



DRAFT DI PROTOCOLLO PER “ARRUOLAMENTO E SORVEGLIANZA EPIDEMIOLOGICA DI UNA COORTE DI NATI RESIDENTI IN AREE DI INTERESSE NAZIONALE PER LA BONIFICA E AREE DI CONFRONTO LOCALE”

MARZO 2021

A cura del gruppo di lavoro “**I primi 1000 giorni**”

Questo documento nasce nell'ambito del progetto Coorti di nuovi nati, esposizioni ambientali e promozione della salute nei primi 1000 giorni di vita: integrazione dei dati di esposizione con dati molecolari ed epigenetici (CUP: C92F17003030001), **un progetto esecutivo del programma Centro Nazionale per la Prevenzione ed il Controllo delle Malattie (CCM) 2017, realizzato con il supporto finanziario del CCM-Ministero della Salute**



OBIETTIVI

Il presente protocollo è stato sviluppato per lo studio di aree ad elevato rischio ambientale e prevede approfondimenti dedicati alla determinazione della presenza di inquinanti in tutte le matrici ambientali (suolo, aria, acque) e contestualmente una raccolta dettagliata di informazioni sull'alimentazione dei soggetti partecipanti e sulla provenienza di specifiche categorie merceologiche, acquistate e vendute dalle principali insegne della Grande Distribuzione Organizzata (GDO) nelle aree oggetto dello studio, per l'analisi del trasferimento dei contaminanti dall'ambiente al *food*.

Nel progetto viene inoltre sviluppata una cospicua parte sanitaria mirata alla identificazione dei rapporti fra esposizione ad inquinanti e danno a specifici organi ed apparati (epidemiologia eziologica). Inoltre, il protocollo prevede la creazione di coorti di nascita composte da donne in gravidanza residenti nelle aree dei SIN e dai loro bambini, insieme ad una popolazione di donne gravide residenti in aree limitrofe. Ciò al fine di studiare il possibile effetto dell'esposizione prenatale su numerose condizioni di salute, fra cui i disturbi respiratori, l'obesità, i disturbi dello sviluppo cognitivo e del comportamento e le patologie infettive. Saranno quindi approfonditi i potenziali rischi associati agli stili di vita adottati in gravidanza in donne residenti in aree a forte rischio ambientale, ed in particolare sarà investigato il ruolo della placenta nel mediare l'esposizione fetale.

RAZIONALE

Negli ultimi anni ingenti risorse economiche sono state impiegate nella valutazione e nella caratterizzazione degli effetti dei contaminanti ambientali sulla salute in età pediatrica. Tuttavia più recentemente numerosi studi hanno messo in luce come l'alterazione dell'ambiente intrauterino durante le fasi dello sviluppo fetale possa condizionare la salute durante tutta la vita. Tale concetto è noto come DoHAD, *Developmental Origins of Health and Disease*. Lo sviluppo fetale e la prima infanzia rappresentano periodi caratterizzati da un intenso sviluppo ed elevata plasticità che rendono tale finestra temporale particolarmente suscettibile all'influenza dell'ambiente esterno. L'inquinamento atmosferico e l'esposizione ad agenti chimici (ad esempio interferenti endocrini e metalli pesanti), alcuni stili di vita scorretti e la storia medica materna durante la gravidanza possono provocare cambiamenti sostanziali nell'ambiente intrauterino. Tali modifiche innescano risposte adattive del feto che di concerto con fattori genetici possono predisporre a malattie della prima infanzia, così come a patologie croniche. La placenta è il punto di interfaccia tra la madre ed il feto in via di sviluppo, rappresenta una barriera di protezione per l'ambiente fetale, sostiene e coordina inoltre lo sviluppo del feto durante la gestazione. Alterazioni della fisiologia placentare sono associate a ritardo della crescita intrauterina, a nascite pre-termine e alla preeclampsia. Questi rappresentano fattori di rischio per numerose condizioni patologiche nei primi anni di vita. Inoltre, quando riscontrate in associazione a fattori genetici ed ambientali, possono determinare suscettibilità a patologie della vita adulta. L'efficienza placentare è determinata in parte dalla componente genetica, e in parte, dalla sua risposta all'ambiente intrauterino.

La presenza di tossicanti nella placenta è associata ad alterazioni strutturali e di funzionamento della stessa, con conseguenze dirette sullo sviluppo fetale: un esempio è fornito dall'esposizione al fumo di sigaretta durante la gravidanza. È stata dimostrata infatti una modificazione dell'espressione genica delle cellule placentari e fetali in relazione all'esposizione sia diretta che indiretta al fumo di tabacco utilizzando come proxy di esposizione le concentrazioni di Cadmio nella



placenta. Concentrazioni elevate di mercurio nei tessuti fetali sono associate alla riduzione della sintesi ormonale ed al consumo di ossigeno da parte della placenta. Numerosi composti organici persistenti sono stati misurati nei tessuti fetali ed in particolare nella placenta. L'esposizione a PCB e PBDE è stata dimostrata interferire con i processi di sviluppo e crescita fetale determinando una significativa riduzione del peso alla nascita.

