

ESPOSIZIONE AD INQUINANTI INDUSTRIALI E BIOMARCATORI DI DANNO CELLULARE PRECOCE NEI BAMBINI RESIDENTI NEL DISTRETTO DI VIADANA

Indagine epidemiologica “Viadana II”

Relazione ufficiale del 02/04/2012



Servizio Epidemiologico
Azienda Sanitaria Locale
Mantova

Sezione di Epidemiologia
e Statistica Medica
Dipartimento di Sanità
Pubblica e Medicina di
Comunità (DSPMC)
Università di Verona

Cattedra di Tossicologia
Sezione di Farmacologia
Dipartimento di Sanità
Pubblica e Medicina di
Comunità (DSPMC)
Università di Verona

Indice

1. Introduzione	3
2. Metodi	5
2.1. Selezione del campione per lo studio del danno genotossico	5
2.2. Il questionario.....	6
2.3. Misura del danno genotossico	6
2.4. Outcomes.....	7
2.5. Georeferenziazione degli indirizzi riportati nel questionario.....	8
2.6. Misura dell'esposizione.....	8
2.7. Analisi statistica	9
2.8. Analisi di sensibilità.....	10
3. Risultati	12
3.1. Tassi di partecipazione all'indagine	12
3.2. Caratteristiche socio-demografiche e fattori di confondimento	12
3.3. Distribuzione delle concentrazioni stimate di formaldeide e NO ₂	12
3.4. Associazione tra esposizione a formaldeide e intensità del danno genotossico	12
3.5. Associazione tra esposizione a NO ₂ e intensità del danno genotossico.....	13
3.6. Analisi di sensibilità.....	13
4. Presentazione e discussione dei risultati	14
5. Riferimenti bibliografici.....	18
6. Tabelle e Figure	21

1. Introduzione

Il distretto socio-sanitario di Viadana, in provincia di Mantova, ospita il più grande polo industriale italiano per la produzione del pannello truciolare. Le due principali aziende del comparto, situate nei comuni di Viadana e Pomponesco, sono dotate di impianti chimici per la produzione delle colle, come le resine urea-formaldeide, che sono utilizzate nel processo produttivo. Entrambe le aziende sono dotate di impianti in cui gli scarti di legno trattato vengono inceneriti per produrre energia. Nel distretto si trovano inoltre altre 22 fabbriche che trattano il legno (segherie, aziende che producono *pallets*, compensato, etc.).

Nell'indagine epidemiologica di Viadana [rif. web 1], condotta dalla Sezione di Epidemiologia e Statistica Medica, Dipartimento di Sanità Pubblica e Medicina di Comunità (DSPMC), Università di Verona, e dal Servizio Epidemiologico dell'Azienda Sanitaria Locale (ASL) di Mantova, è emerso che i bambini/ragazzi che vivono vicini alle aziende produttrici di pannelli truciolari mostrano eccessi di sintomi e di ricoveri per patologie dell'apparato respiratorio consistenti e significativamente superiori ai bambini che abitano più lontani [1-3, rif. web 2].

I rischi sanitari riscontrati potrebbero essere espressione di un processo infiammatorio, più o meno transitorio, associato a una maggior presenza di inquinanti aerei. Infatti, le aziende per la lavorazione del legno, in particolare quelle addette alla produzione di pannelli truciolari, emettono una varietà d'inquinanti aerei, tra i quali formaldeide e polveri di legno, prodotti direttamente nel ciclo produttivo, nonché NO₂, CO, SO₂ e altri inquinanti minori (metalli pesanti, organo-clorurati, ecc.), liberati dagli impianti che producono energia mediante l'incenerimento dei rifiuti di legno. Tali inquinanti, pur nel rispetto dei limiti di legge, sono emessi in atmosfera in quantità complessivamente non trascurabili. La contestuale presenza di numerosi agenti chimici può inoltre attivare complessi sinergismi in grado di produrre effetti biologici anche a basse dosi (cioè in concentrazioni che, considerando i singoli inquinanti, avrebbero una scarsa valenza tossicologica), soprattutto in presenza di esposizioni continuative e prolungate [4].

L'obiettivo principale della 2° indagine epidemiologica di Viadana ("Viadana 2") è stato valutare l'esistenza o meno di un effetto biologico indotto dall'esposizione agli inquinanti industriali nella popolazione pediatrica del distretto. A tal fine:

- 1) nel corso del 2010 (nei periodi giugno/luglio e novembre/dicembre), in collaborazione con ARPA Lombardia, sono state condotte campagne *ad hoc* per monitorare la concentrazione di alcuni inquinanti atmosferici associati al ciclo produttivo delle fabbriche (NO₂ e

formaldeide) in tutto il distretto di Viadana, e poter così assegnare ad ogni soggetto studiato una stima dell'esposizione media annuale agli inquinanti *outdoor*,

- 2) è stato effettuato un prelievo di cellule della mucosa buccale su un campione randomizzato e statisticamente rappresentativo di bambini che avevano preso parte alla prima indagine. Tale campione biologico è stato sottoposto al *comet assay* [5] e al test dei micronuclei [6], per valutare la frequenza e l'intensità delle alterazioni cellulari (danno genotossico);
- 3) i dati raccolti sono stati analizzati per valutare se i bambini esposti a più alti livelli di inquinanti atmosferici presentassero un danno genotossico maggiore.

2. Metodi

2.1. Selezione del campione per lo studio del danno genotossico

L'indagine sul danno genotossico si è svolta su un campione selezionato dalla coorte di bambini/ragazzi (n=3854) che avevano preso parte nel dicembre 2006 allo studio di Viadana [1]. Il campione è stato selezionato:

- escludendo i bambini/ragazzi che, al dicembre 2010, avevano 12 anni o più (n=2144), in modo da rendere minimo il rischio di confondimento dovuto al fumo attivo di sigaretta e al consumo di alcool;
- escludendo i bambini/ragazzi per i quali il questionario del 2006 era stato compilato dai genitori in inglese o francese (n=44). Dato il modesto numero di questionari in lingua diversa dall'italiano raccolti nello studio di Viadana del 2006, questa scelta ha avuto lo scopo di accelerare i tempi dell'indagine e rendere più omogenei i gruppi di confronto.

Poiché, al momento della pianificazione dello studio, non si disponeva di dati sulle concentrazioni degli inquinanti atmosferici sufficientemente rappresentativi del territorio, la coorte originaria è stata stratificata sulla base della distanza della "abitazione principale" (indirizzo, riportato nel questionario compilato nel 2006, nel quale il bambino/ragazzo trascorrevva la maggior parte del tempo) dalle fabbriche del legno. Pertanto, i 1633 soggetti eleggibili per lo studio sono stati divisi in 3 strati, definiti in funzione della distanza dell'abitazione principale dalle industrie del legno, nel seguente modo:

- 1) distanza dell'abitazione superiore o uguale a 4 km da qualsiasi fabbrica del legno del distretto industriale (n=413, I strato);
- 2) distanza dell'abitazione inferiore a 4 km dalle 22 fabbriche del legno di minori dimensioni, ma superiore a 2 km dalle aziende di produzione del pannello truciolare (n=758, II strato);
- 3) distanza dell'abitazione inferiore a 2 km dalle aziende di produzione del pannello truciolare (n=462, III strato).

Da ciascuno strato è stato estratto un campione casuale di 250 soggetti. In fase di invio postale degli inviti a partecipare all'indagine sono stati esclusi i bambini/ragazzi che, al dicembre 2010, avevano cambiato la loro residenza anagrafica (n=94), in modo da avere un campione di bambini (n=656) il cui livello di esposizione agli inquinanti fosse rimasto il più possibile costante nel tempo. Per massimizzare il tasso di partecipazione, sono state previste 3 ondate postali di invito. Ad ogni partecipante è stato somministrato un questionario, da compilare a cura dei genitori, ed è stato

prelevato un campione di cellule dalla mucosa buccale per la valutazione di un possibile danno genotossico.

2.2. Il questionario

Il questionario utilizzato è una versione ridotta del questionario somministrato al baseline. Esso contiene le stesse domande sui disturbi respiratori e irritativi e sulle patologie potenzialmente associabili agli inquinanti maggiormente prodotti dalle industrie del territorio (formaldeide e polveri di legno) e chiede al compilatore di riportare l'indirizzo dell'abitazione principale. La maggior parte delle domande utilizzate provengono da questionari standardizzati validati in indagini internazionali (questionari ISAAC, ECRHS, SIDRIA, MM040NA e MM080 [7-11]). Rispetto alla versione somministrata al baseline, sono state aggiunte alcune domande specifiche per valutare i fattori di confondimento potenzialmente associati al livello di danno genotossico nelle cellule della mucosa della bocca (presenza di apparecchio ortodontico, salute dentale, consumo di gomma da masticare).

Il questionario utilizzato al baseline e quello di follow-up sono disponibili *online* sul sito dell'indagine di Viadana [rif. web 1].

