità e sul tipo di esposizione, consentendo un monitoraggio accurato dell'assorbimento e degli effetti delle sostanze chimiche nel corpo umano.

Di seguito si riporta, per ciascuna classe, un elenco indicativo dei principali composti da ricercare e dei metaboliti/marker correlati:

Diossine (PCDD/PCDF)

Sostanze principali da ricercare

- Le 17 diossine/furani più tossici con sostituzione in posizione 2,3,7,8 (in particolare 2,3,7,8-TCDD; 1,2,3,7,8-PeCDD; 2,3,7,8-TCDF; ecc.).
- Il livello totale di Tossicità Equivalente (TEQ) basato sui fattori di tossicità (TEF).



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

Metaboliti/marker

- In genere, per le diossine si misura il composto inalterato piuttosto che un metabolita, dato che tendono ad accumularsi nei tessuti (soprattutto adiposi).
- Non esistono metaboliti urinari di uso routinario per il biomonitoraggio, per cui si raccomanda la determinazione delle diossine parent compound nel siero o plasma.

Metodica di analisi

- HRGC-HRMS (High Resolution Gas Chromatography - High Resolution Mass Spectrometry): tecnica di riferimento per la quantificazione delle diossine e dei furani.
- Metodo di riferimento: US EPA Method 1613B.

Matrice biologica consigliata

- Siero (o plasma) per la determinazione dei congeneri diossina-simili, in quanto accumulati nelle frazioni lipidiche.

PCB (Policlorobifenili)

Sostanze principali da ricercare: Congeneri “indicatori” più comuni (ad es. PCB 28, 52, 101, 138, 153, 180). Congeneri “diossina-simili” (ad es. PCB 77, 81, 126, 169) per il calcolo del TEQ.

Metaboliti/marker

- Idrossi-PCB (OH-PCB), in alcuni studi, vengono valutati come metaboliti. Tuttavia, l'analisi dei congeneri non metabolizzati rimane lo standard.

Metodica di analisi

- HRGC-MS
- Metodo di riferimento: US EPA Method 1668 (determinazione di PCB in media e alta risoluzione).

Matrice biologica consigliata

- Siero (o plasma), in quanto i PCB si accumulano nella fase lipidica.

IPA (Idrocarburi Policiclici Aromatici, in inglese PAH)

Sostanze principali da ricercare: Benzo[a]pirene (BaP), Benzo[b]fluorantene, Benzo[k]fluorantene, Indeno[1,2,3-cd]pirene, Dibenzo[a,h]antracene, Altri IPA di interesse tossicologico (fluorantene, fenantrene, ecc.).

Metaboliti/marker

- 1-idrossipirene (1-OHP) in urina (marker di esposizione a IPA).
- Altri idrossi-metaboliti (es. 3-idrossibenzo[a]pirene) sono più specifici ma meno comunemente usati.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

Metodica di analisi

- HPLC con rivelatore a spettrometria di massa ad alta risoluzione

Matrice biologica consigliata

- Urina: principalmente per i metaboliti (1-idrossipirene), data la breve emivita degli IPA nel sangue.
- Siero: utilizzabile per determinare IPA in forma inalterata, ma meno comune rispetto all'analisi dei metaboliti in urina.

PFOA (Acido Perfluorooctanoico) e altri PFAS

Sostanze principali da ricercare: PFOA (acido perfluorooctanoico), PFOS (acido perfluorottansolfonico), Altri PFAS di uso comune (PFHxS, PFNA, PFDA, ecc.) in base alle fonti di esposizione.

Metaboliti/marker

- Generalmente si misura il composto intatto (ad es. PFOA nel siero).
- Non sono di uso routinario specifici metaboliti, poiché i PFAS sono molto stabili e persistenti.

Metodica di analisi

- LC-MS/MS (Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry): tecnica standard per la determinazione di PFAS in matrici biologiche.
- Metodo di riferimento: esistono linee guida di agenzie come US CDC (NHANES methods) o ISO 21675 per acqua (adattabile a matrici biologiche con opportuni passaggi di estrazione).

