Progetto NINFEA: protocollo dello studio

TITOLO: "Coorte di nuovi nati basata su internet: progetto NINFEA (Nascita e INFanzia: gli Effetti dell'Ambiente)"

(v del 28 giugno 2024)

1. Contesto

Il periodo fetale e quello perinatale sono stati indicati come finestre temporali importanti in cui diverse esposizioni possono modificare la salute durante l'infanzia, l'adolescenza e la vita adulta. Durante questi periodi vi sono specifiche fonti di esposizione (ad es. l'allattamento), uno sviluppo fisiologico intenso e differenti capacità metaboliche che rendono l'organismo maggiormente suscettibile a determinate esposizioni. Per esempio, diversi studi (1-7) hanno trovato che lo sviluppo fetale e gli stili di vita materni sono associati al rischio di malattie cardiovascolari, diabete, alcuni tumori, ridotta funzione cognitiva, infertilità.

Studi su fattori di rischio precoci sono stati inizialmente condotti nei Paesi scandinavi, grazie alla presenza di registri di maternità di ottimo livello e la possibilità di effettuare *linkage* con altri registri di popolazione. Il limite di tali studi, basati su registri, risiede sia nell'impossibilità

di ottenere informazioni ad hoc su fattori di rischio, sia nella mancanza di campioni biologici. Recentemente, si stanno conducendo o programmando sia in Europa che in Paesi extra europei alcuni studi di coorte (studi di coorte di nascita) in cui i soggetti, con la collaborazione delle madri, sono arruolati al momento della nascita e le informazioni sulle esposizioni sono raccolte già durante la gravidanza (8-9). Ulteriori informazioni sono ottenute in diversi momenti nel corso del tempo. Inoltre, sono raccolti campioni di sangue, sia dalla madre che dai figli (ad es. dal cordone ombelicale al momento della nascita). Infine, i figli sono seguiti fino all'età adulta per la rilevazione degli *outcome* di interesse.

Studi di coorte di nascita di questo tipo permettono di valutare, in maniera prospettica, un gran numero di ipotesi eziologiche. Essi hanno però evidenti difficoltà di organizzazione e costi estremamente elevati. Vi è quindi la necessità di ipotizzare e sperimentare metodiche che semplifichino la realizzazione di studi di coorte di nascita e ne permettano una maggiore diffusione. È nostra opinione che internet sia una di queste metodiche.

2. Obiettivi

Il progetto NINFEA (Nascita e INFanzia: gli Effetti dell'Ambiente) è uno studio di coorte di nascita che recluta via internet. Gli studi di questo tipo sono intrinsecamente "*multipurpose*" e in generale si propongono di:

1. investigare fattori di rischio ambientali e genetici per complicanze materne durante la gravidanza, quali ipertensione e diabete;
2. investigare fattori di rischio ambientali e genetici per ritardato sviluppo fetale (con indicatori quali basso peso alla nascita, nascita pre-termine e basso peso per età gestazionale);
3. studiare l'eziologia delle anomalie congenite;
4. studiare quali esposizioni e fattori individuali e genetici aumentano il rischio dell'insorgenza di alcune malattie/condizioni durante l'infanzia, l'adolescenza e l'età adulta, quali per esempio asma e obesità.

Lo studio si propone di reclutare circa 7500 donne in gravidanza e i loro figli. Inoltre, tramite collegamenti internazionali, si intende partecipare a eventuali consorzi di studi di coorte di nuovi nati.

3. Studio pilota

Uno studio pilota è stato avviato nell'estate 2005 nella città di Torino (900,000 abitanti). Nell'ambito dello studio pilota è stato costruito il sito web dello studio (www.progettoninfea.it), sono stati preparati i poster e i volantini per la pubblicizzazione dello studio, e sono stati preparati tre questionari online da compilare durante la gravidanza, 6 mesi dopo il parto e 18 mesi dopo il parto.

Lo studio è stato pubblicizzato utilizzando poster e volantini e 1800 donne in gravidanza hanno partecipato entro dicembre 2008. Circa il 90% delle prime 800 donne ha compilato il secondo questionario.

Nel luglio 2006 abbiamo condotto una survey tra le donne ricoverate per il parto, presso il principale ospedale ostetrico-ginecologico della città di Torino, per stimare la proporzione di accesso a internet e la proporzione di conoscenza dello studio in questa popolazione. Su 122 donne intervistate, 66% aveva accesso a internet e 42% era a conoscenza dello studio. Otto donne (6.5%) erano membri della coorte. Da gennaio 2008 abbiamo cominciato a pubblicizzare lo studio in forum dedicati alla gravidanza. Abbiamo stimato che circa 15 donne partecipano nelle due settimane che seguono alla pubblicizzazione dello studio in un forum.

