



Rapporti ISTISAN

10/20



**Lotta alla contraffazione farmaceutica:
le attività dell'Istituto Superiore di Sanità**



ISSN 1123-3117

M.C. Gaudiano, L. Manna, P. Bertocchi,
M. Bartolomei, A.L. Rodomonte,
E. Antoniella, S. Alimonti, L. Romanini,
L. Rufini, N. Muleri, B. Gallinella,
M. Mirra, S. Lucattini, M. Di Gregorio,
L. Fucili, L. Valvo

www.iss.it

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Lotta alla contraffazione farmaceutica:
le attività dell'Istituto Superiore di Sanità**

Maria Cristina Gaudiano, Livia Manna, Paola Bertocchi,
Monica Bartolomei, Andrea Luca Rodomonte, Eleonora Antoniella,
Stefano Alimonti, Laura Romanini, Leandro Rufini, Nadia Muleri,
Bruno Gallinella, Marco Mirra, Stefano Lucattini,
Massimiliano Di Gregorio, Luca Fucili, Luisa Valvo

Dipartimento del Farmaco

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

10/20

Istituto Superiore di Sanità

Lotta alla contraffazione farmaceutica: le attività dell'Istituto Superiore di Sanità.

Maria Cristina Gaudiano, Livia Manna, Paola Bertocchi, Monica Bartolomei, Andrea Luca Rodomonte, Eleonora Antoniella, Stefano Alimonti, Laura Romanini, Leandro Rufini, Nadia Muleri, Bruno Gallinella, Marco Mirra, Stefano Lucattini, Massimiliano Di Gregorio, Luca Fucili, Luisa Valvo
2010, ii, 41 p. Rapporti ISTISAN 10/20

La contraffazione farmaceutica è un grave problema di salute pubblica che riguarda sia i Paesi in via di sviluppo che i Paesi industrializzati, anche se con diffusione e caratteristiche differenti. Questo rapporto riassume le attività che l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) sta svolgendo sia come membro di *IMPACT Italia*, la task force italiana anti-contraffazione farmaceutica ufficialmente istituita nel 2007, sia come Laboratorio ufficiale di controllo dei medicinali (*Official Medicines Control Laboratory*, OMCL), sia come Ente di ricerca. Sono stati sviluppati metodi analitici di screening e applicazioni innovative di metodi chimico-fisici e tecnologici per l'analisi di farmaci contraffatti. Questi sono stati applicati all'analisi di farmaci contraffatti sequestrati dalle Forze di Polizia. L'ISS ha, inoltre, elaborato una procedura operativa per l'analisi visuale di campioni sospetti, ha sviluppato una banca dati dei loghi delle Ditte farmaceutiche ad accesso riservato e un sito governativo di informazione al pubblico (www.impactitalia.gov.it). Numerose sono state anche le attività di formazione e informazione sul fenomeno.

Parole chiave: Contraffazione farmaceutica, Medicinali, Metodi analitici di screening

Istituto Superiore di Sanità

Fight against pharmaceutical counterfeiting: the activities of the Istituto Superiore di Sanità.

Maria Cristina Gaudiano, Livia Manna, Paola Bertocchi, Monica Bartolomei, Andrea Luca Rodomonte, Eleonora Antoniella, Stefano Alimonti, Laura Romanini, Leandro Rufini, Nadia Muleri, Bruno Gallinella, Marco Mirra, Stefano Lucattini, Massimiliano Di Gregorio, Luca Fucili, Luisa Valvo
2010, ii, 41 p. Rapporti ISTISAN 10/20 (in Italian)

Pharmaceutical counterfeiting is a serious public health problem concerning both developing and industrialized countries, but with different diffusion and characteristics. This report resumes the activities that the Istituto Superiore di Sanità (ISS, the National Institute of Health in Italy) is carrying out both as a member of *IMPACT Italia*, the national anti-counterfeiting task force established in 2007, and as Official Medicines Control Laboratory (OMCL) and research institute. Screening analytical methods and new applications of physical-chemical and technological methods have been developed for the analysis of counterfeit medicines. The methods were applied to the analysis of samples seized by Police Forces. The ISS has elaborated an operating procedure for the visual inspection of suspicious samples, developed a data base of logos and visual references of pharmaceutical industries with restricted access and a government Internet site for divulgation to citizens (www.impactitalia.gov.it). Information and training activities were also carried out.

Key words: Pharmaceutical counterfeiting, Medicines, Screening analytical methods

Si ringrazia il Dott. D. Di Giorgio (AIFA), il Cap. S. Tirrò (Carabinieri NAS), la Dott.ssa M. Terracciano (Ministero della Salute), il Dott. S. Falde (Agenzia delle Dogane) per le attività nell'ambito di *IMPACT Italia* in qualità di referenti delle Istituzioni di appartenenza; i M.lli N. Morelli e G. De Sia per la collaborazione nell'ambito del progetto AIFA/WHO; la Dott.ssa L. Nicolini per le misure di sterilità eseguite su medicinali contraffatti; la Dott.ssa F. Podo, il Dott. E. Iorio, la Dott.ssa A. Borioni, la Dott.ssa M. R. Del Giudice per la collaborazione nelle misure NMR sull'eparina; il Dott. C. Pini e la Segreteria del CRIVIB per il lavoro svolto nel "caso eparina"; il Sig. E. Morassi per la collaborazione allo sviluppo del sito governativo di *IMPACT Italia*.

Per informazioni su questo documento scrivere a: mariacristina.gaudiano@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Gaudiano MC, Manna L, Bertocchi P, Bartolomei M, Rodomonte AL, Antoniella E, Alimonti S, Romanini L, Rufini L, Muleri N, Gallinella B, Mirra M, Lucattini S, Di Gregorio M, Fucili L, Valvo L. *Lotta alla contraffazione farmaceutica: le attività dell'Istituto Superiore di Sanità*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2010. (Rapporti ISTISAN 10/20).