Matrice biologica consigliata

- Siero (o plasma): è la matrice più comunemente utilizzata per valutare i livelli di PFAS, inclusi PFOA e PFOS.

Pesticidi

I pesticidi includono diverse sottoclassi (organoclorurati, organofosforici, carbammati, piretroidi, neonicotinoidi, ecc.). Il pannello da ricercare dipende dal contesto di esposizione.

Sostanze principali da ricercare

- Organofosforici: Azinphos-methyl, Chlorpyrifos, Dichlorvos, Disulfoton, Ethoprophos, Fenchlorphos, Parathion-methyl, Prothiofos
- Piretroidi: Allethrin, Acrinathrin, Anthraquinone, Bifenthrin, Cyfluthrin, lambda-Cyhalothrin, Cypermethrin, d-trans-Cyphenothrin, Deltamethrin, Etofenprox, Fenpropathrin, Fenvalerate, Flumethrin, Flucythrinate, tau-Fluvalinate, Imiprothrin,



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

Metofluthrin, Momfluorothrin, Permethrin, Phenothrin, Prallethrin, Resmethrin, Tefluthrin, Tetramethrin, Transfluthrin

- Altri: Paraquat, Diquat, Rotenone

Metaboliti/marker

- Organofosforici: di-methyl-phosphate (DMP), diethyl-phosphate (DEP), dimethyl-thiophosphate (DMTP), diethyl-thiophosphate (DETP), dimethyl-dithiophosphate (DMDTP), diethyl-dithiophosphate (DEDTP),
- Piretroidi: 3,5,6-trichloro-2-pyridinol, cis-3-(2,2-dibromo-vinyl)-2,2-dimethyl-cyclopropane carboxylic acid (Br2CA), cis-3-(2,2-dichloro-vinyl)-2,2-dimethyl-cyclopropane carboxylic acid (cis-Cl2-CA), trans-3-(2,2-dichloro-vinyl)-2,2-dimethyl-cyclopropane carboxylic acid (trans-Cl2-CA), 4-fluoro-3-phenoxy-benzoic acid (F-PBA), 3-phenoxy-benzoic acid (3-PBA)
- Altri: diquat-dipyridone

Metodiche di analisi

- GC-MS o LC-MS/MS: metodi multi-residuo per pesticidi e relativi metaboliti, con estrazione e purificazione specifica.

Riferimenti:

- US EPA 8141 (organofosforici),
- Metodi dell'OMS e dei laboratori nazionali di sanità pubblica per biomonitoraggio.

Matrice biologica consigliata

- Siero (o plasma) per i pesticidi persistenti (organoclorurati).
- Urina per i metaboliti di pesticidi non persistenti (organofosforici, piretroidi).

VOC (Composti Organici Volatili)

Sostanze principali da ricercare: Benzene, toluene, etilbenzene, xylene (BTEX), Stirene, cloruro di metilene, tricloroetilene (TCE), tetracloroetilene (PCE), e altri solventi organici.

Metaboliti/marker

- Benzene: acido fenilmercapturico (S-PMA) in urina o trans,trans-muconic acid (t,t-MA).
- Toluene: acido ippurico in urina (meno specifico, può derivare anche da altre fonti).
- Stirene: acido mandelico e acido fenilgliossilico.
- Tricloroetilene: tricloroetanolo, tricloroacetato in urina.

Metodiche di analisi

- Headspace GC-MS per i composti volatili nel sangue intero.
- LC-MS/MS o GC-MS per i metaboliti urinari.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

Metodi di riferimento: NIOSH (varie metodiche di campionamento ed analisi in aria, adattabili a sangue/urina), OSHA, e linee guida ACGIH (BEI – Biological Exposure Indices).

Matrice biologica consigliata

- Sangue intero per la misura diretta dei VOC parent (breve emivita).
- Urina per la determinazione di metaboliti (ad es. S-PMA per benzene), soprattutto in studi di esposizione cronica o sub-cronica.