4. Metodi

4.1. Popolazione

La coorte include bambini nati da donne che abbiano una conoscenza sufficiente della lingua italiana per completare un questionario in questa lingua, siano a conoscenza dell'esistenza dello studio, abbiano accesso a internet e decidano di partecipare allo studio.
I partecipanti si registrano presso il sito dello studio (www.progettoninfea.it) e i loro bambini sono seguiti fino all'età adulta. Inoltre, anche le mamme sono seguite nel tempo per problemi di salute e complicanze durante la gravidanza e dopo il parto.

4.2. Reclutamento

Utilizziamo sia forme "attive" (offline) che forme "passive" (online) per pubblicizzare lo studio. Il reclutamento attivo comporta la pubblicizzazione tramite metodi standard (volantini, poster, presentazioni ai corsi di preparazione al parto) in aree selezionate in Italia, tramite la collaborazione con altri centri di epidemiologia. I metodi specifici di pubblicizzazione sono

sviluppati localmente. Il reclutamento passivo è gestito centralmente presso l'Unità di Epidemiologia e comporta la pubblicizzazione tramite forum dedicati alla gravidanza e siti internet, come quelli dei maggiori ospedali italiani e di associazioni di malattie.

4.3. Questionari

Tre questionari online (durante la gravidanza e a 6 e 18 mesi dal parto) sono stati sviluppati durante la fase pilota sulla base di analoghi questionari utilizzati in altre coorti di nuovi nati in Italia e all'estero. I questionari ottengono informazioni sulla madre o sul bambino a proposito di: esposizioni ambientali, fattori riproduttivi, anamnesi medica, misure antropometriche, stili di vita, stato di salute nei primi anni di vita, sviluppo fisico e cognitivo e molti altri fattori. La compilazione di ogni questionario dura circa 30 minuti.

I questionari sono stati rivisti alla fine della fase pilota sulla base delle risposte delle prime 1000 partecipanti e vengono rivisti e ridiscussi periodicamente.

4.4. Campioni biologici

Alla fine del secondo questionario viene chiesto alle donne se sono disposte a donare un campione della propria saliva e un campione della saliva del bambino. Le donne che accettano, ricevono per posta due kit (OrageneTM), che sono stati specificamente sviluppati per la auto-raccolta di un campione di 2 ml di saliva da adulti o da bambini, la scheda informativa e due versioni del consenso informato, una per la donazione della saliva da parte della mamma e una per la donazione da parte del bambino. I kit e i due consensi sono poi inviati per posta utilizzando due buste pre-affrancate indirizzate presso la SC Epidemiologia dei Tumori CRPT U. I kit con la saliva possono rimanere a lungo tempo a temperatura ambiente. Dalla saliva viene estratto il DNA che è poi conservato a -80°C per future analisi sui polimorfismi di suscettibilità individuale.

Al questionario dei 19 anni, ai partecipanti ormai maggiorenni viene richiesto se siano disponibili a partecipare alla raccolta di un campione di saliva il cui obiettivo è quello di esplorare le esposizioni ambientali e le relative influenze sull'epigenoma umano. In caso di risposta affermativa, viene loro inviato il materiale per la raccolta di un campione di saliva, contenente: i) l'informativa, ii) il modulo del consenso informato, iii) il kit per la raccolta del campione di saliva (contrassegnato con un codice ID) con le istruzioni allegate, iv) due diverse buste pre-affrancate (una per il consenso e una per il campione raccolto) da rispedire all'Unità di Epidemiologia, Dipartimento di Scienze Biomediche, Via Santena 7, 10126 – Torino.

A garanzia della tutela della privacy e dell'anonimato dei partecipanti, entrambe le buste pre-affrancate sono prive di mittente: una busta è riservata al consenso informato, compilato e firmato; nell'altra busta il partecipante inserisce esclusivamente il kit contenente il campione di saliva raccolto. Il codice identificativo associato al kit è diverso da quello usato nell'ambito del progetto NINFEA; l'associazione tra i due codici ID viene mantenuto nel database dello studio.

Nel caso in cui sia disponibile un campione già raccolto nei primi anni di vita un secondo obiettivo è quello di confrontare i marcatori epigenetici del campione "nuovo" con quelli precedentemente acquisiti. La saliva e il DNA estratto sono conservati presso la biobanca TESEO del Dipartimento di Scienze Mediche dell'Università degli Studi di Torino.