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2010

INDICE

1. Fenomeno della contraffazione dei farmaci	1
2. Attività istituzionale nella lotta al fenomeno: <i>IMPACT Italia</i>	5
2.1. Ruolo dell'ISS all'interno dell' <i>IMPACT Italia</i>	6
3. Attività di ricerca dell'Istituto nello studio e nella lotta al fenomeno	7
3.1. Progetti di ricerca dell'ISS	7
3.2. Sviluppo e convalida di metodi analitici di screening	7
3.2.1. Metodi cromatografici per l'analisi di antibiotici di larga diffusione	7
3.2.1.1. Analisi di cefalosporine	7
3.2.1.2. Analisi di antibiotici appartenenti alla lista WHO dei farmaci essenziali	8
3.2.2. Metodi cromatografici per l'analisi di antimalarici e loro applicazione	8
3.2.3. Metodi rapidi di preparazione del campione	10
3.3. Metodi di screening ottici e tecnologici	11
3.3.1. Microscopia ottica	11
3.3.2. Test di dissoluzione	12
3.3.3. Analisi del colore	12
3.4. Applicazione di metodi chimico-fisici	13
3.4.1. Calorimetria differenziale a scansione: screening di un formulato contraffatto	14
3.4.2. Termogravimetria	16
3.4.3. Spettroscopia infrarossa: screening di un formulato contraffatto	16
3.4.4. Microscopia Hot-Stage FT-IR	17
3.4.5. Risonanza Magnetica Nucleare	17
4. Casi di contraffazione di farmaci pervenuti e analizzati in ISS	19
4.1. Medicinali per la terapia delle disfunzioni erettili	19
4.2. Anabolizzanti	20
4.2.1. Prodotti a base di metenolone enantato in fiale iniettabili	21
4.2.2. Prodotti a base di testosterone fenilpropionato, testosterone isocaproato, testosterone propionato e testosterone decanoato in fiale iniettabili	22
4.2.3. Prodotti a base di ormone della crescita in tubofiale	23
4.3. Creme dermatologiche antinfiammatorie ad azione schiarente	23
4.4. Contraffazione di materie prime: il caso eparina	24
5. Studio AIFA/WHO sulla presenza di farmaci contraffatti nella rete di vendita delle farmacie Internet	26
6. Procedura operativa sul ritrovamento sospetto di farmaci e scheda per l'analisi visuale	27

7. Archiviazione delle immagini per una banca dati dei loghi delle Ditte farmaceutiche	28
7.1. Premessa	28
7.2. Messa in sicurezza delle immagini	28
7.3. Inserimento di un <i>watermark</i>	29
7.4. Il progetto applicato	29
7.5. Possibili utilizzi del sistema	29
7.6. Conclusioni	30
8. Attività di informazione e formazione sulla contraffazione	31
8.1. Il sito governativo	31
Bibliografia	33
Appendice	
Scheda messa a punto dall'ISS per l'analisi visuale di un campione sospetto	35

1. FENOMENO DELLA CONTRAFFAZIONE DEI FARMACI

Il fenomeno della produzione e vendita di farmaci contraffatti, cresciuto nell'ultimo decennio con andamento esponenziale, ha ormai raggiunto proporzioni tali da rappresentare un grave problema di salute pubblica e un ingente danno economico (1-4).

“La piaga dei farmaci contraffatti è peggiore del flagello della malaria, dell'AIDS e delle rapine a mano armata messi insieme” (dichiarazione di D. Akunyli, Direttore Generale dell'Agenzia nigeriana per il controllo degli alimenti e dei medicinali – *National Agency for Food and Drug Administration and Control*, NAFDAC).

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (*World Health Organization*, WHO) definisce come contraffatto “un farmaco la cui etichettatura sia stata deliberatamente e fraudolentemente preparata con informazioni ingannevoli circa il contenuto e/o l'origine del prodotto” (1). La contraffazione può riguardare sia prodotti originatori che prodotti generici e include diverse tipologie:

- prodotti che contengono la corretta quantità del principio attivo specificato ma la cui origine è diversa da quella dichiarata;
- prodotti contenenti il principio attivo specificato ma in dosaggio diverso da quello dichiarato o contenenti principi attivi di scarsa qualità;
- prodotti non contenenti alcun ingrediente attivo;
- prodotti contenenti principi attivi differenti da quelli dichiarati.

Una particolare categoria di farmaci contraffatti sono quelli prodotti legalmente ma che vengono successivamente riconfezionati in confezioni contraffatte attestanti un dosaggio più elevato o riconfezionati dopo la data di scadenza in confezioni che riportano una data di scadenza falsa.

È evidente come le diverse tipologie di contraffazione abbiano un impatto differente sulla salute pubblica. In alcuni casi le conseguenze sanitarie sono minime e vi è solamente un danno economico per la Ditta produttrice, ma l'utilizzo di un farmaco contraffatto costituisce principalmente un grave danno per la salute. Nei casi di sotto-dosaggio, infatti, si può avere inefficacia terapeutica e insorgenza di resistenze microbiche (come nel caso di antibiotici, antimalarici o antiretrovirali); è poi evidente quale minaccia per la salute sia costituita da prodotti privi di principio attivo.

In generale, un farmaco contraffatto non è prodotto nel rispetto delle Buone Pratiche di Fabbricazione e, spesso, la qualità della materia prima è scarsa, con conseguente aumento nel farmaco dei livelli di impurezze, di solventi residui e/o di metalli pesanti potenzialmente tossici.

La potenziale pericolosità di un farmaco falso può, inoltre, essere ascritta agli eccipienti e al confezionamento primario. Quest'ultimo, infatti, può essere stato realizzato con materiali non conformi alle prescrizioni delle autorità regolatorie per ciò che concerne la stabilità e la compatibilità col prodotto medicinale con cui vengono a contatto, oppure presentare difetti nella chiusura, con conseguente degradazione del principio attivo o contaminazione microbica. Anche nel caso di sostituzione fraudolenta di eccipienti si possono avere problemi di tossicità dovuti alla presenza di sostanze nocive. Inoltre gli eccipienti possono influire sulla biodisponibilità del farmaco e quindi, sulla sua efficacia terapeutica. Anche una modalità non corretta di conservazione, tipica dello stoccaggio di farmaci contraffatti, può alterare la qualità dei prodotti. Nel caso di farmaci che devono essere prodotti in condizioni di sterilità, l'assenza di tale requisito nel prodotto falso costituisce un ulteriore grave danno per la salute. Altrettanto grave è

la diffusione di medicinali che contengono principi attivi o eccipienti differenti da quelli dichiarati o addirittura sostanze altamente tossiche.