Scelta del fluido biologico

La scelta della matrice biologica dipende dalla persistenza del contaminante e dalla via di esposizione:

- **Siero o plasma:** raccomandati per **diossine, PCB e PFAS** poiché queste sostanze si accumulano nella frazione lipidica e hanno emivite lunghe;
- **Urina:** matrice di elezione per i **metaboliti** di sostanze a rapida eliminazione come **IPA** (1-idrossipirene), **pesticidi** (metaboliti organofosforici, piretroidi) e **VOC** (es. S-PMA per benzene).

***In generale, l'urina viene preferita per studi di esposizione recenti/non persistenti. ***

- **Sangue intero** può essere utilizzato, in alternativa o in aggiunta, per la misura diretta di alcuni **-VOC** e per altri composti volatili che non si accumulano facilmente in siero/plasma.

Nei protocolli di biomonitoraggio più completi, spesso si affianca **l'analisi del siero** (o plasma) per i contaminanti persistenti all'**analisi dell'urina** per i metaboliti delle sostanze a più rapida clearance.

Riepilogo dei metodi

Metodiche analitiche di riferimento:

- Diossine/PCDD-F:
 - US EPA Method 1613B (HRGC-HRMS).
 - WHO/Eurofins Guide per l'analisi di diossine in matrici biologiche.
- PCB:
 - US EPA Method 1668 (HRGC-HRMS).
 - Metodi nazionali (ISS in Italia, CDC negli USA, ecc.) per il monitoraggio dei PCB.
- IPA:
 - HPLC-FLD (per 1-idrossipirene in urina) o GC-MS (IPA parent compound nel siero).
 - Metodi standardizzati in letteratura (ad es. metodo OSHA 58 adattato a campioni biologici, NIOSH 5506 per l'analisi di IPA nell'aria, poi modificato per matrici biologiche).



Il Direttore:
Paolo Montuori

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

- PFOA/PFAS:
 - LC-MS/MS (metodi sviluppati da US CDC–NHANES, ISO 21675 adattato, ecc.).
- Pesticidi:
 - US EPA 8141 (organofosforici),
 - GC-MS/LC-MS/MS multi-residuo per metaboliti in urina (linee guida OMS o laboratori nazionali).
- VOC:
 - Headspace GC-MS/GC-FID per composti volatili nel sangue intero,
 - LC-MS/MS o GC-MS per i relativi metaboliti urinari (S-PMA, acido ippurico, acido mandelico, ecc.).
 - Metodi raccomandati da NIOSH (es. 1401 per benzene nell'aria, adattato a sangue) o linee guida ACGIH (BEI).

D. BIOMARCATORI DI EFFETTO (FACOLTATIVI)

I biomarcatori di effetto sono indicatori biologici che riflettono come il corpo risponde a un'esposizione a sostanze chimiche, inquinanti o agenti patogeni mettendo in evidenza i danni biologici o i cambiamenti funzionali provocati da tale esposizione. Questi biomarcatori sono cruciali perché possono rivelare danni a livello cellulare e tissutale, come alterazioni del DNA, danni alle proteine, stress ossidativo o infiammazione, che sono segni precoci di malattie come il cancro o le malattie cardiovascolari. Inoltre, forniscono informazioni preziose sulla risposta biologica dell'organismo, come l'attivazione di vie metaboliche o l'attivazione di processi di difesa, come il rilascio di biomolecole infiammatorie. Essi sono anche in grado di monitorare effetti a lungo termine, rilevando danni anche in assenza di sintomi clinici evidenti, come i danni genetici o cellulari causati da esposizioni croniche a sostanze tossiche. Infine, supportano la prevenzione e la diagnosi precoce, in quanto possono individuare alterazioni biologiche prima che si manifestino malattie cliniche, offrendo così la possibilità di intervenire tempestivamente e di sviluppare strategie di prevenzione.