La valutazione del ruolo della placenta nel mediare l'esposizione fetale può essere indagata attraverso indagini biomolecolari, con utilizzo di campioni di sangue materno, sangue cordonale e placenta come biomatrici per la valutazione dell'esposizione ambientale durante la gestazione. L'impatto degli inquinanti ambientali sull'espressione genica ha recentemente attirato l'attenzione come nuova frontiera per la ricostruzione del nesso eziologico tra esposizione ed effetti sulla salute. Il presente protocollo prevede quindi di valutare l'impatto degli inquinanti sull'espressione genica placentare. Il profilo trascrittomico della placenta fornirà informazioni sulle differenze di espressione di un vasto gruppo di geni sotto l'influenza degli inquinanti ambientali.

RAZIONALE

Le attività di studio e sorveglianza epidemiologica di nati residenti in siti di interesse nazionale e in aree ad elevato rischio ambientale possono richiedere l'arruolamento di coorti di controllo, arruolate in aree diverse. L'identificazione di queste aree di confronto locale può essere realizzata sulla base dei dati di nascita desunti da CeDAP (possibilità di identificare punti nascita di riferimento; numero di nati nelle aree di studio e di controllo) e sul criterio dei comuni limitrofi. Le aree di controllo possono essere ad esempio quelle che si trovano in un raggio di massimo 50 km rispetto al SIN, con un numero di nati sufficienti a fungere da popolazione di controllo e con una sufficiente concentrazione di nati/anno nei punti nascita identificati come riferimento. La scelta di utilizzare un criterio spaziale per la definizione delle aree di controllo deriva dalla necessità di garantire condizioni socio-economiche e stili di vita confrontabili con quelli delle aree in studio.

POSSIBILI ATTIVITÀ DA PROGRAMMARE

Per studiare adeguatamente esposizioni ed esiti di salute è necessario seguire nel tempo donne e bambini arruolati nelle coorti e realizzare periodiche raccolte di campioni biologici che andranno conservati in maniera stabile in appositi biorepository/biobanche, senza scopo di lucro e con esclusiva finalità di ricerca. I campioni biologici, che potranno riguardare sia i genitori che il bambino e che saranno conservati per 18 anni dall'inizio dello studio, dipenderanno dal disegno finale, dalle esposizioni da determinare nelle diverse zone (che potranno essere determinate in maniera precisa utilizzando i dati presentati dallo studio SENTIERI) e dai finanziamenti disponibili e potranno includere:



- 1) Sangue materno prelevato al momento dell'arruolamento
- 2) Sangue materno prelevato al parto
- 3) Sangue cordonale
- 4) Tessuto cordonale
- 5) Tessuto placentare
- 6) Latte materno
- 7) Capelli
- 8) Unghie
- 9) Denti da latte
- 10) Urine
- 11) Liquido spermatico

Anche gli esiti che saranno valutati e le misurazioni che saranno realizzate sui campioni raccolti dipenderanno dalle esposizioni di interesse, e potranno quindi essere diverse a seconda delle aree di studio. A titolo esemplificativo, si riportano di seguito le attività pianificate (arruolamento, raccolta dati e campioni biologici e relative analisi) per lo studio **NEHO** (Neonatal Environment and Health Outcomes) "Arruolamento e sorveglianza epidemiologica di una coorte di nati residenti in aree di interesse nazionale per la bonifica e aree di confronto locale" realizzato in alcuni SIN della Sicilia (www.neho.it). Si sottolinea comunque che tali attività sono ampiamente generalizzabili e quindi applicabili, alla maggior parte delle aree ad elevato rischio ambientale. Un esempio di studio di fattibilità realizzato a partire da questo protocollo, che include anche un'ipotesi di costi, è disponibile sul sito web millegiorni.info, nella sezione Protocolli di intervento <https://millegiorni.info/per-i-decisoriprotocolli-di-intervento/>.