4.5. Follow-up

Il follow-up attivo viene gestito centralmente, ricontattando le donne via e-mail, telefono o posta e invitandole a compilare i questionari successivi al terzo. Sono previsti brevi questionari di follow-up della durata di 5-10 minuti. Oltre al questionario dei 4 anni del bambino sullo sviluppo cognitivo, quello dei 7 anni sulla salute respiratoria, quello dei 10 anni su diverse esposizioni ed esiti di salute, quello dei 13 anni che rileva alcuni aspetti della salute del bambino, quali manifestazione di fischi e sibili, diagnosi di asma, allergie, emicrania e cefalea, includendo anche domande relative all'apprendimento scolastico, allo sviluppo antropometrico e puberale, ad alcuni aspetti psicologici, agli stili di vita. Per garantire la validità delle informazioni raccolte, alcune domande (eventuale dolore muscolo-scheletrico e attività sportiva praticata) sono rivolte direttamente al figlio, che compila su invito della mamma. Per presentare il progetto NINFEA ai ragazzi è attiva una pagina web ad essi dedicata: NINFEAteen (https://teen.progettoninfea.it).

La stessa modalità di coinvolgimento dei figli (alcune domande dirette al termine del questionario inerenti ai seguenti temi: abitudini e comportamenti alimentari, sonno, screen-time, sport, ambiente e cambiamento climatico, relazioni sociali e rapporto con sé stessi) viene adottata per il questionario dei 16 anni, in occasione del quale si iniziano a chiedere alle mamme i dati di contatto (mail e cellulare) dei propri figli per poterli direttamente coinvolgere una volta diventati maggiorenni, quando verrà loro sottoposto il questionario dei 18/19 anni in maniera totalmente svincolata e autonoma dalle madri. Ai ragazzi viene sottoposto un modulo contenente un'informativa-consenso informato.

La partecipazione di NINFEA al progetto internazionale GOLIAT, da luglio 2022, nell'ambito del programma *Horizon Europe* dell'Unione Europea (convenzione di sovvenzione n. 101057262) prevede la somministrazione di un questionario volto a valutare le esposizioni ai campi elettromagnetici nella fascia d'età 10-13 anni. A tal fine si propone alle mamme di compilare dei questionari dedicati e di somministrarli nuovamente a un anno e mezzo di distanza. Il primo appuntamento è a 10 e 11,5 anni e il secondo, rispettivamente, a 11,5 e 13 anni. Poiché già esistono i questionari di follow-up dei 10 e dei 13 anni le nuove domande sono aggiunte ai questionari correnti, rendendosi solo necessaria l'apertura di una nuova finestra di follow-up agli 11 anni e mezzo. Si prevede inoltre, per un gruppo di residenti nell'Area Metropolitana di Torino, l'utilizzo di un accelerometro triassale da polso e la compilazione di un diario da parte del/la bambino/a per la durata di una settimana al fine di raccogliere ulteriori dati relativi all'attività fisica e al sonno.

Il follow-up NINFEA prosegue con il questionario dei 19 anni che prevede il coinvolgimento diretto dei ragazzi e delle ragazze ormai maggiorenni (i cui dati di contatto sono stati lasciati al questionario dei 16 anni dalle proprie madri) a cui vengono proposte domande relative a: qualità e stili di vita, istruzione e lavoro; anche alle mamme della coorte, che desiderino continuare a partecipare al progetto, viene sottoposto un nuovo questionario volto a rilevare dati relativi a: qualità e stili di vita, salute psico-fisica.

Mamme e figli sono anche seguiti in forma passiva utilizzando database di statistiche correnti, quali il Registro delle Schede di Dimissione Ospedaliera, i Certificati di Assistenza al Parto (CeDAP), i Registri Tumori, ecc. Il linkage tra la coorte e i Registri è effettuato tramite la collaborazione con le istituzioni regionali o nazionali responsabili dei Registri.

4.6. Dimensione campionaria e analisi statistica

Ci attendiamo di reclutare almeno 7500 neonati. Numerosi casi di malattie relativamente comuni si verificheranno nell'ambito di questa coorte, come, per esempio, 450 casi di crescita fetale ritardata, 375 casi di asma, 750 casi di sintomi asmatici nei primi 18 mesi di vita, 900 casi di dermatite atopica, 375 casi di ipertensione in gravidanza, 375 casi di obesità infantile.