2.3. Misura del danno genotossico

Un campione di cellule della mucosa buccale di ciascun partecipante è stato analizzato per la misura del danno genotossico (comet assay e test dei micronuclei). Il prelievo cellulare è stato effettuato mediante l'utilizzo di un apposito kit (spazzolino citologico, abbassalingua e provetta contenente 5 mL di terreno di mantenimento sterile). Il prelievo è stato eseguito spazzolando delicatamente la parte interna della guancia destra e sinistra con uno spazzolino citologico, dopo aver sciacquato ripetutamente la bocca con acqua e aver passato delicatamente l'abbassa lingua sull'interno della guancia per rimuovere lo strato superficiale di cellule non vitali.

Per i bambini che hanno preso parte all'indagine rispondendo già al primo invito postale, avvenuto nel periodo Giugno-Luglio 2010, la raccolta delle cellule è stata eseguita direttamente dai genitori. Nella seconda (Novembre-Dicembre 2010) e nella terza ondata (Giugno-Luglio 2011) di inviti, la raccolta è stata effettuata rispettivamente con l'assistenza del personale delle farmacie e da personale dell'ASL. Ad ogni ondata si è provveduto a invitare nuovamente i soggetti per i quali, nelle ondate precedenti, la qualità del prelievo cellulare era risultata inadeguata ai fini dell'esecuzione dei test.

Per l'esecuzione del *comet assay* [5, 12], le cellule epiteliali prelevate dal cavo orale sono isolate mediante lavaggi e analizzate per stabilire la concentrazione e la vitalità cellulare. Una sospensione di circa 100.000 cellule in gel di agarosio viene stratificata su vetrino; il preparato cellulare viene lisato e sottoposto ad una corsa elettroforetica *submarine*. Successivamente, i vetrini vengono colorati con etidio bromuro (colorante specifico per il DNA) e osservati al microscopio in fluorescenza, collegato ad un sistema computerizzato per l'analisi delle immagini. Le immagini risultanti hanno il caratteristico aspetto di "comete". La lunghezza della coda della cometa è proporzionale all'entità del danno del DNA. Durante l'elettroforesi, infatti, i frammenti a basso peso molecolare migrano più facilmente rispetto a quelli che presentano un grosso ingombro, per cui maggiore è il numero dei piccoli frammenti più lunga sarà la coda della cometa. Una cellula non danneggiata appare invece come un nucleo fluorescente, privo di coda. Per ogni partecipante sono state esaminate 50 cellule vitali (non apoptotiche o necrotiche) scelte casualmente. Il numero di cellule esaminate, nel caso inferiore a 50, è stato registrato.

Il "test dei micronuclei" [6] valuta la presenza di formazioni extra-nucleari che si producono in presenza di agenti mutageni. Il test è condotto su una sospensione cellulare, previa centrifugazione e lavaggio con una soluzione tampone specifica per inibire le DNasi endogene e facilitare la rimozione dei batteri, la cui presenza può rendere difficoltosa la lettura. La sospensione cellulare viene quindi strisciata direttamente sulla superficie del vetrino portaoggetti. Il preparato, fissato in metanolo freddo (80%) per 30 min, è lasciato asciugare a temperatura ambiente per una notte ed eventualmente stoccato a -20°C fino al momento dell'analisi. Per la lettura, il vetrino viene colorato con 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI). Per ogni partecipante sono state analizzate al microscopio a fluorescenza (Leica DM750) 2000 cellule, ed è stata valutata la presenza di micronuclei, cellule binucleate e gemmazioni nucleari secondo i criteri riportati da Tolbert et al. [6].

2.4. Outcomes

Con il *comet assay* sono stati misurati i seguenti outcomes:

- l'intensità di fluorescenza della coda, ovvero la percentuale di DNA nella coda (*Tail Intensity*, TI);
- la lunghezza della coda (μm), misurata dal centro della testa della cometa (*Tail Length*, TL);
- il momento della coda (*Tail Moment*, TM), definito come il prodotto integrato di TI e TL [13].

Il "test dei micronuclei" misura la percentuale di cellule con:

- micronuclei (MN), ovvero piccoli nuclei accessori presenti nel citoplasma aventi una superficie non superiore ad un terzo del nucleo principale;
- cellule binucleate (BN), ovvero cellule con due nuclei di dimensioni simili, nel citoplasma;
- gemmazioni nucleari (“*buds*”), ovvero cellule che presentano frammenti globulari di DNA vincolati al nucleo principale tramite un ponte sottile.

2.5. Georeferenziazione degli indirizzi riportati nel questionario

Al fine di ottenere una stima di esposizione agli inquinanti outdoor nella zona di residenza, si sono ottenute le coordinate geografiche (x, y) corrispondenti all’indirizzo della abitazione principale di ogni bambino. Per i bambini che non avevano cambiato abitazione principale nel tempo intercorso tra la prima e la seconda indagine sono state utilizzate le coordinate corrispondenti all’indirizzo originario, già georeferenziato nel primo studio [1]. Tre bambini non hanno riportato l’indirizzo sul questionario di follow-up e sono stati esclusi dalle analisi.

Per 56 bambini, l’indirizzo dell’ “abitazione principale” riportato nel questionario di follow-up era diverso da quello indicato al baseline, nonostante l’anagrafica comunale non riportasse la variazione della residenza anagrafica tra il 2006 (1° indagine) e il 2010 (2° indagine). Gli indirizzi di questi 56 soggetti sono stati normalizzati e georeferenziati utilizzando il database cartografico TeleAtlas di GoogleMaps™. Le coordinate geografiche ottenute (longitudine e latitudine nel sistema di coordinate geografiche WGS1984) sono state poi convertite in coordinate piane (sistema di coordinate geografiche Monte Mario International 1924, proiezione di Gauss Boaga Ovest) mediante il software ArcGIS.

2.6. Misura dell’esposizione

Campagne di misura

Per quantificare l’esposizione a NO₂ e formaldeide dei partecipanti si sono svolte, nell’anno 2010, campagne di monitoraggio *ad hoc*. Sono state condotte quattro campagne, mediante campionatori passivi a diffusione radiale di tipo Radiello®, della durata di una settimana ciascuna. Le prime due campagne sono state effettuate in primavera-estate (3-10 giugno e 29 giugno-6 luglio), mentre le restanti due campagne sono state effettuate in autunno-inverno (11-18 novembre e 16-23 dicembre).

Collocazione dei campionatori passivi

Per il monitoraggio sono stati selezionati 62 siti. I campionatori passivi sono stati collocati utilizzando un algoritmo PAM (Partitioning Around Mediod) in funzione sia della densità nel

territorio della popolazione studiata (i bambini/ragazzi che avevano preso parte alla 1° indagine), sia del livello d'inquinamento atteso (la distanza dalle fabbriche). Nel dettaglio, la metà dei siti è stata selezionata all'interno di un raggio di 3,2 km intorno alle industrie del pannello truciolare (zona sud del distretto), dove risiede la maggior parte dei bambini e dove era atteso un livello maggiore di inquinamento atmosferico. L'altra metà dei siti sono stati selezionati nel resto del territorio del distretto. La distribuzione spaziale delle fabbriche e dei siti di monitoraggio selezionati è riportata in Figura 1.

L'algoritmo PAM ha permesso di suddividere i bambini in 62 gruppi (cluster) di uguale numerosità (31 cluster in ciascuna delle due zone) e di selezionare la "posizione ottimale" per il campionatore passivo per ciascun cluster. L'algoritmo procede in maniera iterativa in questo modo:

- step 1: divide tutti i bambini in cluster di uguale numerosità;
- step 2: per ogni gruppo individua un "medoide", ovvero il punto a distanza minima da tutti gli altri punti del cluster;
- step 3: ripete i due step precedenti fino a che la distanza tra i diversi gruppi (medoidi) risulta massima.

Inoltre, in 8 dei 62 siti selezionati, sono stati collocati da 2 a 5 campionatori passivi replicati per poter stimare la precisione delle concentrazioni di inquinanti misurate.

Calcolo della concentrazione media annuale e stima dell'esposizione mediante "Kriging"

Per ogni sito, la concentrazione media annuale degli inquinanti monitorati è stata stimata come media ponderata delle concentrazioni rilevate nelle quattro campagne. I pesi sono stati calcolati come l'inverso della varianza entro sito, che è stata stimata tramite ANOVA per misure ripetute sui campioni replicati in ciascuna delle quattro campagne di monitoraggio.

La concentrazione media annuale degli inquinanti per ciascun punto del distretto sanitario è stata poi stimata utilizzando l'interpolazione basata sull' "*ordinary Kriging*". Il miglior modello di Kriging è stato scelto riducendo al minimo lo scarto quadratico medio (Root Mean Square Error, RMSE) tramite processo di validazione "*Leave-one-out*" [14]. Ad ogni bambino è stato quindi attribuito il valore di concentrazione di formaldeide e di NO₂ relativo all'indirizzo dell'abitazione.

2.7. Analisi statistica

I dati sono stati presentati con opportune statistiche descrittive in funzione del tipo di variabile analizzata: media e deviazione standard (DS) per variabili quantitative, numerosità e percentuali per variabili categoriche. I confronti tra gruppi sono stati effettuati mediante ANOVA e test Chi quadrato, rispettivamente.