L'aumento della diffusione di farmaci contraffatti nel mondo, favorito dalla globalizzazione dei mercati e dalla liberalizzazione del commercio internazionale, produce un enorme giro di affari legato alla criminalità organizzata internazionale. Il fenomeno della falsificazione dei farmaci si presenta con dimensioni e caratteristiche differenti nei Paesi industrializzati e nei Paesi in Via di Sviluppo (PVS). La valutazione della diffusione del fenomeno della contraffazione dei medicinali è molto difficile, tuttavia la WHO stima dall'1% a più del 10% la percentuale di farmaci contraffatti venduti nel mondo. Naturalmente questa percentuale cambia considerevolmente nelle diverse aree socio-economiche del mondo e, in particolare, nei PVS, dove il fenomeno ha dimensioni molto maggiori (3). La tipologia di contraffazione farmaceutica è differente nei PVS rispetto ai Paesi industrializzati; infatti, mentre in questi ultimi i farmaci contraffatti sono rappresentati essenzialmente da prodotti legati agli stili di vita, quali anabolizzanti, prodotti per la terapia delle disfunzioni erettili, psicofarmaci, nei PVS i farmaci maggiormente falsificati sono i prodotti salva-vita, quali gli antibiotici, gli antimalarici, gli antitubercolari e gli antiretrovirali per la terapia dell'AIDS.

Le principali cause della maggiore diffusione di farmaci contraffatti nei PVS sono le insufficienti risorse umane e finanziarie e la scarsa o totale assenza di controlli sull'importazione e la vendita dei medicinali. Soprattutto nei Paesi dell'Africa sub-Sahariana, la vendita di farmaci è effettuata prevalentemente tramite il mercato informale/illegale, su bancarelle all'aperto e nella maggior parte dei casi i farmaci sono venduti sfusi, cioè come singole compresse inserite in bustine di plastica o carta dove è scritto a penna il nome del farmaco e il dosaggio. Spesso detti medicinali non riportano neppure la data di scadenza e quasi mai è indicato il nome del produttore del farmaco o il Paese di provenienza (Figura 1).

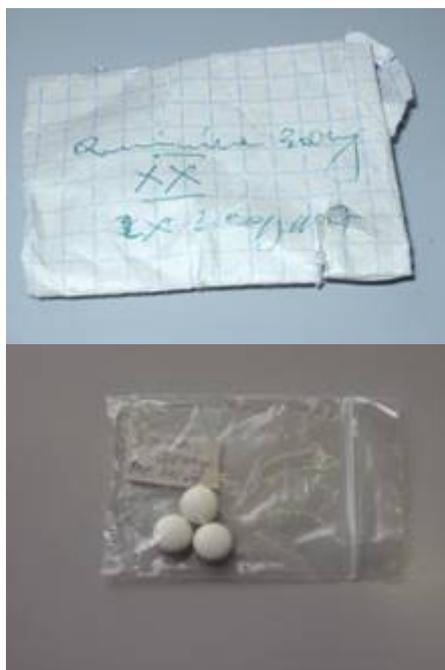


Figura 1. Confezioni di chinino acquistate al mercato informale in Congo

Le scarse possibilità economiche della popolazione, la necessità di abbassare i costi dei medicinali e la non accessibilità a moltissimi tipi di farmaci, ha determinato in molti PVS lo sviluppo di un fiorente e incontrollato mercato del farmaco illegale dove le attività fraudolente della contraffazione possono facilmente inserirsi. Molti sono i rapporti e gli articoli scientifici riguardanti casi di contraffazione farmaceutica, spesso scoperti per inefficacia terapeutica o, nei casi più drammatici, per morte del paziente. A titolo di esempio si può ricordare il caso del vaccino contraffatto contro la meningite in Niger, che nel 1995 causò il decesso di 2500 persone (5-6); i casi di sostituzione dell'eccepiante glicerina con il dietilene glicole (il liquido antigelo per le macchine) in farmaci in sciroppo che ha causato decessi in Nigeria nel 1990, in India nel 1998, a Panama nel 2006 (7-8); il caso scoperto dall'organizzazione non governativa Medici Senza Frontiere, la quale nel 2003 denunciò che farmaci venduti nella Repubblica Democratica del Congo come antiretrovirali per il trattamento dell'AIDS contenevano in realtà antidepressivi e miorilassanti (9).

Nel sud-est asiatico numerosissimi sono i casi di antimalarici contraffatti, in particolare quelli a base di artesunato e meflochina: uno studio effettuato nel 2004 ha evidenziato che, su 188 campioni analizzati, il 53% di questi non conteneva artesunato (10). Tra i Paesi più colpiti in quest'area del mondo c'è la Cambogia, dove sono numerosi i casi di morte causata da farmaci contraffatti (11). In Cina e in India moltissimi sono i casi di contraffazione che riguardano diverse tipologie di farmaci, dagli antitubercolari agli antimalarici fino ai falsi "Viagra" o "Cialis" (12-13).

Ampia è la diffusione del fenomeno anche in America latina (3). Nel 2001 in Colombia l'*Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos* (INVIMA) scoprì che a Bosa venivano prodotti farmaci contenenti acido borico, cemento e talco. Nei 18 mesi successivi la INVIMA confiscò 18 tonnellate di farmaci adulterati, riconfezionati e contraffatti (14).

Notizie di questa pericolosa attività criminosa provengono spesso anche dai Paesi dell'ex Unione Sovietica (15-18).

Nei Paesi industrializzati la contraffazione farmaceutica presenta caratteristiche ed entità molto differenti rispetto a quelle dei PVS e riguarda soprattutto i farmaci così detti "life-style". Tra questi possiamo annoverare i prodotti anabolizzanti, l'ormone della crescita, alcuni antinfiammatori per uso topico, farmaci anoressizzanti, ipolipidemizzanti, prodotti per la terapia delle disfunzioni erettili e alcuni psicotropici. In Europa questi prodotti vengono commercializzati illegalmente in negozi del tipo "Afro shop", in palestre e attraverso il mercato in Internet.