Biomarcatori di effetto	Metodica analitica	Tipologia campione	Riferimenti
	Metodica analitica	Tipologia campione	Riferimenti
LUNGHEZZA TELOMERICA	PCR o tecniche di sequenziamento	DNA da sangue intero	Schünemann, F. et al. (2017). HBM4EU: Human Biomonitoring for the European Union. European Journal of Public Health, 27(6), 1022-1025.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
 Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
 Paolo Montuori

Biomarcatori di effetto	Metodica analitica	Tipologia campione	Riferimenti
	ELISA, PCR in tempo reale (RT-PCR)	plasma	Van den Reek, J.M. et al. (2020). The Role of Cytokines in Chronic Inflammatory Skin Diseases. Journal of Dermatological Science
STRESS OSSIDATIVO	Test colorimetrici o spettrometria	Siero	Vineis, P. et al. (2018). EXPOsOMICS: A New Approach to Environmental and Occupational Health Research. Environmental Health Perspectives
DANNO CARDIOVASCOLARE ORGANO TARGET	Ecografia (cuore, carotide)	Imaging	Houston, MC. (2007). The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction
ALTERAZIONI DI CONDUZIONE	ECG	Strumentale	Langrish, JP. et al. (2014). Controlled exposures to air pollutants and risk of cardiac arrhythmia
ALTERAZIONI EMODINAMICHE	Tonometria/Oscillometria pressoria	Strumentale	Qin, P. et al. (2021) Long-term association of ambient air pollution and hypertension in adults and in children: A systematic review and meta-analysis
FUNZIONALITA' E DANNO RENALE	Kit ELISA Kit ELISA	Sangue/siero Urine	Xu ,W. et al. (2024). Association of air pollution and risk of chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis



Biomarcatori di effetto	Metodica analitica	Tipologia campione	Riferimenti
METILAZIONE DEL DNA (PYROSEQUENCING) o METILOMA INTERO	Pyrosequencing o metiloma	DNA da sangue intero	Sodhi, V. et al. (2020). The LIFEPAth Project: Advancing Knowledge on Aging and Environmental Determinants. International Journal of Epidemiology
MICROBIOMA	Sequenziamento del DNA (16S rRNA o metagenomica)	Feci	Zhao, L. et al. (2020). The Impact of the Gut Microbiome in Neurodegenerative Diseases. Current Alzheimer Research

2. APPROFONDIMENTO SINDROME METABOLICA

Dati anamnestici: principalmente orientati all'identificazione della concomitante presenza di altre patologie della sfera della sindrome metabolica (ipertensione arteriosa essenziale, diabete mellito di tipo 2, dislipidemia, iperuricemia, obesità) e di fattori di rischio cardiovascolari (fumo, ispessimento dei tronchi sovra-aortici, pregressi eventi cardiovascolari)

Dati clinici: diagnosi clinica e/o biochimica di infezioni delle vie urinarie

Score non invasivi:

- Atherosclerotic Cardiovascular Disease (ASCVD) risk attraverso il calcolatore disponibile online sul sito dell'American College of Cardiology
- NAFLD Fibrosis Score (NFS) usando la formula: $-1.675 + 0.037 \times \text{età (anni)} + 0.094 \times \text{BMI (kg/m}^2) + 1.13 \times \text{intolleranza glucidica/diabete (si = 1, no = 0)} + 0.99 \times \text{AST/ALT} - 0.013 \times \text{conta piastrinica (} \times 10^9/\text{l)} - 0.66 \times \text{albumina (g/dl)}$
- Fibrosis-4 (FIB-4) Index for Liver Fibrosis (Age, AST, ALT, platelet count)
- AST/ALT ratio
- APRI score (AST, platelet count)



Il Direttore:
Paolo Montuori

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

- Fatty liver index (FLI), per la steatosi, calcolato secondo la formula ufficiale: $ey/(1 + ey) \times 100$ dove $y = 0.953 \times \ln(\text{trigliceridemia, mg/dL}) + 0.139 \times \text{BMI, kg/m}^2 + 0.718 \times \ln(\text{GGT, U/L}) + 0.053 \times \text{circonferenza vita, cm} - 15.745$
- In quelli dove si fa fibroscan aggiungere FAST e AGILE3 come scores di fibrosi
- [Possibile aggiungere alcuni scores per hepatocellular carcinoma (HCC) da definire tra quelli Ref EU guidelines <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38851997>]