Per gli outcomes che avevano una distribuzione normale (TI, TL, TM e BN), l'associazione tra il livello di inquinamento stimato (+ 1 DS di NO₂ o formaldeide) e il danno genotossico è stata valutata mediante modelli di regressione lineare ed è stato riportato il coefficiente di regressione lineare, che rappresenta l'aumento assoluto dell'outcome per ogni DS di incremento della concentrazione degli inquinanti. Per gli outcome con una distribuzione asimmetrica (MN e *buds*), l'associazione tra esposizione e danno genotossico è stata valutata mediante modelli di regressione binomiale negativa ed è stato riportato l'Incidence Rate Ratio, che rappresenta l'incremento relativo dell'outcome per ogni DS di incremento della concentrazione degli inquinanti.

I fattori di confondimento considerati [15, 16] sono stati:

- età;
- sesso;
- nazionalità (straniera se entrambi i genitori sono stranieri);
- fumo passivo (esposto se almeno un genitore è fumatore *oppure* in presenza di persone che fumano all'interno dell'abitazione);
- livello di traffico (elevato se è riportato un passaggio frequente o costante di camion e/o auto davanti all'abitazione);
- presenza di apparecchio ortodontico;
- score di igiene dentale DMFT ("Decayed, Missing, Filled Teeth") [17, 18];
- abitudine al consumo di gomma da masticare;
- modalità di prelievo del campione cellulare ("genitori", "genitori, assistito dai farmacisti", "personale ASL").

Le analisi degli outcomes ottenuti con il *comet* assay sono state pesate per il numero di cellule analizzate, che rappresenta una misura quantitativa di affidabilità delle misurazioni.

2.8. Analisi di sensibilità

Sono state inoltre effettuate le seguenti analisi di sensibilità:

- 1) tutti gli outcomes sono stati dicotomizzati (valori \geq al 3° quartile = valori "alti" vs. valori $<$ al 3° quartile = valori "bassi") e l'associazione tra esposizione e outcomes è stata stimata mediante modelli di regressione logistica;
- 2) l'analisi principale è stata ripetuta escludendo i bambini che avevano cambiato indirizzo dell'abitazione principale nel tempo intercorso tra le due indagini (n=56);
- 3) per valutare se l'associazione tra concentrazioni degli inquinanti (NO₂ e formaldeide) e outcomes fosse diversa nei tre strati di campionamento, opportuni termini di interazione

sono stati inclusi nei modelli di regressione quantitativa e testati mediante *likelihood ratio test*.

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando i software STATA 12.0 e R 2.14.

3. Risultati

3.1. Tassi di partecipazione all'indagine

Nei tre strati di campionamento, il tasso di risposta al questionario e il tasso di esecuzione del test dei micronuclei sono stati compresi tra il 60 e il 66% (Tabella 1). Il *comet assay* è stato effettuato su una percentuale di soggetti inferiore, compresa tra il 46 (III strato) e il 60% (I strato). La discrepanza tra le percentuali di esecuzione dei due saggi di genotossicità sono state per lo più dovute alle maggiori difficoltà tecniche insite nell'esecuzione del *comet assay* rispetto al test dei micronuclei.

3.2. Caratteristiche socio-demografiche e fattori di confondimento

Il campione analizzato nello studio è costituito da tutti i bambini che hanno compilato il questionario di follow-up ed eseguito almeno uno dei due test di genotossicità (n=413). Di questi bambini, il 44.1% erano femmine e l'età media era di 9.4 (DS 1.6) anni.

I bambini che vivevano in prossimità delle aziende del pannello truciolare (strato III) sono risultati maggiormente esposti al traffico rispetto ai bambini che vivevano più lontani (strati I e II) (p=0.067) (Tabella 2).

3.3. Distribuzione delle concentrazioni stimate di formaldeide e NO₂

Le Figure 2 e 3 riportano le concentrazioni di formaldeide e NO₂ stimate nel territorio del distretto di Viadana. La concentrazione di formaldeide è risultata maggiore nella zona a sud del distretto, in particolare in prossimità dell'azienda del pannello truciolare collocata nel comune di Viadana (sud-ovest). Le concentrazioni di NO₂, invece, sembrano essere meno correlate alla posizione delle fabbriche del legno. Si notano infatti zone ad alta concentrazione di NO₂ sia in prossimità delle aziende del truciolare che in aree in cui non sono presenti fabbriche del comparto del legno, per lo più in prossimità di strade o incroci stradali.

I bambini residenti in prossimità delle fabbriche del pannello truciolare (strato I) sono risultati esposti a concentrazioni di inquinanti significativamente superiori ai bambini che vivono più lontano (Tabella 3), in particolare di formaldeide (Figura 4).

3.4. Associazione tra esposizione a formaldeide e intensità del danno genotossico

All'aumentare della concentrazione di formaldeide (Figura 5) si nota un aumento dell'intensità della coda della cometa (TI) e della frequenza di cellule binucleate (BN) e di gemmazioni nucleari (*buds*). Dopo aver corretto per i potenziali confondenti, l'aumento di una DS nella concentrazione

di formaldeide ($+0.16 \mu\text{g}/\text{m}^3$) era associato in modo statisticamente significativo a un incremento di 0.1% del DNA nella coda della cometa (TI: coefficiente di regressione 0.10, IC 95%: 0.05-0.20) e a un aumento del 12% (IRR: 1.12, IC 95%: 1.02-1.22) nella frequenza di gemmazioni nucleari (buds).

3.5. Associazione tra esposizione a NO₂ e intensità del danno genotossico

All'aumentare della concentrazione di NO₂ (Figura 6) si nota un aumento dell'intensità della coda della cometa e della frequenza di cellule binucleate e gemmazioni nucleari. L'analisi corretta per i potenziali confondenti (Tabella 4) evidenzia che l'aumento di una DS della concentrazione di NO₂ ($+1.50 \mu\text{g}/\text{m}^3$) è associato a un incremento di 0.12% della frequenza di cellule binucleate (BN, coefficiente di regressione 0.12, IC 95% 0.06-0.18) e a un aumento del 13% (IRR: 1.13, IC 95%: 1.03-1.23) delle gemmazioni nucleari (buds).

3.6. Analisi di sensibilità

Sia l'analisi di regressione logistica (Tabella 5) che l'esclusione dalle analisi dei soggetti che si sono trasferiti nel periodo tra le due indagini hanno confermato i risultati ottenuti con i modelli di regressione quantitativa (dati non riportati).

Non sono state osservate interazioni statisticamente significative tra concentrazioni di formaldeide o NO₂ e strato di campionamento (dati non riportati).

4. Presentazione e discussione dei risultati

L'obiettivo principale della 2° indagine epidemiologica di Viadana è stato valutare l'esistenza o meno di un effetto biologico indotto dall'esposizione agli inquinanti industriali nella popolazione pediatrica del distretto socio-sanitario di Viadana, che costituisce il più grande polo industriale italiano per la produzione del pannello truciolare. Studi di epidemiologia occupazionale hanno evidenziato che i lavoratori dell'industria del legno (addetti di mobilifici, falegnami) hanno un livello di danno genotossico, misurato nel DNA dei linfociti, maggiore rispetto a gruppi di controllo [19-21]. Tuttavia, non ci sono studi di popolazione che valutino l'associazione tra inquinamento *outdoor* e danno genotossico in aree industriali del comparto del legno.

I due agenti chimici scelti come traccianti delle attività antropiche inquinanti sono stati la formaldeide e l'NO₂. La formaldeide è stata scelta come tracciante specifico dell'inquinamento prodotto dalle aziende del pannello truciolare, che sono dotate di impianti per la produzione della colla urea-formaldeide impiegata nel processo di produzione del pannello. L'emissione di formaldeide da parte del traffico veicolare può essere considerata invece più modesta. L'NO₂ è prodotto dalle combustioni ad alta temperatura, e può quindi essere emesso sia dagli impianti di incenerimento degli scarti di legno di cui le aziende del truciolare sono dotate, sia dal traffico veicolare e dagli impianti di riscaldamento. È quindi un agente inquinante meno specifico per le attività industriali del comparto oggetto di indagine.

I livelli di formaldeide e NO₂ sono stati monitorati nel territorio mediante campagne *ad hoc*, condotte con una rete di campionatori passivi, sia nella stagione calda che in quella fredda. La scelta dei siti di monitoraggio è stata effettuata tramite una procedura che ha permesso di tener conto sia della distribuzione della popolazione *target*, sia dei livelli di inquinamento attesi sul territorio. I livelli di inquinamento misurati presso i siti di monitoraggio sono stati poi utilizzati per stimare le concentrazioni *outdoor* in corrispondenza delle abitazioni dei bambini, mediante tecniche di interpolazione spaziale basate sul Kriging.