Oltre ai farmaci contraffatti, che imitano prodotti di marca, sul mercato europeo arrivano, soprattutto da Cina e India, medicinali importati illegalmente, in quanto privi di una autorizzazione all'immissione in commercio valida nei Paesi europei. La qualità di questi prodotti è spesso non conforme agli standard europei e, pertanto, essi possono costituire un rischio per la salute pubblica. Nel mercato illegale europeo sono stati anche rinvenuti farmaci prodotti per l'esportazione e fatti rientrare illegalmente in Europa o contraffatti, quali, ad esempio, preparazioni per uso topico a base di glucocorticoidi che vengono utilizzati dalle popolazioni migranti africane come schiarenti per la pelle. Un fiorente mercato illegale riguarda anche numerosi prodotti "naturali" cinesi e indiani o, più in generale, del sud-est asiatico, quali integratori alimentari o prodotti ad azione tranquillante o dimagrante che, all'analisi chimica, sono risultati contenere principi attivi ad azione farmacologica. In questi prodotti, infatti, sono stati riscontrati lassativi, diuretici, anoressizzanti, tranquillanti, narcotici e principi attivi per la terapia delle disfunzioni erettili.

In Europa il sistema regolatorio e di controllo sull'importazione dei farmaci rende più improbabile il rinvenimento di farmaci contraffatti o illegali nella rete di distribuzione autorizzata rispetto ai PVS, tuttavia, il mercato illegale e l'*e-commerce* sono per loro natura

difficilmente controllabili e si prestano alla diffusione del fenomeno anche nei Paesi occidentali. A livello europeo è stato osservato che alcune circostanze economiche e socio-sanitarie quali l'alto costo del prodotto, l'abuso o l'uso *off-label*, la difficoltà nel disporre della prescrizione medica, la presenza sul confezionamento di indicazioni che attraggono l'attenzione del consumatore, rendono determinati prodotti maggiormente a rischio di contraffazione.

In considerazione del trend di crescita dei casi di contraffazione nei Paesi europei i Laboratori Ufficiali di Controllo dei Medicinali (*Official Medicines Control Laboratory*, OMCL) dell'Unione Europea stanno rivolgendo un'attenzione crescente al problema orientando risorse economiche e scientifiche al contrasto del pericoloso fenomeno.

La consapevolezza da parte del cittadino dei rischi connessi con l'acquisto di farmaci sul mercato non convenzionale/illegale sicuramente costituirebbe un primo passo per ridurre il fenomeno della contraffazione in Europa.

2. ATTIVITÀ ISTITUZIONALE NELLA LOTTA AL FENOMENO: *IMPACT ITALIA*

Il gruppo di esperti dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) sulla contraffazione farmaceutica è nato dall'esperienza del Reparto di Chimica Analitica Farmaceutica del Laboratorio di Chimica del Farmaco, attualmente Reparto di Qualità dei Farmaci di Origine Chimica del Dipartimento del Farmaco, che dal 2001 si è interessato alla problematica attraverso la realizzazione di diversi progetti di ricerca. All'attività di ricerca di laboratorio si è in seguito affiancata l'attività di coordinamento di diverse istituzioni italiane interessate al fenomeno della contraffazione farmaceutica.

Nel 2005 è iniziata la collaborazione tra il gruppo di esperti dell'ISS (rappresentanti dei Reparti: Qualità dei Farmaci di Origine Chimica; Medicine Complementari, Naturali e Tradizionali. Sicurezza dei Prodotti Cosmetici; Farmacopea e Qualità dei Medicinali) e rappresentanti dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) e dei Carabinieri dei Nuclei Antisofisticazioni e Sanità (NAS) per studiare strategie nazionali di contrasto al fenomeno.

Il Gruppo di lavoro sui farmaci contraffatti, già informalmente attivo dal 2005, viene istituito con Determinazione dell'AIFA del 4 aprile 2007. Il gruppo è costituito da rappresentanti del Dipartimento del Farmaco dell'ISS, dell'AIFA, del Ministero della Salute e del Comando Carabinieri per la Tutela della Salute - NAS. Il Gruppo si configura come "anello italiano" dell'iniziativa WHO IMPACT (*International Medical Products Anti-Counterfeiting Taskforce*) e rappresenta il punto di riferimento unico in Italia per le segnalazioni di casi di contraffazione e per le iniziative nel settore. Nel 2008 il Gruppo di lavoro viene denominato *IMPACT Italia* (in Figura 2 ne è riportato il logo) e viene allargato alla partecipazione di rappresentanti del Ministero dell'Interno, dell'Agenzia delle Dogane e dell'Alto Commissario per la Lotta alla Contraffazione. Nel 2009 il disciolto Alto Commissario per la Lotta alla Contraffazione viene sostituito nella task force dalla struttura del Ministero dello Sviluppo Economico che ne ha ereditato le competenze, ovvero la Direzione Generale per la lotta alla contraffazione - Ufficio Italiano Brevetti e Marchi. Sono attualmente membri di *IMPACT Italia* l'AIFA, il Ministero della Salute, l'ISS, i Carabinieri NAS, il Ministero dello Sviluppo Economico, l'Agenzia delle Dogane e il Ministero dell'Interno (Direzione Centrale Polizia Criminale). Il gruppo si è configurato come *Single Point of Contact* (SPOC) italiano per la lotta alla contraffazione e, conseguentemente, già collaborano con *IMPACT Italia* alcuni degli attori privati del settore: Farindustria, Assogenerici, Federfarma e l'Associazione degli importatori paralleli. Il Gruppo cura anche una cooperazione su singole iniziative con altre strutture interessate al fenomeno, come gli enti di ricerca o gli enti locali che curano progetti specifici sul tema.



Figura 2. Logo della task force nazionale contro la contraffazione farmaceutica *IMPACT Italia*

Il Gruppo ha il compito di monitorare e valutare il fenomeno della contraffazione farmaceutica in Italia, di elaborare strategie atte a contrastarlo, di svolgere attività di formazione e informazione sul fenomeno e coordinare le proprie attività con le iniziative internazionali: il Consiglio d'Europa, lo *European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare* (EDQM) e la WHO.