FASE I

Promozione dello studio

La promozione sarà effettuata attraverso una prima fase di sensibilizzazione e formazione del personale ospedaliero, ginecologi ed ostetrici a contatto diretto con le possibili partecipanti, con workshop inerenti le tematiche e gli obiettivi della ricerca. Al fine di potenziare l'adesione allo studio sarà attivata una campagna di sensibilizzazione e diffusione sul territorio degli scopi del progetto secondo le seguenti modalità:

- i) Diffusione di materiale informativo sotto forma di poster da affiggere nei reparti di ginecologia e ostetricia dei punti nascita selezionati per lo studio.
- ii) Distribuzione di brochure contenenti materiale informativo alle donne in gravidanza residenti nelle aree di studio durante le visite di routine e i corsi pre-parto.
- iii) Realizzazione di campagne di promozione web in forum e siti internet a carattere medico/sanitario (come per esempio i siti internet degli ospedali coinvolti, delle Aziende Sanitarie, delle Regioni coinvolte, ecc.).
- iv) Pubblicizzazione attraverso forum web dedicati alla gravidanza.
- v) Creazione di una pagina Web dedicata alle attività dello studio.

FASE II

Reclutamento e somministrazione questionario "baseline"

L'arruolamento, su base esclusivamente volontaria, avverrà in occasione delle visite ospedaliere di routine nel corso degli ultimi due mesi di gravidanza. Ciascuna delle donne cui sarà proposta la partecipazione allo studio avrà modo di leggere la nota informativa e potrà quindi decidere se firmare il consenso informato relativo al trattamento dei dati personali, alla raccolta, conservazione e utilizzo del materiale biologico per soli fini di ricerca. Le donne saranno informate delle finalità del progetto e della sua durata da personale medico delle strutture ospedaliere sopra elencate e saranno invitate ad aderire allo studio. Non sarà mai necessario recarsi presso l'ospedale al di fuori delle visite previste per il follow-up della gravidanza.

I criteri generali per l'inclusione nello studio sono:

1. Completa comprensione della lingua italiana scritta e parlata.
2. Residenza nelle aree di studio da almeno un anno.
3. Età compresa tra i 18 ei 40 anni.
4. Non aver seguito un programma di riproduzione assistita.
5. Assenza di malattie croniche gravi incluse diabete o ipertensione.
6. Assenza di qualsiasi complicazione durante la gravidanza.



Alla firma del consenso informato le donne saranno intervistate al fine di raccogliere informazioni sulla storia clinica precedente la gravidanza, lo stato socioeconomico, lo stile di vita, la dieta, le eventuali esposizioni ambientali (domestiche e lavorative). Saranno inoltre raccolte informazioni relative al decorso della attuale gravidanza, al partner e alla percezione del rischio ambientale. La raccolta di tali dati sarà effettuata da personale medico/ricercatore adeguatamente formato, attraverso un device elettronico e i dati raccolti saranno inviati al server dedicato e resi anonimi. Sarà contestualmente chiesto di donare 15 ml di sangue (in *vacutainer metal free*) sul quale sarà valutata la presenza di inquinanti ambientali organici ed inorganici. Ad integrazione dei dati ottenuti tramite questionario, verranno raccolte tramite SIO (Sistema Informativo Ospedaliero) informazioni relative alle ospedalizzazioni delle volontarie a partire dai due anni precedenti la gravidanza.

Protocollo prelievo sangue materno (primo prelievo)

- Applicare il laccio emostatico sul braccio.
- Prelevare 15 ml di sangue da una vena antecubitale mediante ago sterile (Venject o simili).
- Suddividere il campione ematico in una provetta con EDTA e due Sierologiche (entrambe certificate *metals free*).
- Riempire le provette iniziando da quella con EDTA e procedere con le due Sierologiche.
- Centrifugare entrambe le tipologie di provette a 3000 g per 10 minuti:
 - Per le provette in EDTA separare Plasma e buffy coat in cryovials (*metals free* ed *RNAsi free*) accuratamente marcati con il codice identificativo del soggetto e la tipologia del campione e congelare a -20°C.
 - Per le provette Sierologiche prelevare unicamente il siero e suddividerlo in cryovials accuratamente marcati con il codice identificativo del soggetto e la tipologia del campione quindi congelare a -20°C.
- Ciascun campione, in forma anonima, sarà registrato in un archivio gestionale informatizzato che ne consentirà la tracciabilità.
- I campioni saranno temporaneamente stoccati presso il punto nascita e periodicamente trasferiti presso biobanche previamente identificate dove verranno conservati a -80°C sino al momento delle analisi.
- Il materiale biologico sarà conservato fino al compimento del 18° anno di età del soggetto.