La presenza di danni indotti al DNA in cellule della mucosa buccale è stata valutata mediante due test di genotossicità, il *comet assay* e il test dei micronuclei. Le cellule della mucosa buccale sono cellule di sfaldamento e per loro caratteristica presentano rapidi processi di riparazione ed eliminazione. Generalmente, i danni al DNA vengono correttamente riparati da efficienti sistemi riparativi, tuttavia, l'efficienza riparativa può essere compromessa da diversi fattori come una ridotta capacità nel riconoscere il danno o per una deficienza degli enzimi riparativi. Il *comet assay*

valuta il danno al DNA mediante tre parametri: l'intensità di fluorescenza (TI), la lunghezza (TL) e il momento (TM) della coda della cometa. Il valore che questi parametri assumono dipende dalle dimensioni dei frammenti di DNA e quindi dall'entità del danno. Il *comet assay* evidenzia danni al DNA di entità anche modesta. La mancata o non adeguata riparazione di questi danni può portare a danni maggiori, quali mutazioni fisse, evidenziabili con test citogenetici come il test dei micronuclei. I micronuclei (MN) sono piccoli nuclei accessori che si trovano nel citoplasma delle cellule che hanno subito un danno cromosomico sia spontaneo che indotto. Questo test rileva altri eventi cellulari, come difetti nella divisione cellulare, tra cui le cellule binucleate (BN), e le cellule con una gemmazione nucleare proveniente dal nucleo principale ("bud").

I risultati dell'indagine hanno evidenziato che:

- per entrambi gli inquinanti monitorati, ma in particolare per la formaldeide, le stime di esposizione sono state significativamente maggiori per i bambini che vivevano nelle vicinanze delle aziende del pannello truciolare rispetto a quelli che vivevano più lontano;
- nei campioni cellulari dei bambini esposti a più alte concentrazioni di formaldeide si è riscontrata mediamente una maggiore intensità di fluorescenza nella coda della "cometa" (TI) e una maggiore frequenza di cellule con gemmazioni nucleari (*buds*);
- nei campioni cellulari dei bambini esposti a più alte concentrazioni di NO₂ si sono osservate con maggiore frequenza cellule binucleate (BN) o con gemmazioni nucleari.

In particolare, nel *comet assay*, l'esposizione a formaldeide è risultata associata ad un aumento dell'intensità della coda accompagnato dalla corrispondente riduzione, anche se non statisticamente significativa, della lunghezza della stessa (TL). Questo dato indica la presenza di grossi frammenti di DNA nella coda che, producendo un importante ingombro sterico, ne limitano la migrazione nel campo elettroforetico. La presenza di questi grossi danni è confermata dall'aumento della frequenza di gemmazioni nucleari, osservata con il test dei micronuclei, in funzione di concentrazioni crescenti di formaldeide. L'associazione tra esposizione a formaldeide e danno genotossico era stata precedentemente osservata *in vitro* su colture cellulari [22, 23]. Inoltre, l'esposizione occupazionale a basse concentrazioni di formaldeide è stata associata a valori maggiori di intensità della coda nei linfociti [24].

Le concentrazioni ambientali di NO₂ sono risultate significativamente associate alla presenza di cellule binucleate o con gemmazioni nucleari. Altri studi hanno valutato la relazione tra NO₂ e danno genotossico, mostrando risultati contrastanti. Infatti, mentre in alcuni studi di popolazione

[25-27] non è stata riscontrata un'associazione, uno studio più recente su cellule in vitro [28] ha trovato un'associazione significativa della concentrazione di NO₂ con la lunghezza della coda, ma non con la frequenza di cellule binucleate o di micronuclei.

Nell'analisi dell'associazione tra livelli degli inquinanti e danno genotossico si è tenuto conto dei principali fattori di confondimento. In particolare, oltre ai fattori socio-demografici e alle esposizioni concomitanti più probabili nella fascia d'età considerata (fumo passivo, traffico veicolare) si sono considerati quei fattori legati all'igiene orale che sono noti influenzare sia la velocità di sfaldamento e di turnover delle cellule della mucosa buccale, sia l'insulto genotossico cui queste cellule sono soggette (consumo di gomma da masticare, uso dell'apparecchio ortodontico e score di igiene dentale DMFT). L'effetto di altri confondenti quali il fumo attivo o il consumo di alcol può invece essere escluso, o considerato trascurabile, data la fascia di età indagata.

Come precedentemente accennato, il test dei micronuclei tende a mettere in evidenza danni cellulari non più riparabili, e quindi generalmente più importanti o cronici di quelli evidenziati dal *comet assay*. Nel nostro studio, le concentrazioni di entrambi gli inquinanti sono state associate a danni rilevati al test dei micronuclei, e per l'NO₂ l' "effetto" dell'esposizione sul livello di danno genotossico misurato con il test dei micronuclei è stato anche maggiore di quello osservato con il *comet assay*. Una possibile spiegazione di questa apparente contraddizione risiede probabilmente nel fatto che il *comet assay* è di esecuzione più difficoltosa rispetto al test dei micronuclei, in particolare su cellule della mucosa buccale. L'affidabilità del *comet assay* dipende quindi fortemente dalla qualità del campione cellulare raccolto. Uno spazzolamento e un lavaggio eccessivo del cavo orale possono comportare una raccolta di cellule insufficiente per il *comet assay*. Viceversa, un'igiene orale insufficiente può portare a campioni contenenti cellule non vitali o contaminati. Si deve anche aggiungere che le maggiori difficoltà di esecuzione del *comet assay* hanno anche comportato un minore tasso di esecuzione e quindi una potenza statistica inferiore rispetto al test dei micronuclei.

In conclusione, lo studio di genotossicità ha documentato l'esistenza di un aumento statisticamente significativo del danno genotossico nei bambini esposti a maggiori livelli di formaldeide e NO₂. Lo studio ha evidenziato che i bambini più esposti a formaldeide sono quelli che vivono nelle vicinanze delle aziende del pannello truciolare. Poiché la formaldeide può essere considerata un tracciante specifico dell'attività industriali del comparto, i risultati dello studio suggeriscono che le emissioni delle aziende del pannello truciolare possano essere, almeno in parte, responsabili dell'associazione osservata tra concentrazioni di formaldeide e danno genotossico. Considerati i normali processi biologici di riparazione del DNA danneggiato e di rimozione delle cellule lesionate,

il danno genotossico costituisce un effetto biologico reversibile. Esso è indicativo di un effettivo contatto degli inquinanti con le cellule della mucosa buccale e non necessariamente di una maggiore probabilità di produrre malattia.

5. Riferimenti bibliografici

1. de Marco, R., Marcon, A., Rava, M., Cazzoletti, L., Pironi, V., Silocchi, C., Ricci, P., 2010, Proximity to chipboard industries increases the risk of respiratory and irritation symptoms in children: the Viadana study. *Sci Total Environ*. Jan 1;408(3):511-7.
2. Rava, M., Marcon, A., Girardi, P., Pironi, V., Silocchi, C., Ricci, P., de Marco, R., 2011, Proximity to wood factories and hospitalizations for respiratory diseases in children. *Sci Total Environ* Dec 1;410(411):80-6.
3. Girardi, P., Marcon, A., Rava, M., Pironi, V., Silocchi, C., Ricci, P., de Marco, R., 2011, Spatial analysis of binary health indicators with local smoothing techniques. *Sci Total Environ* 2011. Dec 1;410-411:80-6.
4. Wigle, D.T., Lanphear, B.P., 2005, Human health risks from low-level environmental exposures: no apparent safety thresholds. *PLoS Med*. Dec;2(12):e350.
5. Faccioni, F., Franceschetti, P., Cerpelloni, M., Fracasso, M.E., 2003, In vivo study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. Dec;124(6):687-93.
6. Tolbert, P.E., Shy, C.M., Allen, J.W., 1991, Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. *Am J Epidemiol*. 134, 840-50.
7. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. 1998, Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *Lancet*. Apr 25;351(9111):1225-32.
8. European Community Respiratory Health Survey II Steering Committee. The European Community Respiratory Health Survey II. *Eur Respir J*. 2002 Nov;20(5):1071-9.
9. Simoni, M., Lombardi, E., Berti, G., Rusconi, F., La Grutta, S., Piffer, S., Petronio, M.G., Galassi, C., Forastiere, F., Viegi, G.; SIDRIA-2 Collaborative Group, 2005, Mould/dampness exposure at home is associated with respiratory disorders in Italian children and adolescents: the SIDRIA-2 Study. *Occup Environ Med*. 2005 Sep;62(9):616-22.
10. Andersson, K., 1998, Epidemiological approach to indoor air problems. *Indoor Air: Suppl*. 1998;4:32-39.
11. Engvall, K., Norrby, C., Norback, D., 2001, Sick building syndrome in relation to building dampness in multi-family residential buildings in Stockholm. *Int Arch Occup Environ Health*. May;74(4):270-8.
12. Fracasso, M.E., Doria, D., Cerpelloni, M., Scotton, A., Faccioni, F., 2011, DNA damage kinetics (micronucleus and comet assay) in buccal mucosa cells of subjects after metal fixed