2.1. Ruolo dell'ISS all'interno di *IMPACT Italia*

L'ISS prende parte attiva ai lavori di *IMPACT Italia* sia all'interno della segreteria tecnica (costituita da un membro di ciascuna delle quattro Istituzioni che hanno dato origine al gruppo nazionale: AIFA, Ministero della Salute, ISS, Carabinieri NAS) sia con membri ed esperti che partecipano alle riunioni periodiche e sono coinvolti nelle diverse attività programmate da *IMPACT Italia*. In particolare, le attività svolte sono state:

- Analisi di campioni contraffatti e sviluppo di specifici metodi di screening.
- Partecipazione allo “Studio AIFA/WHO sulla presenza di farmaci contraffatti nella rete di vendita delle farmacie Internet” mediante analisi dei campioni pervenuti a seguito dell'acquisto da parte dei Carabinieri NAS.
- Elaborazione di una procedura operativa sul ritrovamento sospetto di farmaci, applicabile dagli investigatori (Carabinieri NAS) nei casi in cui venga ritrovato un farmaco potenzialmente contraffatto sul territorio nazionale. All'interno della procedura è stata formulata una scheda per l'analisi visuale di un campione sospetto.
- Sviluppo di una banca dati dei loghi delle Ditte farmaceutiche ad accesso riservato, consultabile dagli investigatori e i membri di *IMPACT Italia* per poter avere accesso ai riferimenti visuali dei loghi originali nei casi sia necessario effettuare un confronto visivo.
- Partecipazione alle attività di formazione e informazione mediante relazioni a congressi e specifici corsi.
- Collaborazione a pubblicazioni specifiche sull'argomento.
- Sviluppo del sito governativo di informazione per il pubblico (www.impactitalia.gov.it).

3. ATTIVITÀ DI RICERCA DELL'ISTITUTO NELLO STUDIO E NELLA LOTTA AL FENOMENO

3.1. Progetti di ricerca dell'ISS

Fin dal 2001 il Reparto Qualità dei Farmaci di Origine Chimica del Dipartimento del Farmaco (ex Reparto di Chimica Analitica Farmaceutica del Laboratorio di Chimica del Farmaco) dell'Istituto Superiore di Sanità è coinvolto nella lotta alla contraffazione farmaceutica anche mediante alcuni progetti di ricerca. Questi progetti hanno avuto il duplice scopo di sviluppare metodi analitici di screening rapidi, semplici e versatili per la determinazione dei farmaci contraffatti e di creare una expertise nazionale per affrontare i casi di contraffazione farmaceutica nel nostro Paese.

I progetti di ricerca finanziati su questo argomento sono stati:

- “Farmaci contraffatti, un problema sanitario emergente: strategie analitiche per combattere la contraffazione dei medicinali” (Fondi ISS “Ricerca intramurale” 2001-2003).
- “Farmaci contraffatti, un problema sanitario emergente: strategie per combattere la contraffazione dei medicinali” (Fondi ISS “Ricerca Corrente” 2004-2006).
- “Contraffazione farmaceutica: aspetti tecnico scientifici e implicazioni socio-sanitarie. Un approccio multidisciplinare alla problematica” (Fondi ISS 2007).
- “Farmaci contraffatti: Metodi analitici e loro applicazione ai casi di contraffazione sul territorio nazionale. Problematiche socio-sanitarie” (Fondi ISS 2008).

3.2. Sviluppo e convalida di metodi analitici di screening

3.2.1. Metodi cromatografici per l'analisi di antibiotici di larga diffusione

3.2.1.1. Analisi di cefalosporine

La contraffazione di antibiotici, che rappresenta il 45% di tutti i casi di falsificazione di farmaci, è un problema particolarmente grave. Infatti, i farmaci con attività antibatterica che contengono una quantità di principio attivo inferiore a quanto dichiarato determinano livelli ematici del farmaco più bassi delle concentrazione ottimali, causando sia il fallimento terapeutico che lo sviluppo di ceppi batterici resistenti.

Le cefalosporine sono antibiotici appartenenti alla classe dei β -lattamici comunemente utilizzati per il trattamento di infezioni causate da batteri gram-positivi e gram-negativi. Nell'ultimo decennio un gran numero di nuove cefalosporine ha ottenuto l'autorizzazione all'immissione in commercio; solo sul mercato italiano sono presenti forme solide orali contenenti 13 differenti principi attivi appartenenti a questa classe. L'identificazione e il dosaggio di questi composti secondo i metodi della farmacopea ufficiale richiedono l'applicazione di differenti condizioni cromatografiche per ciascun analita.

Lo scopo della nostra ricerca è stato, pertanto, quello di sviluppare e convalidare un unico metodo analitico che permettesse lo screening di forme farmaceutiche orali a base di cefalosporine al fine di individuare farmaci contraffatti o sub-standard. Il metodo messo a punto permette la separazione, con un'analisi cromatografica della durata di soli sei minuti, di nove

differenti cefalosporine che possono così essere rapidamente identificate, mediante confronto dei tempi di ritenzione e degli spettri UV, e quantificate (Figura 3) (19).