FASE III

Campionamento della placenta, sangue materno e sangue cordonale

Nell'immediato dopo parto saranno eseguiti i campionamenti del tessuto placentare e del sangue cordonale. A tale scopo il personale ospedaliero preposto al campionamento dovrà raccogliere la placenta e trasportarla in un locale idoneo alle procedure di campionamento. Le annotazioni riguardanti una caratterizzazione macroscopica della placenta (posizionamento cordone, presenza di alterazioni strutturali, peso e diametro) saranno raccolte prima di procedere con i prelievi. Per prima cosa sarà prelevato il sangue cordonale venoso (15 ml) entro 30 minuti dal parto.



PRIMI
1000
GIORNI

I campioni di sangue cordonale e materno saranno utilizzati per la valutazione dei tossicanti, le porzioni di placenta prelevate saranno utilizzate sia per la valutazione dei tossicanti sia per l'analisi biomolecolare *genome wide mRNA analysis*. Il materiale biologico non analizzato sarà conservato nella biobanca a -80°C per future analisi inerenti gli obiettivi del progetto. Il materiale biologico sarà conservato fino al compimento del 18° anno di età del soggetto.

Protocollo prelievo sangue materno (secondo prelievo)

- Applicare il laccio emostatico sul braccio.
- Prelevare 15 ml di sangue da una vena antecubitale mediante ago sterile (Venoject o simili).
- Suddividere il campione ematico in una provetta con EDTA e due Sierologiche (entrambe certificate metals free).
- Riempire le provette iniziando da quella con EDTA e procedere con le due Sierologiche.
- Centrifugare entrambe le tipologie di provette a 3000 g per 10 minuti:
 - Per le provette in EDTA separare Plasma e buffy coat in cryovials (metals free ed RNAsi free) accuratamente marcati con il codice identificativo del soggetto e la tipologia del campione e congelare a -20°C.
 - Per le provette Sierologiche prelevare unicamente il siero e suddividerlo in cryovials accuratamente marcati con il codice identificativo del soggetto e la tipologia del campione quindi congelare a -20°C.
- Ciascun campione, in forma anonima, sarà registrato in un archivio gestionale informatizzato che ne consentirà la tracciabilità.
- I campioni saranno temporaneamente stoccati presso il punto nascita e periodicamente trasferiti presso biobanche previamente identificate dove verranno conservati a -80°C sino al momento delle analisi.
- Il materiale biologico sarà conservato fino al compimento del 18° anno di età del soggetto.

Protocollo prelievo sangue cordonale:

- Subito dopo la nascita clampare il cordone con delle pinze in prossimità del neonato.
- Tagliare il cordone tra le due pinze.
- Pulire accuratamente il cordone con una soluzione isotonica sterile.
- Disinfettare la parte di cordone in cui sarà inserito l'ago collegato alla camicia per le provette.
- Riempire le provette iniziando da quella con EDTA e successivamente le due Sierologiche (entrambe certificate *metals free*).
- Centrifugare entrambe le tipologie di provette a 3000 G per 10 minuti in centrifuga refrigerata (4°C).
- Per le provette in EDTA separare Plasma e *buffy coat in cryovials (metals free e RNAsi free)* accuratamente marcati con il codice identificativo del soggetto e la tipologia del campione e congelare a -20°C.
- Per le provette Sierologiche prelevare unicamente il siero e suddividerlo in cryovials accuratamente marcati con il codice identificativo del soggetto e la tipologia del campione quindi congelare a -20°C.



- Ciascun campione, in forma anonima, sarà etichettato e registrato in un archivio gestionale informatizzato che ne consentirà la tracciabilità.
- I campioni saranno temporaneamente stoccati presso il punto nascita e periodicamente trasferiti presso biobanche previamente identificate dove verranno conservati a -80°C sino al momento delle analisi.
- Il materiale biologico sarà conservato fino al compimento del 18° anno di età del soggetto.

Protocollo prelievo tessuto placentare:

- Compilare la scheda ostetrica relativa all'esame macroscopico della placenta.
- Pesare e misurare la placenta.
- Eliminare la parte più esterna e l'eventuale eccesso di sangue.
- Utilizzare il punch per biopsia per campionare la placenta (un punch per placenta). suddividere idealmente il campione in quattro aree centrate sul cordone.
- Poggiare il punch sulla placenta e applicare una leggera e costante pressione ruotando il punch tra il pollice e l'indice.
- Sollevare la biopsia con una pinza chirurgica sterile e tagliare cercando di eliminare le membrane fetali aiutandosi con un bisturi sterile.
- Prima di trasferire il campione nel cryovials eliminare l'eccesso di sangue utilizzando un recipiente sterile contenente PBS con inibitori delle RNAsi.
- Eseguire tre biopsie per quadrante: una prossimale al cordone (3/4 cm di distanza), una marginale (3/4 cm dal bordo) ed una intermedia alle due, evitando di intaccare i grossi vasi.
- Il campione centrale di ciascuna sezione sarà utilizzato per le analisi biomolecolari
- Al campione andranno aggiunti circa 600 microlitri di RNAlater (criopreservante) sino alla copertura dell'intero campione.
- Il campione con RNAlater andrà mantenuto 24 h a 4°C e successivamente andrà trasferito a -20°C per ulteriori 24h al termine delle quali la biopsia andrà trasferita in un nuovo cryovials e conservata a -20°C sino al trasferimento presso la biobanca del progetto.