- appliances. doi:10.1016/j.toxlet.2011.05.245. Congress of the European Societies of Toxicology, Paris, 28-31 August 2011.
13. Olive, P.L., Wlodek, D., Durand, R.E., Banath, J.P., 1992, Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp Cell Res.* Feb;198(2):259-67.
 14. Pebesma, E.J., Wesseling, C.G., 1998, Gstat: a program for geostatistical modelling, prediction and simulation. *Computers & Geosciences* Vol. 24, No. 1, pp. 17-31.
 15. Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Geiger, E., Knasmueller, S., Fenech, M., 2008, The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMAN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Res.* 659: 93-108.
 16. Møller, P., Knudsen, L.E., Loft, S., Wallin, H., 2000, The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* October; 9: 1005-1015.
 17. Bratthall, D., 2000, Introducing the Significant Caries Index together with a proposal for a new oral health goal for 12-year-olds, *Int Dent J*; 50: 378-384.
 18. Nishi M., 2002, Caries experience of some countries and areas expressed by the Significant Caries Index. *Community Dent Oral Epidemiol*; 30: 296-301.
 19. Palus, J., Dziubałowska, E., Rydzyński K., 1999, DNA damage detected by the comet assay in the white blood cells of workers in a wooden furniture plant. *Mutat Res.* Jul 21;444(1):61-74.
 20. Palus, J., Dziubałowska, E., Rydzyński, K., 1998, The assessment of DNA damage in lymphocytes of wooden furniture workers. *Acta Biochim Pol.* 45(2):605-10.
 21. Speit, G., Schmid, O., 2006, Local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated epithelial cells. *Mutat Res.* Sep;613(1):1-9.
 22. Da Silva, G.N., De Camargo, E.A., Salvadori, D.M., Ribeiro, D.A., 2007, Genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to antimicrobial endodontic agents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* Aug;104(2):e58-61.
 23. Schmid, K., Sassen, A., Staudenmaier, R., Kroemer, S., Reichl, F.X., Harréus, U., Hagen, R., Kleinsasser, N., 2007, Mercuric dichloride induces DNA damage in human salivary gland tissue cells and lymphocytes. *Arch Toxicol.* Nov;81(11):759-67.
 24. Costa, S., Pina C., Coelho, P., Costa, C., Silva, S., Porto, B., Laffon, B., Teixeira, J.P., 2011, Occupational exposure to formaldehyde: genotoxic risk evaluation by comet assay and micronucleus test using human peripheral lymphocytes. *J Toxicol Environ Health A.* Aug;74(15-16):1040-51.

25. Binková, B., Lewtas, J., Mísková, I., Rössner, P., Cerná, M., Mrácková, G., Peterková, K., Mumford, J., Meyer S., Srám, R., 1996, Biomarker studies in northern Bohemia. *Environ Health Perspect.* May;104 Suppl 3:591-7.
26. Srám, R.J., Podrazilová, K., Dejmek, J., Mracková, G., Pilcík T., 1998, Single cell gel electrophoresis assay: sensitivity of peripheral white blood cells in human population studies. *Mutagenesis.* Jan;13(1):99-103.
27. Valverde, M., del Carmen López, M., López, I., Sánchez, I., Fortoul T.I., Ostrosky-Wegman, P., Rojas E., 1997, DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City. *Environ Mol Mutagen;*30(2):147-52.
28. Koehler, C., Ginzkey, C., Friehs, G., Hackenberg, S., Froelich, K., Scherzed, A., Burghartz, M., Kessler, M., Kleinsasser, N., 2010, Aspects of nitrogen dioxide toxicity in environmental urban concentrations in human nasal epithelium. *Toxicol Appl Pharmacol.* Jun 1;245(2):219-25.

Riferimenti Web

1. Sito Web dello studio di Viadana: <http://biometria.univr.it/viadanastudy>.
2. Report ricoveri 2007-09:
http://www.aslmmn.it/t_dat_epid_rischi.asp?IDLivello1=3&IDLivello2=60&IDLivello3=181.

6. Tabelle e Figure

Tabella 1. Numero (%) di questionari raccolti e di test di genotossicità effettuati per ogni strato di campionamento*.

	Strato di campionamento *			p-value
	Strato I	Strato II	Strato III	
	≥ 4km da tutte le fabbriche (n=205 [§])	< 4km dalle fabbriche minori, 2-4km aziende truciolare (n=236 [§])	< 2km aziende truciolare (n=215 [§])	
Questionari compilati	136 (66.3%)	155 (65.7%)	130 (60.5%)	0.380
Test dei micronuclei effettuati	135 (65.9%)	153 (64.8%)	129 (60.0%)	0.405
Comet assay effettuati	123 (60.0%)	123 (52.1%)	99 (46.1%)	0.016

* funzione della distanza dell'abitazione corrente (questionario 2011) dalla fabbrica del legno più vicina

[§] soggetti eleggibili per l'indagine (totale n=656)

Tabella 2. Distribuzione dei principali fattori socio-demografici e legati all'igiene orale, e modalità di esecuzione del prelievo cellulare, in funzione della distanza dell'abitazione dalle fabbriche del legno.

	Strato di campionamento			p-value
	Strato I ≥ 4km da tutte le fabbriche del legno	Strato II < 4km dalle fabbriche minori, 2-4km aziende truciolare	Strato III < 2km dalle aziende del truciolare	
Sesso (% femmine, n)	42.8 (56)	41.7 (63)	48.0 (60)	0.545
Età (anni) (media, DS)	9.2 (1.7)	9.6 (1.5)	9.5 (2.6)	0.055
Nazionalità straniera (% , n)	1.5 (2)	2.7 (4)	1.6 (2)	0.747
Fumo nell'abitazione (% , n)	7.8 (10)	14.8 (22)	11.2 (14)	0.185
Genitore fumatore (% , n)	25.9 (35)	29.5 (43)	33.3 (44)	0.415
Traffico elevato (% , n)	55.7 (73)	55.7 (83)	68.0 (85)	0.067
Apparecchio dentale (% , n)	19.1 (25)	22.3 (33)	18.6 (23)	0.699
Uso di Gomma da Masticare (% , n)	45.0 (59)	50.3 (75)	50.0 (62)	0.625
Indice DMFT [†] (% > 0, n)	47.3 (62)	43.1 (65)	47.2 (59)	0.416
Modalità prelievo (% , n)				
<i>genitori</i>	22.9 (30)	14.6 (22)	20.0 (25)	
<i>genitori, assist. farmacisti</i>	59.5 (78)	61.6 (93)	59.2 (74)	0.394
<i>personale ASL</i>	17.6 (23)	23.8 (36)	20.8 (26)	

[†] DMFT = Decayed, Missing, Filled Teeth

Tabella 3. Distribuzione delle concentrazioni di formaldeide e NO₂ stimate agli indirizzi dell'abitazione corrente, in funzione dello strato di campionamento. Sono riportate media e DS.

Strato di campionamento				
	Strato I	Strato II	Strato III	
Inquinante	≥ 4km da tutte le fabbriche del legno n=131	< 4km dalle fabbriche minori, 2-4km aziende truciolare n=151	< 2km dalle aziende del truciolare n=125	p-value
formaldeide (µg/m ³)	1.93 (0.14)	1.85 (0.20)	2.13 (0.17)	<0.001
NO ₂ (µg/m ³)	14.12 (1.55)	13.70 (1.75)	15.16 (1.72)	<0.001

Tabella 4. Associazione tra a) esposizione a formaldeide e b) esposizione a NO₂ e livello di danno genotossico (modelli di regressione quantitativa). Analisi corrette per i potenziali confondenti°. Sono riportati i coefficienti di regressione con relativi IC al 95%.

	Comet assay			Test dei micronuclei		
	(n=324)			(n=393)		
	TM	TI	TL	BN	MN	buds
	incremento (IC 95%)*	incremento (IC 95%)*	incremento (IC 95%)*	incremento (IC 95%)*	IRR (IC 95%) [†]	IRR (IC 95%) [†]
a) formaldeide (+ 1 DS[^])	0.00 [-0.00;0.01]	0.10 [0.05;0.20]	-0.07 [-0.30;0.16]	0.03 [-0.04;0.09]	1.01 [0.93; 1.09]	1.12 [1.02; 1.22]
b) NO₂ (+1 DS[^])	0.00 [-0.00;0.01]	0.04 [-0.06;0.14]	-0.02 [-0.25;0.22]	0.12 [0.06;0.18]	1.00 0.93; 1.08]	1.13 [1.03; 1.23]

TM = momento della coda, TI = intensità della coda, TL = lunghezza della coda, BN = cellule binucleate, MN = micronuclei, buds = gemmazioni nucleari

° sesso, età, nazionalità, fumo passivo, traffico, uso dell'apparecchio dentale, uso di gomma da masticare, indice DMFT, modalità di prelievo del campione cellulare

*coefficienti di regressione lineare (per gli outcome TM, TI e TL la regressione è stata pesata per il numero di cellule analizzate)

[†] Incidence Rate Ratio (IRR) ottenuti dalla regressione binomiale negativa

[^] 1 DS pari a 0.16 µg/m³ e 1.50 µg/m³ per formaldeide e NO₂ rispettivamente

Tabella 5. Analisi di sensibilità: associazione tra a) esposizione a formaldeide e b) esposizione a NO₂ e livello di danno genotossico (modelli di regressione qualitativa). Analisi corrette per i potenziali confondenti[°]. Sono riportati OR con relativi IC al 95%[§].