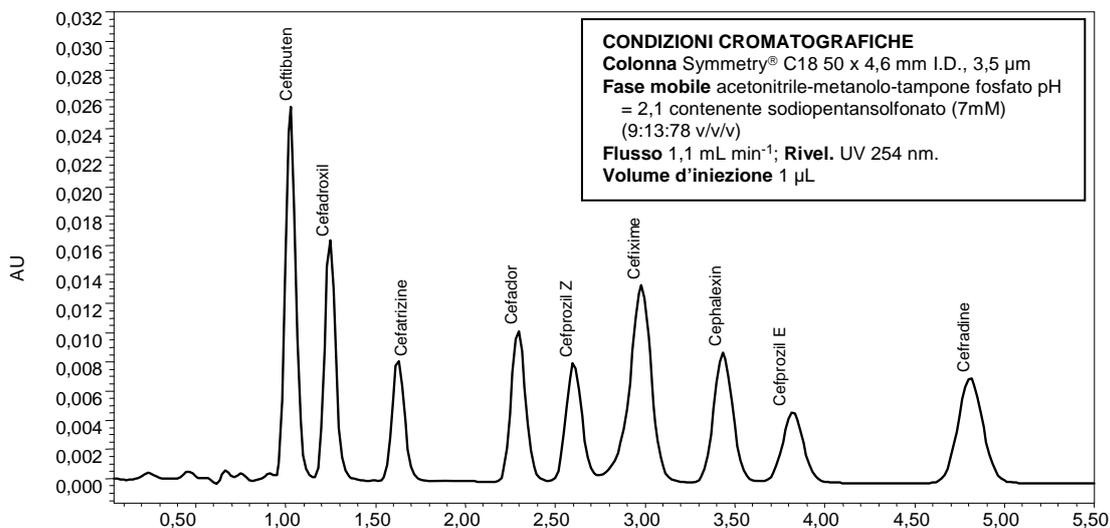


Figura 3. Separazione cromatografica di nove differenti cefalosporine

3.2.1.2. Analisi di antibiotici appartenenti alla lista WHO dei farmaci essenziali

Questo studio, partendo dalla stessa problematica del precedente, ha permesso di sviluppare un metodo analitico per l'analisi contemporanea di sei differenti tipi di antibiotici appartenenti alla lista WHO dei farmaci essenziali (ampicillina, amoxicillina, acido clavulanico, doxiciclina, cloxacillina, cloramfenicolo). Considerando la specifica problematica, il metodo è stato convalidato su diverse formulazioni e diverse concentrazioni di principio attivo al fine di mimare la situazione reale dei farmaci contraffatti. Il metodo sviluppato, applicato all'analisi di alcuni campioni di antibiotici provenienti dal Ciad, ha evidenziato casi di contraffazione farmaceutica per sottodosaggio. In un campione di amoxicillina si è evidenziato che il medicinale conteneva solamente il 5% della quantità di principio attivo dichiarato. Questo campione era stato acquistato presso una farmacia locale, ma sfuso, cioè senza i confezionamenti, primario e secondario, originali (20).

3.2.2. Metodi cromatografici per l'analisi di antimalarici e loro applicazione

Questo lavoro di ricerca ha preso in considerazione la problematica della contraffazione farmaceutica di farmaci salva-vita di largo uso nei PVS. L'idea iniziale è stata quella di sviluppare un unico metodo analitico per il dosaggio dei principi attivi di diversi farmaci antimalarici. Nell'ottica di una analisi di screening è infatti importante avere pochi metodi, i più semplici possibile, per analizzare differenti farmaci di una stessa classe. Sono stati in un primo momento considerati i tre più diffusi antimalarici a base di cloroquina, chinino e meflochina. Durante lo sviluppo e la convalida del metodo di cromatografia liquida (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) per il dosaggio del principio attivo è stata tenuta in conto la peculiarità della problematica, ovvero la possibile contraffazione del farmaco e, quindi, si è considerata sia la possibilità di sottodosaggio o sovradosaggio del principio attivo che la

possibilità della presenza nella formulazione di eccipienti diversi e a basso costo. In fase di convalida, quindi, la linearità è stata valutata tra il 10 e il 200% e l'applicabilità del metodo è stata verificata su dieci differenti formulazioni prodotte in laboratorio.

Successivamente è stato modificato e riconvalidato il metodo HPLC della *United States Pharmacopeia* (21) per il dosaggio della sulfadossina e pirimetamina in compresse. Anche in questo caso la riconvalida del metodo ha tenuto conto della peculiarità della problematica analitica. Nel Riquadro 1 sono riportati i due metodi analitici.

RIQUADRO 1

Metodi HPLC per l'identificazione e il dosaggio di principi attivi antimalarici in compresse e capsule:

A base di chinino, cloroquina e meflochina

Colonna: Symmetry C18, 75 mm x 4,6 mm i.d., 3,5 μ m (Waters Corporation)

Tcolonna: 30°C

λ : 230 nm

V_{in} : 10 μ L.

Fase mobile A: 6,80 g diidrogeno fosfato di potassio anidro + 1,22 g 1-pentansulfonato di sodio in circa 900 mL di H₂O + 1 mL trietilammina. Aggiustare il pH a 2,9 \pm 0,1 con H₃PO₄ e portare a volume a 1 L.

Fase mobile B: Acetonitrile

Eluizione a gradiente con flusso 1 mL/min: 0-5 min: da 90% A a 70% A, 5-8 min: da 70% A a 50% A, 8-10 min: 50% A. Riequilibrare il sistema a 90% A. L'analisi quantitativa è effettuata mediante retta di calibrazione a 3 punti con soluzioni di standard (0,08, 0,1 e 0,12 mg/mL).

Preparazione del campione: le compresse vengono polverizzate in mortaio e viene pesata una quantità di polvere tale da ottenere una soluzione 1 mg/mL in principio attivo in tampone fosfato (per la cloroquina) e in metanolo (per chinino e meflochina). La soluzione è poi diluita 1:10 con lo stesso mezzo solvente.

A base di sulfadossina e pirimetamina in associazione

Colonna: C18 Supelcosil ABZ+Plus, 250 mm x 4,6 mm i.d., 5 μ m (Supelco)

Tcolonna: 25°C

λ : 254 nm

V_{in} : 10 μ L.

Fase mobile: 1% v/v acido acetico: acetonitrile (64:36 v/v).

Eluizione isocratica con flusso 1 mL/min.

L'analisi quantitativa è effettuata mediante soluzioni di standard preparate in triplicato alla concentrazione test (0,05 mg/mL in sulfadossina e 0,125 mg/mL in pirimetamina).

Preparazione del campione: le compresse vengono polverizzate in mortaio. Una opportuna quantità di polvere viene disciolta in 35 mL di acetonitrile e, dopo sonicazione, si porta a volume con acido acetico 1%v/v. Dopo filtrazione la soluzione viene ulteriormente diluita per ottenere una concentrazione finale di 0,05 mg/mL in sulfadossina e 0,125 mg/mL in pirimetamina.

I metodi sviluppati sono stati poi applicati all'analisi di trenta campioni di farmaci provenienti da Congo, Burundi e Angola. L'acquisto dei farmaci è stato effettuato grazie alla collaborazione di personale sanitario locale e con la collaborazione della ONG italiana VIS. Per ogni campione è stata compilata una scheda al fine di avere informazioni sulle caratteristiche dell'acquisto. Sui campioni sono stati effettuati il riconoscimento e il dosaggio del principio attivo, l'uniformità di massa, il test di disaggregazione e il test di dissoluzione. Il diagramma di Figura 4 riporta i risultati dello screening.