Raccolta, conservazione e utilizzo dei campioni biologici

Il prelievo dei campioni biologici è gestito dalle U.O. di Ostetricia e Ginecologia delle strutture ospedaliere selezionate dallo studio.

I campioni, inizialmente saranno temporaneamente stoccati presso il punto nascita. Periodicamente saranno trasferiti, con l'ausilio di appositi corrieri, presso biobanche previamente identificate, dove verranno conservati a -80°C sino al momento delle analisi.

Trasporto, conservazione e analisi dei campioni biologici saranno gestiti sotto la responsabilità dello sperimentatore principale.

Con la firma dei consensi informati si autorizza:

- Il prelievo di sangue materno.
- Il prelievo di sangue cordonale.
- Il prelievo di tessuto placentare.
- La conservazione dei campioni biologici della mamma e del bambino per un periodo di 18 anni.



PRIMI
1000
GIORNI

- La registrazione di informazioni da Cartella Clinica inerenti il parto e parametri del neonato e della mamma
- L'estrazione di RNA, DNA e la valutazione di sostanze inquinanti eventualmente presenti nei campioni.
- Il loro utilizzo per analisi riguardanti i fattori coinvolti nello sviluppo di una delle patologie e/o condizioni di salute indagate.
- L'uso di questi campioni esclusivamente nell'ambito di progetti, approvati dai competenti Comitati Etici, per scopi scientifici direttamente collegati a quelli per i quali sono stati originariamente raccolti.
- L'invio di questionari alla nascita e al ricontatto tramite mail/interviste telefoniche (6 - 12 mesi).
- L'interrogazione degli archivi di dati del Servizio Sanitario Nazionale relativi a: Pronto soccorso, ospedalizzazioni e altri eventi avversi.
- Il trattamento dei dati personali nello studio in oggetto.

Analisi del materiale biologico raccolto

Saranno eseguite determinazioni:

- del contenuto di inquinanti ambientali, organici e inorganici, eventualmente presenti nel sangue materno e cordonale e nel tessuto placentare;
- del trascrittoma dei campioni di placenta.

Valutazione degli inquinanti ambientali

Sulla base delle caratteristiche specifiche di ciascuno dei siti selezionati nonché dei risultati delle relative indagini ambientali, saranno valutati i livelli di sostanze inorganiche (metalli pesanti) e organiche (persistent organic pollutants - POPs) mediante analisi eseguite presso laboratori accreditati per indagini su matrici biologiche.

Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale sarà estratto da ciascun campione di placenta utilizzando un kit a colonnine (RNeasy mini kit, Quiagene, Netherlands). Il controllo qualitativo dell'estrazione verrà eseguito attraverso spettrometro Nanodrop (Nanodrop, USA), fluorimetro Qubit (life technologies, USA) ed elettroforesi capillare (Bioanalyzer 2100 microcapillary (Agilent, USA).

Analisi Microarray

Le analisi in Microarray saranno eseguite utilizzando la tecnologia Agilent (Santa Clara, CA, USA). L'RNA di cinque campioni placentari dello stesso gruppo sperimentale (con stesso range di tossicante riscontrato nelle analisi di biomonitoraggio) saranno analizzati insieme al fine di diminuire la variabilità soggettiva del singolo campione (pooling strategy). Dieci pool così costituiti saranno preparati per ciascun gruppo sperimentale. L'RNA di ogni singolo pool sarà



PRIMI
1000
GIORNI

amplificato e marcato al 3' o 5' attraverso TWO-Color Low Input Quick Amp Kit (Agilent, USA). Coppie di pool, da differenti gruppi sperimentali, saranno analizzati in un singolo Microarray SurePrint G3 Human Gene Expression v3 8x60k (GE Hybridization Kit, Agilent, USA). L'acquisizione delle immagini dei chip saranno eseguite su G2565CA Microarray scanner (Agilent, USA). I dati ottenuti saranno analizzati ed estratti attraverso Feature Extration Software.