	Comet assay (n=324) OR [IC 95%]			Test dei micronuclei (n=393) OR [IC 95%]		
	TM	TI	TL	BN	MN	buds
a) formaldeide (+ 1 DS[^])	1.15 [0.89; 1.47]	1.26 [0.97;1.62]	0.96 [0.74; 1.26]	1.18 [0.94; 1.49]	0.96 [0.77; 1.19]	1.26 [1.01; 1.58]
b) NO₂ (+1 DS[^])	1.01 [0.78;1.31]	1.11 [0.85;1.45]	0.99 [0.75;1.30]	1.43 [1.14; 1.78]	0.89 [0.72;1.11]	1.42 [1.12; 1.80]

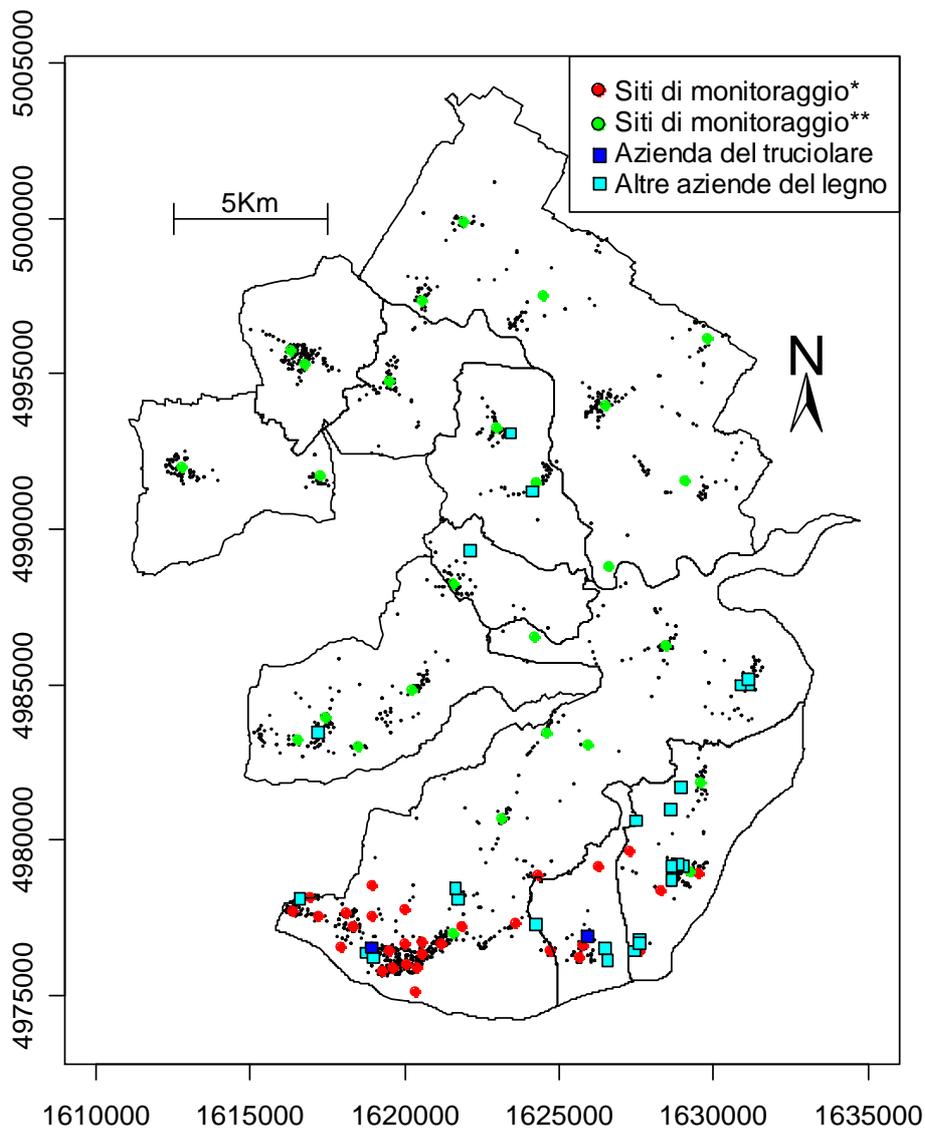
TM = momento della coda, TI = intensità della coda, TL = lunghezza della coda, BN = cellule binucleate, MN = micronuclei, buds = gemmazioni nucleari

[°] sesso, età, nazionalità, fumo passivo, traffico, uso dell'apparecchio dentale, uso di gomma da masticare, indice DMFT, modalità di prelievo del campione cellulare

[§] gli OR rappresentano il rischio di avere un outcome con valore \geq al 3° quartile vs. inferiore per incrementi di 1 DS della concentrazione dell'inquinante.

[^] 1 DS pari a 0.16 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 1.50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ per formaldeide e NO₂ rispettivamente

Figura 1. Rappresentazione schematica del distretto socio-sanitario di Viadana. Le linee continue rappresentano i confini comunali. I puntini indicano le abitazioni dei bambini che hanno partecipato all'indagine di Viadana (n=3854). Sono inoltre riportate le aziende del comparto del legno e i siti di monitoraggio degli inquinanti selezionati.



* siti di monitoraggio selezionati nella zona entro i 3.2 km dalle aziende del pannello truciolare

** siti di monitoraggio selezionati nella zona a ≥ 3.2 km dalle aziende del pannello truciolare

Figura 2. Rappresentazione grafica delle concentrazioni medie annuali di formaldeide stimate nel distretto di Viadana. La gradazione dal bianco al rosso rappresenta valori di concentrazione crescenti. La linea rossa evidenzia le aree in cui la concentrazione della formaldeide era superiore al 90° percentile della distribuzione. La linea grigia tratteggiata rappresenta le strade principali.

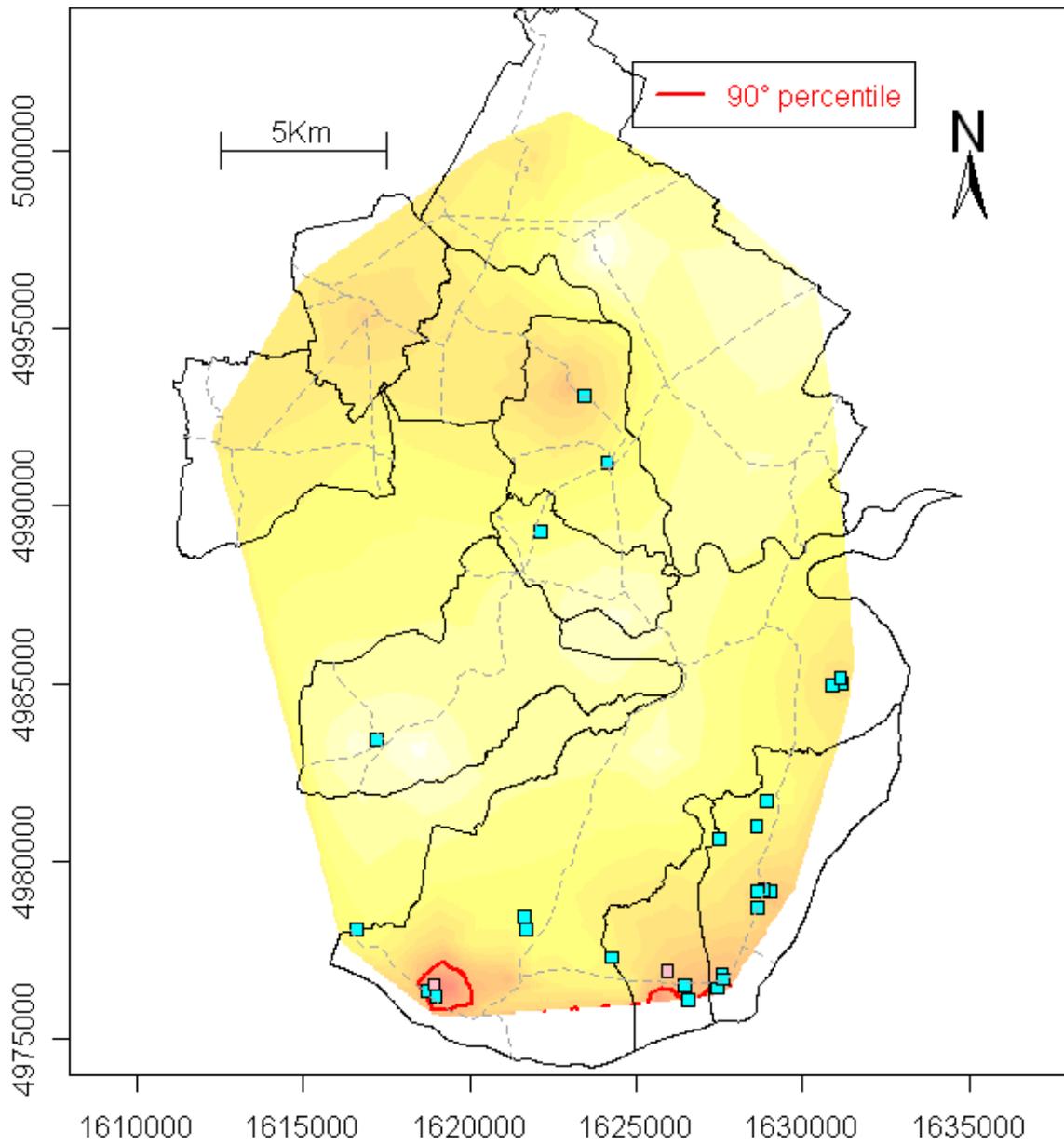


Figura 3. Rappresentazione grafica delle concentrazioni medie annuali di NO₂ stimate nel distretto di Viadana. La gradazione dal bianco al rosso rappresenta valori di concentrazione crescenti. La linea rossa evidenzia le aree in cui la concentrazione di NO₂ era superiore al 90° percentile della distribuzione. La linea grigia tratteggiata rappresenta le strade principali.