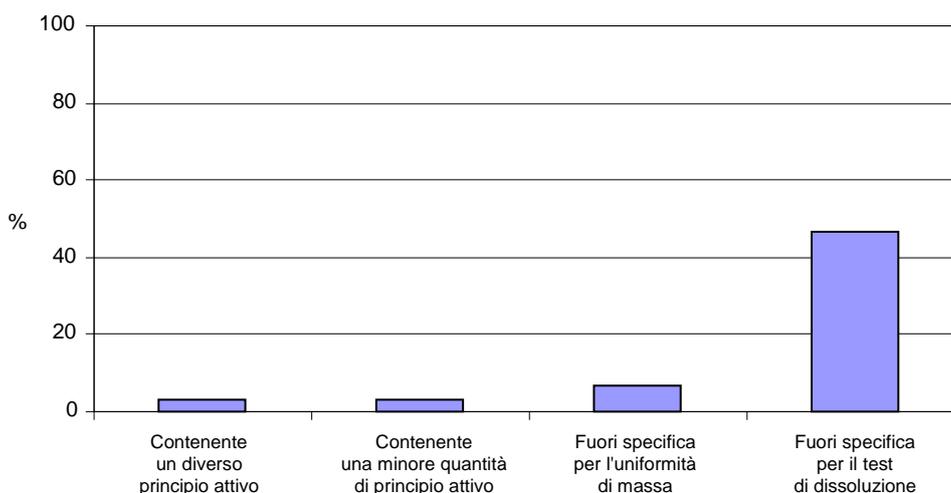


Figura 4. Campioni fuori specifica (%) evidenziati in uno screening effettuato su 30 campioni di antimalarici acquistati al mercato informale in Congo, Burundi e Angola

In particolare si è scoperto un campione in cui vi era stata sostituzione del principio attivo (cloroquina anziché chinino) e numerosi campioni sono risultati fuori specifica per il test di dissoluzione. Quest'ultimo dato apre un'inquietante problematica, spesso trascurata, relativa alla possibile non bioequivalenza di un farmaco contenente la corretta quantità di principio attivo ma prodotto in formulazioni su cui non sono stati effettuati studi di bioequivalenza.

Questo studio è stato oggetto di due pubblicazioni scientifiche, la prima principalmente di carattere analitico e la seconda riguardante l'applicazione del metodo ai campioni potenzialmente contraffatti provenienti dal mercato informale africano (22-23).

3.2.3. Metodi rapidi di preparazione del campione

La preparazione del campione, che precede la determinazione analitica, è spesso la parte più complessa e lunga di molti procedimenti analitici. Nell'analisi farmaceutica le formulazioni a matrice non polare quali supposte, creme e pomate sono tra quelle che richiedono le procedure più lunghe e costose in termini di solventi utilizzati. I metodi normalmente usati per l'estrazione del principio attivo da questo tipo di formulazioni comprendono diversi passaggi quali la fusione, la dispersione a caldo della matrice nel solvente organico appropriato, il raffreddamento, la centrifugazione e/o la filtrazione.

Da circa vent'anni sono state sviluppate molte applicazioni del riscaldamento a microonde per l'estrazione di composti da matrici complesse. L'estrazione assistita da microonde (MAE, *Microwave Assisted Extraction*) consiste nell'utilizzo dell'energia delle microonde per riscaldare un mezzo solvente in cui è disperso un campione da cui si vuole estrarre uno o più analiti. Il riscaldamento è ottenuto grazie all'azione diretta delle microonde sulle molecole del solvente mediante conduzione ionica e rotazione dei dipoli. Nel metodo di estrazione denominato FMAE (*Focused Microwave Assisted Extraction*) il campione da trattare è posto in un recipiente irraggiato da un fascio focalizzato di microonde. Il solvente caldo viene fatto refluire mediante un refrigerante ad acqua che sovrasta il recipiente; tutto il sistema opera a pressione atmosferica fino al completamento dell'estrazione.

Il principale vantaggio di questa tecnica di preparazione del campione è la riduzione dei tempi di estrazione dovuta alla maggiore efficienza di riscaldamento dell'irraggiamento a microonde rispetto al riscaldamento convenzionale. In quest'ultimo caso, infatti, occorre un tempo non trascurabile affinché il calore venga trasferito alla soluzione attraverso le pareti del recipiente, mentre le microonde riscaldano direttamente la soluzione. Inoltre, è possibile ottenere una consistente riduzione del consumo di solventi con indubbi vantaggi economici e ambientali. Ampia è la letteratura nel campo dell'estrazione di una gran varietà di analiti da matrici ambientali, alimentari e vegetali, mentre in campo farmaceutico questa tecnica ha trovato finora poche applicazioni.

Lo scopo del nostro lavoro di ricerca è stato di tentare l'applicazione di questa tecnica a due tipi di formulazioni farmaceutiche non polari, le supposte e le creme, contenenti principi attivi antinfiammatori di largo uso quali, rispettivamente, il naproxene e il ketoprofene. In entrambi i casi si è riusciti a mettere a punto e convalidare procedimenti di estrazione quantitativa dei principi attivi dalle relative formulazioni utilizzando ridotte quantità di solventi organici e completando l'estrazione in tempi non superiori ai 10 minuti (Tabella 1). La quantificazione del principio attivo è stata poi effettuata mediante metodi HPLC appositamente sviluppati (24-25).

Tabella 1. Condizioni di estrazione del principio attivo mediante FMAE

Principio attivo	Forma farmaceutica	Solvente di estrazione	Condizioni di estrazione
Naproxene	Supposte	Metanolo/NaHCO ₃ 0,1M, 50/50 (v/v); Volume: 50 mL	Gradiente lineare 25→70°C per 10 min
Ketoprofene	Crema	Acetone/KH ₂ PO ₄ 25 mM, pH=3 70/30 (v/v) Volume: 50 mL	Gradiente lineare 25→65°C per 10 min

Nel caso della crema a base di ketoprofene, il metodo permette l'estrazione e quindi la successiva quantificazione anche dei conservanti metil- e propil-p-idrossibenzoato in essa contenuti.