Parametri strumentali: ecografia addome completo; valutazione della fibrosi epatica mediante misurazione della stiffness (Fibroscan®) e del grado di steatosi attraverso l'analisi CAP; ecocardiogramma ed ecodoppler dei tronchi sovra-aortici ove previsto dalle linee guida internazionali

Parametri antropometrici: peso, altezza, circonferenza vita, circonferenza braccio, BMI

Esercizio fisico: questionario specifico, routinariamente applicato ad ogni visita di follow-up, composto da alcune semplici domande: Fai o hai mai fatto (negli ultimi due anni) sport in modo continuativo e regolare? Hai cambiato la tua attività fisica quotidiana negli ultimi sei mesi? Se sì, hai aumentato o ridotto la tua attività fisica?

****Questionario stile di vita e esposizione a plastiche** (Considerare che già viene somministrato EPIC per lo stile di vita). **

3. ANALISI DELLO STRESS OSSIDATIVO

Per effettuare una corretta misurazione del bilancio ossidativo verrà eseguito su campioni di siero:

- il d-ROMs (determinazione colorimetrica dei Metaboliti Reattivi dell'Ossigeno) Test per la valutazione dello stato pro-ossidante
- il Test BAP (Biological Antioxidant Potential), per la valutazione del potenziale antiossidante.

I test d-ROM (determinazione colorimetrica dei Metaboliti Reattivi dell'Ossigeno®) e BAP (Potenziale Biologico Antiossidante®) per valutare lo stato pro-ossidante e anti-ossidante sistemico, rispettivamente, secondo le istruzioni del produttore (Diacron International, Grosseto, Italia).

In breve, gli idroperossidi (ROOH, principalmente) contenuti nel siero, insieme a un buffer acido, vengono convertiti in radicali alcossilici e perossilici in presenza di metalli di transizione, che a loro volta ossidano un'ammina aromatica alchil-sostituita (N,N-dietilparafenilendiammina), mostrando un aumento dell'assorbanza a 505 nm. Il test d-



ROMs rileva fotometricamente la densità del complesso colorato, che è direttamente proporzionale alla concentrazione di idroperossidi. Una unità del test d-ROMs (U.CARR) corrisponde alla quantità di idroperossido che può essere convertito dall'enzima superossido dismutasi in circa 0,08 mg/dL di H₂O₂. I valori di riferimento definiti come range di normalità sono compresi tra 20 e 24 mg/dL di H₂O₂. I coefficienti di variazione intra- e inter-test sono rispettivamente 0,3-6,6% e 0,3-5,1%.

Il test BAP, invece, si basa sulla capacità del campione biologico di ridurre il ferro dalla forma ferrica (Fe³⁺) a quella ferrosa (Fe²⁺).

La lettura della reazione viene eseguita mediante valutazione fotometrica a 505 nm. I dati sono espressi come μ mol di ioni ferrici riducenti antiossidanti per litro di campione, con valore di riferimento normale >2200 μ mol/L.

Secondo il produttore, d-ROM > 27,20 mg H₂O₂/dL e BAP < 2200 μ mol ferro/L sono valori soglia rappresentativi per la costruzione di un'alterazione SOS.

Entrambi i test vengono eseguiti in piastre da 96 pozzetti (Greiner bio-one) con il metodo endpoint, includendo un siero basso e uno alto come controlli e un calibratore interno fornito da Diacron International. Le assorbanze sono raccolte con un lettore TECAN INFINITE M PLEX (Tecan, Austria). I dati ottenuti sono indicati come media $\pm$ SD.

In aggiunta verranno dosati anche i livelli sierici di: F2 isoprostani, 3-nitrotirosina, Thiobarbituric acid reactive substances [TBARS], 4-Hydroxynonenal.