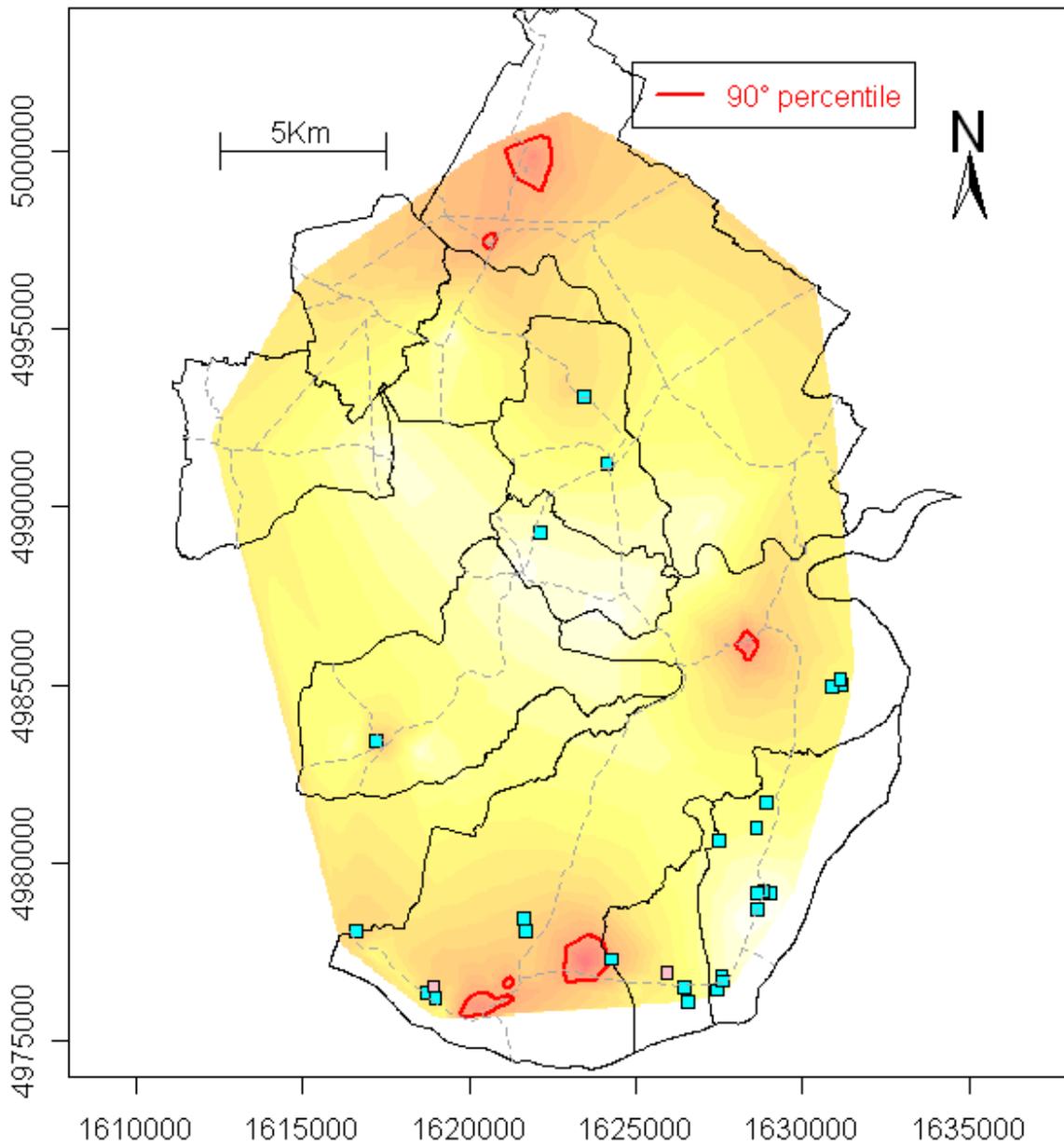


Figura 4. Distribuzione delle concentrazioni di formaldeide e NO₂ stimate all'indirizzo di residenza dei bambini nei tre strati di campionamento. Per ogni strato, la mediana della distribuzione è rappresentata da un cerchio bianco.

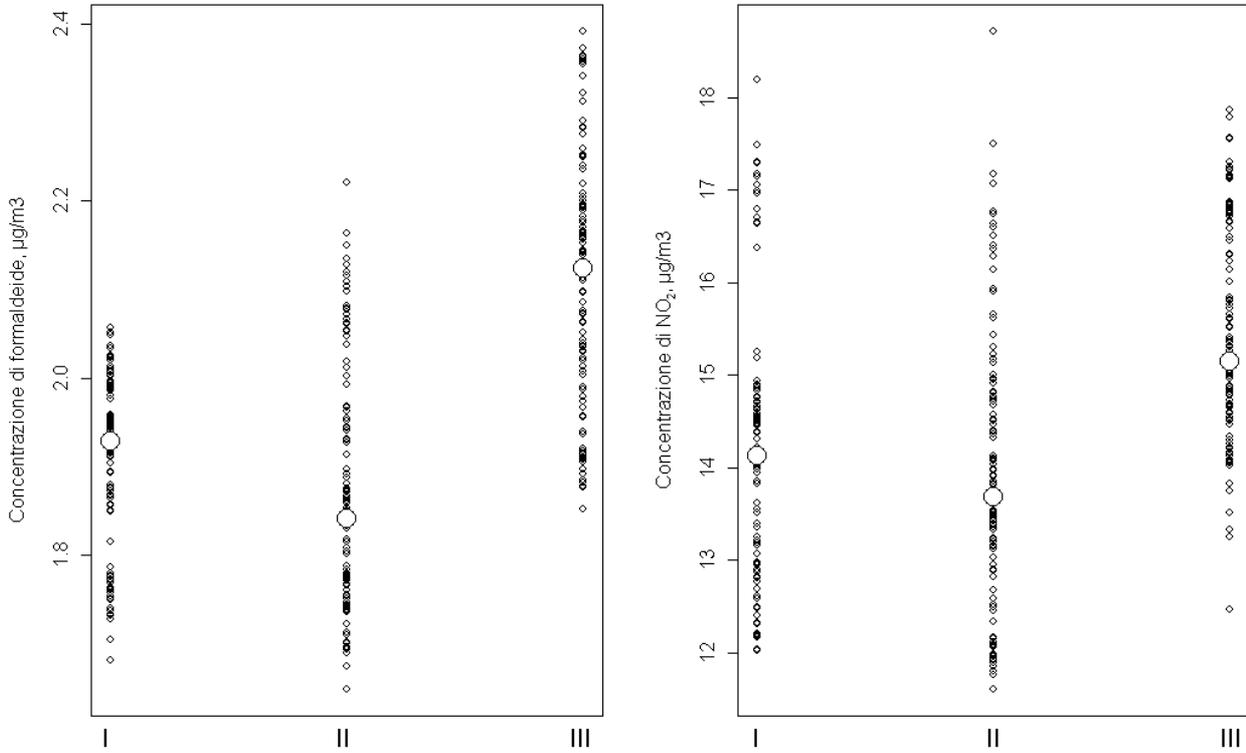


Figure 5. Valori degli outcomes analizzati (asse y) in funzione della concentrazione stimata di formaldeide (asse x) e dello strato di campionamento (verde = I strato, nero = II strato, rosso = III strato); linea di tendenza stimata mediante modello di regressione lineare.