Analisi statistica dei dati

Le associazioni tra residenza in aree altamente inquinate delle madri, i livelli di contaminante nelle biomatrici e il verificarsi di outcome avversi nella salute del bambino saranno studiate applicando modelli misti lineari generalizzati. Le tradizionali tecniche di analisi statistica sui microarray, utilizzate per lo studio dell'espressione genica, saranno effettuate adottando la strategia del pooling sui campioni di mRNA. Nella fattispecie, l'analisi statistica dei dati microarray verrà eseguita utilizzando il software Bioconductor e saranno utilizzati modelli lineari per microarray (pacchetto Linear Models for Microarray and RNA-Seq Data - limma). Al fine di analizzare correttamente i dati ottenuti saranno effettuate: la correzione del fondo; la normalizzazione intra- e tra- gli array ("normexp", "loess" e "Aquantile") e la rettifica p-value Benjamini e Hochberg. Saranno quindi ottenuti gli elenchi di geni differenzialmente espressi da ogni esperimento attraverso Enrichr (Enrichr: un server web per le analisi arricchimento, aggiornato al 2016).

FASE IV

Follow-up attraverso questionario/intervista telefonica

Le donne reclutate saranno invitate a compilare due questionari di follow-up per via telematica (attraverso la ricezione via mail del link alla piattaforma CISAS e delle credenziali per l'accesso). In alternativa le donne saranno intervistate telefonicamente. I due questionari saranno inviati a 6 e a 12 mesi dalla nascita.

Nello specifico, il questionario somministrato a 6 mesi dalla nascita sarà volto a monitorare lo stato di salute e le misure antropometriche del neonato, la sua alimentazione e svezzamento, i disturbi del sonno, incidenti, traumi ed eventuale insorgenza di patologie respiratorie. Sarà investigata anche la salute della mamma nel periodo post-natale, la sua alimentazione, eventuale abitudine al fumo di sigaretta ed esposizione passiva.

Il questionario somministrato a 12 mesi dalla nascita si propone di approfondire le traiettorie di sviluppo del bambino, monitorando l'andamento delle condizioni di salute e malattie.

OUTCOME

L'obiettivo principale del protocollo è quello di monitorare l'andamento di numerose condizioni di salute correlandole alla presenza di contaminanti (Metalli Pesanti [HM], sostanze organoclorurate persistenti [POPs], Polibromodifenileteri [PBDE] e Policlorobifenili [PCB]) durante la gravidanza.

Infatti, uno degli outcome principali del progetto è la valutazione degli inquinanti nelle matrici biologiche in relazione agli stili di vita di donne residenti in aree ad elevato impatto ambientale. In particolare, saranno valutati nel dettaglio, attraverso questionario, le seguenti informazioni:



- i) Dieta e abitudini alimentari.
- ii) Consumo di acqua e tipologia di approvvigionamento.
- iii) Esposizioni domestiche e lavorative (incluso pendolarismo).
- iv) Utilizzo di farmaci.
- v) Esposizione a fumo di sigaretta.
- vi) Storia riproduttiva.
- vii) Decorso dell'attuale gravidanza e delle eventuali precedenti.

Lo studio prevede, inoltre, la valutazione dei seguenti outcome del bambino:

OUTCOME	DESCRIZIONE	REFERENCE
Nascita	<ul style="list-style-type: none"> • Durata della gestazione • Misure antropometriche del neonato • Apgar score (5', 10') 	<ul style="list-style-type: none"> • Al-Saleh I. et al., 2014. • Andraweera P.H. et al., 2016. • Govarts, E. et al., 2014. • Slama, R. et al., 2014.
6 mesi	<ul style="list-style-type: none"> • Misure antropometriche a 6 mesi • Patologie respiratorie • Ricoveri • Tappe motorie generali • Tappe motorie fini • Tappe evolutive 	<ul style="list-style-type: none"> • Dietrich K.N. et al., 1993. • Herbstman, J.B. et al., 2010. • Oken, E. et al. 2005. • Wachtel, R. C. et al., 1994. • Wright, R.O. et al., 2006.
12 mesi	<ul style="list-style-type: none"> • Misure antropometriche a 12 mesi • Patologie respiratorie • Ricoveri • Infortuni o incidenti • Qualità del sonno • Tappe motorie generali • Tappe motorie fini • Tappe evolutive 	<ul style="list-style-type: none"> • Dietrich K.N. et al., 1993. • Herbstman, J.B. et al., 2010. • Oken, E. et al. 2005. • Wachtel, R. C. et al., 1994. • Wright, R.O. et al., 2006.