4. ANALISI DELLO STATO INFIAMMATORIO ATTRAVERSO IL DOSAGGIO DELLE CITOCINE

Il pannello di citochine selezionato prevede l'analisi di n.5 citochine coinvolte sia nei sistemi pro-infiammatori come TNF-alfa, IL-1beta, IL-6 sia nei sistemi anti-infiammatori come IL-10, IL-18 CRP (Proteina C-reattiva) e IFNgamma. TGF β .

La selezione del pannello di citochine è stata effettuata attraverso un'approfondita ricerca di letteratura in cui diversi studi hanno mostrato come l'analisi di questo set di citochine (sia anti-infiammatorie che pro-infiammatorie) possa essere un indicatore significativo dello stato infiammatorio su soggetti esposti a contaminanti (alcuni riferimenti: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121708> <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c04688>, <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.115188>)

L'analisi di tutte le citochine selezionate è svolta su siero mediante tecnica quantitativa ELISA (Enzyme-linked immunoabsorbent assays). Kit utilizzato Invitrogen - Thermofisher scientific®.

La procedura dell'esperimento per ciascuna citochina prevede i seguenti passaggi:

1. Incubazione overnight a 4°C della piastra contenente 100 μ L di Coating specifico in ciascun pozzetto della piastra da 96 well.
2. Dopo aver eseguito 3 lavaggi con 250 μ L/well di Wash Buffer la piastra è incubata a temperatura ambiente per 1h 200 μ L/well di ELISA/ELISPOT Diluent.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

3. Dopo aver eseguito 3 lavaggi con 250 μ l/well di Wash Buffer sono eseguite diluizioni seriali di 2 volte degli standard principali per ottenere la curva standard per un totale di 8 punti e nei restanti pozzetti aggiunti 100 μ l di siero di ciascun campione. La piastra è incubata per 2h a temperatura ambiente.
4. Dopo aver eseguito 3 lavaggi con 250 μ l/well di Wash Buffer sono diluiti 100 μ l di Detection Antibody in ciascun pozzetto. La piastra è incubata per 1h a temperatura ambiente.
5. Dopo aver eseguito 3 lavaggi con 250 μ l/well di Wash Buffer sono aggiunti 100 μ l di Streptavidina-HRP in ciascun pozzetto ed incubata la piastra per 30 minuti a temperatura ambiente.
6. Dopo aver eseguito 5 lavaggi con 250 μ l/well di Wash Buffer sono aggiunti 100 μ l/well di 1X TMB Solution ed incubata la piastra per 15 minuti al buio ed a temperatura ambiente.
7. La piastra viene letta allo spettrofotometro a 450nm.

5. ANALISI DEL PROFILO METABOLOMICO

Targeted e Global Metabolomic analisi verranno eseguite per valutare i cambiamenti dei principali metaboliti coinvolti nel metabolismo glucidico, lipidico e aminoacidico, e associati al metabolismo epatico. Per ogni analisi si utilizzano 50-60 μ l di plasma a cui vengono aggiunti 20 μ l di mix di standard interni marcati con isotopi stabili per la quantificazione targeted (MSK-A2-S Metabolomics Amino Acid Mix standard, CIL Cambridge, MA, USA e MSK-OA-1 Labeled Organic Acid Mix, CIL Cambridge, MA, USA). Prima dell'analisi le proteine vengono precipitate tramite centrifugazione dopo aver aggiunto 200 μ l di metanolo freddo. Il surnatante viene portato a secco sotto azoto, e viene metossilato con 10 μ l di una soluzione di metossilamina 20 mg/mL per 30 minuti a 60°C. Dopo evaporazione a secco sotto azoto, il campione viene derivatizzato utilizzando 30 μ l di N-tert-butyltrimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide (TBDMS, Sigma, USA) con l'aggiunta di 70 μ l di acetonitrile (1 ora a 60°C). Il volume viene trasferito in vial per essere analizzato mediante gascromatografia-spettrometria di massa (GCMS 5975 e GC-QQQ 8890/7000, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) dotato di una colonna DB5-MS (30 m $\times$ 0,25 mm i.d., 0,25 μ m) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Utilizziamo il software Agilent per l'identificazione dei picchi e l'analisi quantitativa dei metaboliti mirati utilizzando standard interni marcati e le librerie NIST e Fiehn per l'identificazione dei composti nelle analisi untargeted.