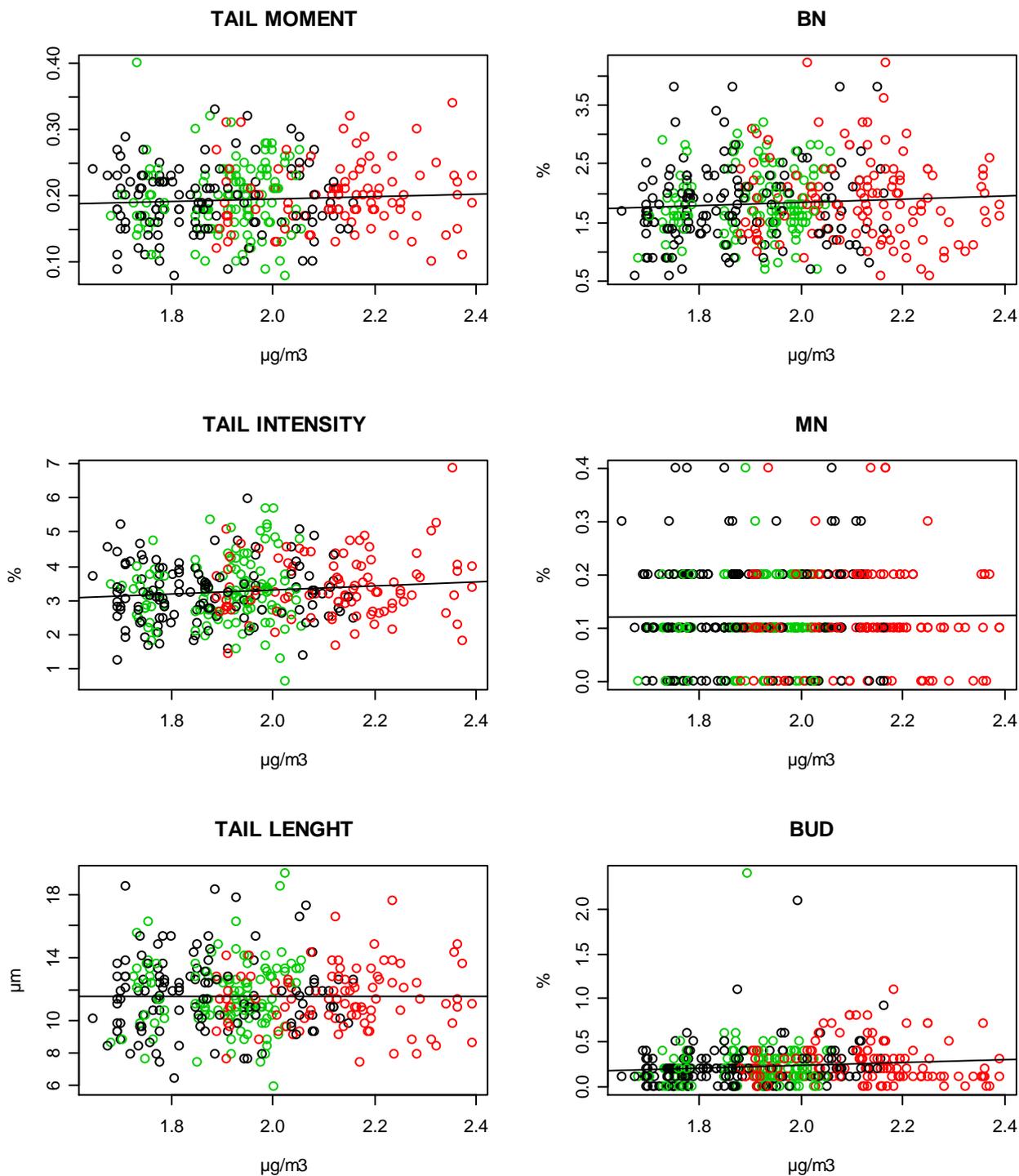
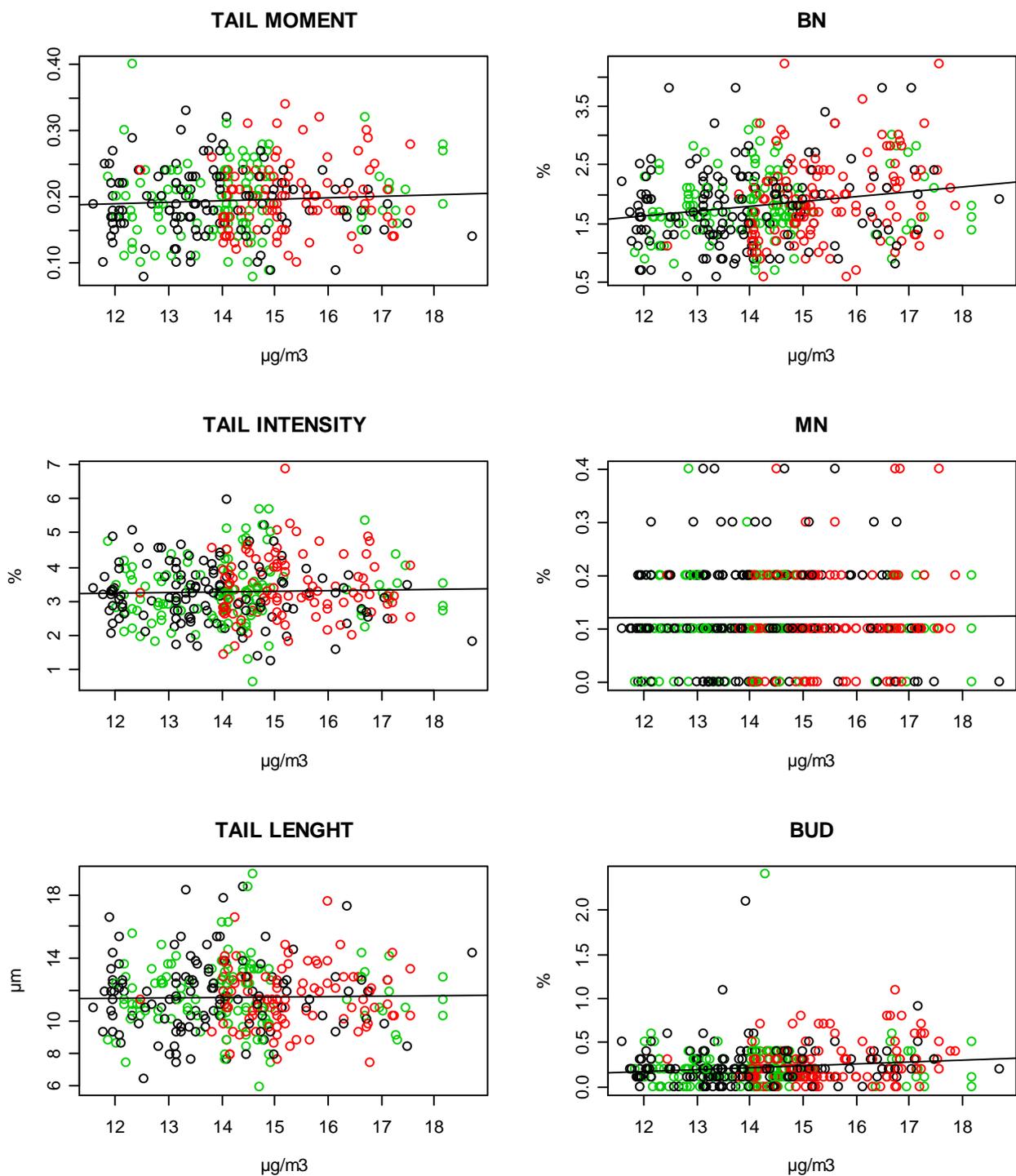


Figure 6. Valori degli outcomes analizzati (asse y) in funzione della concentrazione stimata di NO_2 (asse x) e dello strato di campionamento (verde = I strato, nero = II strato, rosso = III strato); linea di tendenza stimata mediante modello di regressione lineare.



Autori del report e gruppo di lavoro

Il Responsabile scientifico dell'indagine epidemiologica "Viadana II" è il prof. Roberto de Marco.

Il presente documento è stato visto, revisionato e approvato dal Responsabile scientifico dell'indagine e dal Comitato scientifico (in ordine alfabetico): prof.ssa Maria Enrica Fracasso, dott. Alessandro Marcon, dott.ssa Vanda Pironi, dott. Paolo Ricci.

L'analisi statistica e la preparazione del report sono state curate dal dott. Paolo Girardi (Sezione di Epidemiologia e Statistica Medica [SESM], DSPMC, Università di Verona), in collaborazione con (in ordine alfabetico) la dott.ssa Denise Doria (Sezione di Farmacologia e Tossicologia, DSPMC, Università di Verona), la dott.ssa Linda Guarda (Servizio Epidemiologico Asl di Mantova) e il dott. Pierpaolo Marchetti, il dott. Alessandro Marcon e il dott. Giancarlo Pesce (SESM, Università di Verona).

Le campagne di monitoraggio di NO₂ e formaldeide nel distretto socio-sanitario di Viadana sono state condotte da ARPA Lombardia, Dipartimento Provinciale di Mantova. Si ringraziano il Direttore del Dipartimento dott. Fiorenzo Songini, il dott. Giorgio Siliprandi e il dott. Luca Bianchi per la collaborazione.