PRIMI
1000
GIORNI

24 mesi	<ul style="list-style-type: none">• Misure antropometriche a 12 mesi• Patologie respiratorie• Ricoveri• Infortuni o incidenti• Qualità del sonno• Tappe motorie generali• Tappe motorie fini• Tappe evolutive• Valutazione dello sviluppo neuro-psicologico	<ul style="list-style-type: none">• Dietrich K.N. et al., 1993.• Herbstman, J.B. et al., 2010.• Oken, E. et al. 2005.• Wachtel, R. C. et al., 1994.• Wright, R.O. et al., 2006.• Qi, et al. 2019,• Agier, et al 2019,• Nevarez, et al 2010,• Vanker, et al. 2017,• Helleskov, et al. 2017,• SINPIA 2019,• Adams-Chapman 2018
6 mesi	<ul style="list-style-type: none">• Misure antropometriche a 6 mesi• Patologie respiratorie• Ricoveri• Tappe motorie generali• Tappe motorie fini• Tappe evolutive	<ul style="list-style-type: none">• Dietrich K.N. et al., 1993.• Herbstman, J.B. et al., 2010.• Oken, E. et al. 2005.• Wachtel, R. C. et al., 1994.• Wright, R.O. et al., 2006.
12 mesi	<ul style="list-style-type: none">• Misure antropometriche a 12 mesi• Patologie respiratorie• Ricoveri• Infortuni o incidenti• Qualità del sonno• Tappe motorie generali• Tappe motorie fini• Tappe evolutive	<ul style="list-style-type: none">• Dietrich K.N. et al., 1993.• Herbstman, J.B. et al., 2010.• Oken, E. et al. 2005.• Wachtel, R. C. et al., 1994.• Wright, R.O. et al., 2006.



PRIMI
1000
GIORNI

24 mesi	<ul style="list-style-type: none">• Misure antropometriche a 12 mesi• Patologie respiratorie• Ricoveri• Infortuni o incidenti• Qualità del sonno• Tappe motorie generali• Tappe motorie fini• Tappe evolutive• Valutazione dello sviluppo neuro-psicologico	<ul style="list-style-type: none">• Dietrich K.N. et al., 1993.• Herbstman, J.B. et al., 2010.• Oken, E. et al. 2005.• Wachtel, R. C. et al., 1994.• Wright, R.O. et al., 2006.• Qi, et al. 2019,• Agier, et al 2019,• Nevarez, et al 2010,• Vanker, et al. 2017,• Helleskov, et al. 2017,• SINPIA 2019,• Adams-Chapman 2018
6 mesi	<ul style="list-style-type: none">• Misure antropometriche a 6 mesi• Patologie respiratorie• Ricoveri• Tappe motorie generali• Tappe motorie fini• Tappe evolutive	<ul style="list-style-type: none">• Dietrich K.N. et al., 1993.• Herbstman, J.B. et al., 2010.• Oken, E. et al. 2005.• Wachtel, R. C. et al., 1994.• Wright, R.O. et al., 2006.
12 mesi	<ul style="list-style-type: none">• Misure antropometriche a 12 mesi• Patologie respiratorie• Ricoveri• Infortuni o incidenti• Qualità del sonno• Tappe motorie generali• Tappe motorie fini• Tappe evolutive	<ul style="list-style-type: none">• Dietrich K.N. et al., 1993.• Herbstman, J.B. et al., 2010.• Oken, E. et al. 2005.• Wachtel, R. C. et al., 1994.• Wright, R.O. et al., 2006.

Al termine del progetto saranno valutate le caratteristiche e i modelli di bioaccumulo di HM, PBDE e PCB attraverso l'analisi della loro distribuzione nel sangue materno e cordonale e nel tessuto placentare. Saranno definite le associazioni tra contaminazione placentare ed espressione dell'mRNA placentare.



PRIMI
1000
GIORNI

COMUNICAZIONE DEI RISULTATI

Risultati di analisi biochimiche che nel futuro potrebbero essere eseguite sui campioni biologici verranno comunicati, da personale medico specialistico appositamente incaricato, alle mamme e/o ai genitori del bambino, qualora se ne ravvisi un impatto sulla salute dei soggetti interessati.

Per quanto riguarda analisi di tipo genetico, si precisa che non verranno eseguiti test di tipo diagnostico: i risultati di queste analisi, allo stato attuale delle conoscenze, non hanno valore clinico di interesse per il singolo soggetto, né un valore predittivo di patologie e non verranno quindi comunicati.

TRATTAMENTO DEI DATI PERSONALI

Tutte le informazioni raccolte in questo Studio saranno trattate nel rispetto della normativa Italiana sulla tutela dei dati personali e sensibili (D.lgs. 196/2003). I dati identificativi (nome, cognome, data e luogo di nascita, luogo di residenza) e del neonato/a verranno registrati separatamente dai dati relativi ai campioni di sangue e alle informazioni cliniche, sanitarie e demografiche raccolte. Tutti i dati personali e sensibili saranno trattati elettronicamente con tutti i criteri che realizzano la massima riservatezza, nel rispetto delle norme di sicurezza per gli archivi informatici e cartacei dettate dal D.lgs 196/03, dal Codice Deontologico per la ricerca scientifica (2004) e dall'Autorizzazione al trattamento dei dati genetici (Autorità Garante giugno 2011).