6. ANALISI DEL DANNO D'ORGANI TARGET E DELLE ALTERAZIONI EMODINAMICHE E DI CONDUZIONE

Questa sezione di analisi permetterà l'approfondimento di aspetti di danno d'organo e di alterazioni morfo-funzionali cardiovascolari tramite l'analisi strumentale di cuore e sistema



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

circolatorio arterioso (imaging morfo-funzionale per il danno di organo target cuore e carotide, segnale pressorio periferico e centrale ed ECG per alterazioni di conduzione cardiaca). Tutti i biomarcatori previsti dall'analisi sono stati selezionati tenendo conto di 3 fattori: la fattibilità dello studio, il contenuto informativo in termini di caratterizzazione dello stato patologico cardiovascolare e la documentata relazione tra di essi e i principali contaminanti ambientali.

Questa analisi sarà integrata con i dati anamnestici raccolti con il questionario, considerando in particolare quelli orientati all'identificazione della concomitante presenza di altre patologie della sfera della cardiovascolare (ipertensione arteriosa essenziale, diabete mellito di tipo 2, dislipidemia, iperuricemia, obesità), di fattori di rischio cardiovascolari (fumo, alcol, abitudini alimentari, attività fisica, pregressi eventi cardiovascolari proprio e familiari) e antropometrici (peso, altezza, circonferenza vita, circonferenza braccio, BMI).

L'analisi sarà integrata con la valutazione dello score non invasivo Atherosclerotic Cardiovascular Disease (ASCVD) risk attraverso il calcolatore disponibile online sul sito dell'American College of Cardiology.

I parametri strumentali valutati saranno:

- ecografia tronchi sovra-aortici con valutazione centralizzata (core-lab) di spessore medio intimale (IMT) e rigidità carotidea (carotid stiffness)
- ecografia cardiaca con valutazione centralizzata (core-lab) dei principali parametri morfo-funzionali di salute cardiaca. Valutazione di marcatori avanzati di alterazioni precoci (sub-patologiche) cardiache ottenuta tramite analisi dello strain e delle forze emodinamiche.
- misura oscillometrica/tonometrica pressoria periferica multi-sito con valutazione centralizzata (core-lab) della rigidità aortica e della pressione centrale. I parametri ricavati (PWV, PWA, cSBP, cDBP, cPP, Aix, CO e TPR) sono caratterizzati da un elevato potere prognostico per le malattie cardiovascolari-correlate
- caratterizzazione del tracciato ECG a 12 derivazioni con valutazione centralizzata (core-lab) compresa l'analisi tramite sistema AI (validato presso la Mayo Clinic) per la stima della età predetta da ECG verrà utilizzato per la misura del gap con l'età cronologica e la valutazione del rischio di eventi cardiovascolari fatali a lungo termine.

7. ANALISI DELLA FUNZIONALITA' E DEL DANNO RENALE

L'analisi dello stato di salute renale si baserà sulla valutazione di specifici biomarcatori urinari ed ematici di funzionalità e danno renale. A conseguenza della stretta interrelazione tra la malattia renale e cardiovascolare, i principali dati anamnestici e antropometrici utili alla suddetta valutazione coincidono con quelli già acquisiti (e riportati nell'apposita sezione) per l'approfondimento cardiovascolare.

- Parametri ematici: cistatina C, beta2 microglobulina, valutati tramite analisi con kit ELISA



Il Direttore:
Paolo Montuori

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

- Parametri urinari: albuminuria, creatininuria, KIM-1, NGAL, beta2 microglobulina, valutati tramite analisi con kit ELISA