I dati saranno analizzati utilizzando un approccio standard di studi caso-controllo nested, basati su ipotesi specifiche. Sono anche condotte analisi secondo un approccio life-course sia su ipotesi-specifiche sia con un fine esplorativo.

4.7. Interventi di promozione alla salute

L'utilizzo di internet permette la possibilità di innestare all'interno della coorte studi di valutazione di interventi di promozione alla salute. Al momento, i fumatori attivi e gli ex-fumatori che partecipano allo studio sono randomizzati per ricevere o meno informazioni sui più vicini centri antitabacco. La valutazione dell'intervento viene fatto sulla base della prevalenza di fumatori a 6 e 18 mesi dal parto.

5. Collaborazioni internazionali

Lo studio collabora e collaborerà con studi "tradizionali" di coorte di nuovi nati, per analizzare cause di eventi rari ed effetti di esposizioni rare. La metodologia di questo studio (reclutamento e follow-up via internet) sarà inoltre applicata in altri Paesi europei ed extra europei per creare un network di studi di coorte via internet.

6. Questionari COVID-19

Tutti i partecipanti al Progetto NINFEA sono stati invitati a compilare nel mese di aprile 2020 un breve questionario anonimo online con lo scopo di indagare sulla dimensione dell'epidemia Covid-19 nelle famiglie, con particolare riferimento all'età pediatrica. Il questionario verte su: presenza di sintomi influenzali nei membri della famiglia, eventuale diagnosi da Covid-19, percezione della conoscenza generale circa la pandemia in corso, e fonti da cui le mamme traggono aggiornamenti e informazioni a riguardo.

Un ulteriore questionario nominativo, nell'autunno 2020, si aggiunge a quelli di follow-up attualmente previsti. Il questionario (durata di compilazione: 20 minuti circa) ha lo scopo di studiare: (i) test per SARS-CoV-2, (ii) diagnosi di COVID-19, (iii) stato occupazionale e socioeconomico, (iv) stress misurato tramite il questionario PPS (*Perceived Stress Scale*), (v) problemi nella gestione di eventuali patologie croniche del bambino, (vi) punti di forza e debolezza (capacità e difficoltà) dei bambini misurati tramite il questionario SDQ (*Strengths and Difficulties Questionnaire*). Studi analoghi sono in corso in diverse coorti europee di nuovi nati con le quali si prevede un coordinamento strategico per armonizzare le variabili raccolte e i futuri protocolli di analisi.

7. Aggiornamento del protocollo

La presente versione aggiornata del protocollo dello studio è disponibile sia in lingua italiana sia in lingua inglese presso il sito dello studio www.progettoninfea.it.

8. Aspetti etici

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico Interaziendale AOU Città della Salute e della Scienza di Torino - AO Ordine Mauriziano - ASL Città di Torino. Copia del consenso informato, del consenso al trattamento dati e della scheda informativa sono disponibili sul sito web www.progettoninfea.it.

9. Referenze

1. Barker DJ, Martyn CN. The maternal and fetal origins of cardiovascular disease. J Epidemiol Community Health 1992; 46:8-11.
2. Ekbom A. Growing evidence that several human cancers may originate in utero. Semin Cancer Biol 1998; 8:237-44.
3. Richiardi L, Akre O, Bellocco R, Ekbom A. Perinatal determinants of germ-cell testicular cancer
in relation to histological subtypes. Br J Cancer 2002; 87:545-50.
4. Sorensen HT, Sabroe S, Olsen J, Rothman KJ, Gillman MW, Fischer P. Birth weight and cognitive function in young adult life: historical cohort study. Bmj 1997; 315:401-3.
5. Stene LC, Magnus P, Lie RT, Sovik O, Joner G. Birth weight and childhood onset type 1 diabetes: population based cohort study. Bmj 2001; 322:889-92.
6. Storgaard L, Bonde JP, Ernst E, Spano M, Andersen CY, Frydenberg M, et al. Does smoking during pregnancy affect sons' sperm counts? Epidemiology 2003; 14:278-86.
7. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. Bmj 1992; 305:609-13.
8. Nystad W. The Norwegian mother and child cohort. Gac Sanit 2003; 17:145.
9. Olsen J, Melbye M, Olsen SF, Sorensen TI, Aaby P, Andersen AM, et al. The Danish National Birth Cohort-its background, structure and aim. Scand J Public Health 2001; 29:300-7.
10. Tse A. Comparing the response rate, response speed and response quality of two methods of sending questionnaires: E-mail vs. mail. Journal of the Market Research Society 1998;40:353-61.