I campioni e i dati clinici, socio-sanitari e demografici saranno anonimizzati: dopo la raccolta verranno conservati separatamente da quelli identificativi (nome, cognome, ecc.) e sarà loro assegnato un codice composto di numeri e lettere che, per sé stesso, non permetterà di identificare direttamente i partecipanti. Le connessioni tra i codici e i dati identificativi verranno conservate nel rispetto delle misure di sicurezza per la tutela della privacy e della confidenzialità dei dati previste dalla normativa sopra indicata. Solo i Responsabili del Progetto e gli Incaricati del Trattamento dei dati personali saranno in grado e potranno ricollegare i codici ai dati identificativi per esclusive finalità tecniche di controllo dati, controllo di qualità e/o per finalità sanitarie che riguardassero direttamente le persone interessate.

Inoltre, per motivi di tipo tecnico ed in via temporanea, i campioni (in forma rigorosamente anonimizzata con un sistema di doppia codifica che garantisce maggiormente la non identificabilità dei donatori) potranno essere inviati ad un laboratorio di analisi esterno, che fornisca tutte le garanzie di legge in ottemperanza alla normativa vigente.

Dell'invio eventuale al laboratorio sarà data dettagliata informazione sul sito del Progetto con l'indicazione delle figure Responsabili del laboratorio stesso. Esclusivamente nell'ambito di progetti congiunti, approvati dai competenti Comitati Etici, si potrà comunicare ad Enti e Istituti di ricerca, organismi pubblici, fondazioni scientifiche, associazioni senza scopo di lucro aventi finalità di ricerca i dati socio-demografici, epidemiologici, clinici, nonché trasferire i campioni, rigorosamente codificati, per scopi scientifici direttamente collegati a quelli per i quali sono stati originariamente raccolti. I soggetti partecipanti si impegneranno formalmente a non trattare i dati e/o utilizzare i campioni per fini diversi da quelli indicati nel Progetto condiviso e a non comunicarli o trasferirli ulteriormente a terzi.

Mai i campioni ed i relativi dati socio-demografici, clinici e genetici potranno essere comunicati a terzi fuori da progetti scientifici condivisi ed approvati dal Comitato Etico, né potranno essere utilizzati per fini di lucro.



Per le finalità di ricerca scientifica, i dati raccolti e i risultati prodotti saranno pubblicati in forma aggregata, quindi rigorosamente anonima, su riviste scientifiche.

Si riporta, qui di seguito, il disposto del General Data Protection Regulation (EU 2016/679) sui diritti dei partecipanti:

1. L'interessato ha il diritto di ottenere dal titolare del trattamento la conferma che sia o meno in corso un trattamento di dati personali che lo riguardano e in tal caso, di ottenere l'accesso ai dati personali.
2. L'interessato ha diritto di ottenere l'indicazione di:
 - a. Origine dei dati personali.
 - b. Finalità e modalità del trattamento.
 - c. Logica applicata in caso di trattamento effettuato con l'ausilio di strumenti elettronici.
 - d. Estremi identificativi del titolare e dei responsabili.
 - e. Soggetti o categorie di soggetti ai quali i dati personali possono essere comunicati o che possono venirne a conoscenza.
3. L'interessato ha diritto di ottenere:
 - a. L'aggiornamento, la rettifica ovvero, quando vi ha interesse, l'integrazione dei dati.
 - b. La cancellazione, la trasformazione in forma anonima o il blocco dei dati trattati in violazione di legge, compresi quelli di cui non è necessaria la conservazione in relazione agli scopi per i quali i dati sono stati raccolti o successivamente trattati.
 - c. L'attestazione che le operazioni di cui alle lettere a. e b. sono state portate a conoscenza, anche per quanto riguarda il loro contenuto, di coloro ai quali i dati sono stati comunicati o diffusi, eccettuato il caso in cui tale adempimento si rivela impossibile o comporta un impiego di mezzi manifestamente sproporzionato rispetto al diritto tutelato.
4. L'interessato ha diritto di opporsi in tutto o in parte:
 - a. Per motivi legittimi al trattamento dei dati personali che lo riguardano, ancorché pertinenti allo scopo della raccolta.
 - b. Al trattamento di dati personali che lo riguardano a fini di invio di materiale pubblicitario o di vendita diretta o per il compimento di ricerche di mercato o di comunicazione commerciale.