8. DETTAGLI AGGIUNTIVI SUI RIFERIMENTI NORMATIVI

- **Direttiva 152/06:** Stabilisce i criteri per il monitoraggio dei metalli pesanti nell'ambiente e nei campioni biologici, come il **siero umano** e **urine**.
- **OECD Guidelines:** L'Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico fornisce linee guida dettagliate per i test sui metalli pesanti e altri contaminanti chimici in vari ambienti, inclusi campioni biologici umani.
- **IARC (International Agency for Research on Cancer):** Pubblica regolarmente valutazioni sugli effetti cancerogeni di sostanze chimiche, incluse le **diossine**, **PCB** e il **benzene**. Questi documenti sono fondamentali per comprendere i rischi legati all'esposizione a queste sostanze.
- **EPA (Environmental Protection Agency):** L'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente degli Stati Uniti fornisce valutazioni e linee guida per la salute umana relative a sostanze chimiche come il **triclorometano** (cloroformio), il **PFAS**, e altre sostanze tossiche.
- **Horizon2020 HBM4EU:** È un progetto europeo che ha prodotto report sulle metodologie di biomonitoraggio umano (Human Biomonitoring - HBM) per l'esposizione a inquinanti ambientali, come **metalli pesanti**, **pesticidi** e **composti organici**. I report di HBM4EU sono una risorsa importante per comprendere gli standard e i metodi di biomonitoraggio in Europa.
- **Cheng et al. 2019:** Studio che analizza l'esposizione all'arsenico e i suoi effetti sulla salute umana, utilizzando metodi analitici come la **GC-MS**.
- **Progetto BIOMAP:** ha studiato l'impiego delle citochine come biomarcatori per monitorare le risposte infiammatorie nei pazienti con malattie croniche della pelle, come la psoriasi. Il progetto ha aiutato a identificare citochine che potrebbero essere utilizzate per la diagnosi e la gestione di queste patologie;
- **Vandenberg et al., 2012:** Una revisione critica sull'esposizione al **Bisfenolo A (BPA)** e gli effetti sulla salute umana, fondamentale per il monitoraggio dei **bisfenoli** nei campioni biologici.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA
U.R.D. di Igiene Medicina Preventiva e Statistica Sanitaria
Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli – Italy

Il Direttore:
Paolo Montuori

9. ELENCO LABORATORI

LABORATORIO	REGIONE	ANALISI
ASST Brescia (ambulatori)	Lombardia	BIOCHI-CLINICHE
ASST Milano Nord e Melegnano (ambulatori)	Lombardia	BIOCHI-CLINICHE
ASST Mantova (ambulatori)	Lombardia	BIOCHI-CLINICHE
ASST Pavia (ambulatori)	Lombardia	BIOCHI-CLINICHE
ASST - UOOML Brescia, Brianza, Lecco, e Settelaghi	Lombardia	BIOM-ESPOS
Policlinico Milano	Lombardia	BIOM-ESPOS
USL Toscana Nord Ovest (ATNO)	Toscana	BIOCHI-CLINICHE
Laboratorio di Sanità Pubblica Siena (solo urine)	Toscana	BIOM-ESPOS
IZS del Lazio e della Toscana (IZSLT)	Toscana	BIOM-ESPOS
CNR Istituto di Fisiologia Clinica (IFC-CNR)	Toscana	BIOM-EFFETTO
Università di Pisa (UNIFI)	Toscana	BIOM-EFFETTO
ULSS 3 Serenissima	Veneto	BIOM-ESPOS
ARPA Veneto	Veneto	BIOM-ESPOS
CEINGE	Campania	BIOM-ESPOS
IZS del Mezzogiorno	Campania	BIOM-ESPOS
Università di Napoli "Federico II" - UNINA	Campania	BIOCHI-CLINICHE
Università di Napoli "Federico II" - UNINA	Campania	BIOM-ESPOS
Università di Napoli "Federico II" - UNINA	Campania	BIOM-EFFETTO
ASL Salerno	Campania	BIOCHI-CLINICHE
ARPA Umbria	Umbria	Da definire
IZS Umbria e Marche	Umbria	Da definire
Università di Perugia – Azienda Ospedaliera	Umbria	Da definire
ASL Umbria 2	Umbria	Da definire
IZS Umbria e Marche	Marche	Da definire
Università Politecnica delle Marche (UNIVPM)	Marche	Da definire