I metodi di estrazione a microonde sviluppati si pongono come una valida alternativa ai metodi di farmacopea nel caso sia necessario operare l'analisi quali-quantitativa rapida di un gran numero di campioni di cui si sospetti la contraffazione.

3.3. Metodi di screening ottici e tecnologici

3.3.1. Microscopia ottica

La microscopia ottica si è rivelata un utile ausilio per l'analisi visuale del campione contraffatto. In particolare, il microscopio ha permesso di evidenziare le differenze nell'aspetto superficiale delle compresse, attribuibile a diversa tecnologia utilizzata per la compressione e a disomogeneità o diversità nella colorazione del film di rivestimento dovuta sia a diverso contenuto di colorante sia ad una sua non omogenea distribuzione (Figura 5).



Figura 5. Immagini al microscopio ottico della superficie di una compressa di Viagra® originale (a) e “Viagra” contraffatto (b)

3.3.2. Test di dissoluzione

Il saggio di dissoluzione permette di evidenziare casi di contraffazione che interessino le caratteristiche della formulazione del medicinale, cioè sia la qualità e la quantità degli eccipienti utilizzati, sia la tecnologia utilizzata per realizzare il prodotto finito. Variazioni della formulazione rispetto al prodotto originario implicano una modificazione delle caratteristiche biofarmaceutiche del medicinale, cioè del rilascio del principio attivo dalla matrice e potenzialmente dell'efficacia del medicinale. La preparazione contraffatta potrebbe contenere una corretta quantità di principio attivo, ma avere diversa composizione a livello di eccipienti o essere stata formulata mediante diversa tecnologia; di conseguenza, la velocità di cessione del principio attivo dalla formulazione potrebbe essere insufficiente tanto da rendere il medicinale inefficace. Studi effettuati su farmaci antimalarici hanno dimostrato l'importanza del test di dissoluzione nella verifica della potenziale contraffazione di un farmaco (23).

3.3.3. Analisi del colore

La misura del colore di compresse e confezionamento secondario è un'altra tecnica messa a punto al fine di disporre di uno strumento rapido per ridurre il numero di campioni sospetti da analizzare con metodi analitici più approfonditi.

Il colore di una compressa e di zone caratteristiche del confezionamento secondario sono proprietà peculiari di un medicinale che difficilmente possono essere imitate perfettamente in un farmaco contraffatto.

Per poter misurare il colore di superfici solide è stato impiegato un colorimetro “Eye One”, cioè uno spettrofotometro che registra lo spettro di riflessione nel campo del visibile (da 380 a 730 nm, ogni 10 nm). Questo strumento, generalmente impiegato per calibrare i colori di monitor e proiettori, è stato qui invece utilizzato per effettuare una misura del colore di compresse e confezionamento secondario di sospetti contraffatti, così da avere dei dati più accurati e riproducibili rispetto alla classica ispezione visiva. I vantaggi che offre questa applicazione sono che lo strumento impiegato è molto economico (meno di 1000 €), è facilmente trasportabile e si alimenta da un PC a cui si collega tramite una porta USB. Per questo motivo questa tecnica si presta ad essere impiegata agevolmente anche al di fuori di un laboratorio (es. in posti di controllo delle dogane) e da personale non addestrato. L'esecuzione

della misura, infatti, è molto rapida e semplice: occorre far aderire perfettamente l'oculare della sonda alla superficie da analizzare facendo attenzione a non far entrare la luce esterna; una singola scansione dura pochi secondi.

Con questa applicazione ci si propone di confrontare lo spettro di riflessione della compressa o di una zona peculiare del confezionamento secondario di un farmaco sospetto con quello registrato per il farmaco originale. In particolare, si segue una procedura analoga a quella effettuata dalle Ditte farmaceutiche per i controlli in linea mediante NIR per testare la buona fabbricazione dei lotti prodotti. Con questo metodo si cerca di stabilire se il farmaco sospetto fa parte della popolazione statistica degli originali o se invece ne è al di fuori. Preliminarmente si è quindi proceduto ad effettuare delle analisi per costruire una popolazione statistica degli originali. Per far questo sono stati analizzati differenti lotti di campioni originali della stessa tipologia e dosaggio includendo e valutando tutte le sorgenti di variabilità (variabilità fra lotti, errore strumentale, ecc.). L'esperimento è stato costruito nel seguente modo: sono state eseguite 10 repliche in due differenti giorni da 3 operatori per ogni lotto (Figura 6).

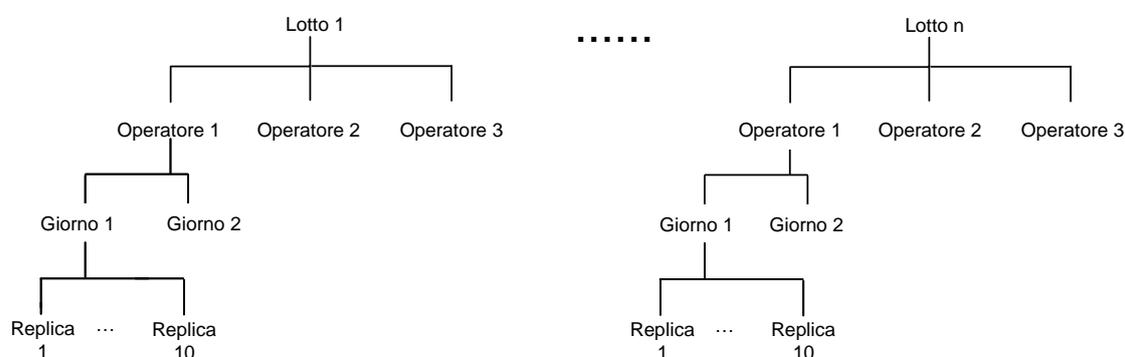


Figura 6. Schema operativo per la costruzione della popolazione statistica

Si è quindi calcolata la *Grand Mean* (cioè uno spettro di riflessione medio per tutti gli originali di una data tipologia) e una finestra di tolleranza (scarto tipo totale) per ciascuna lunghezza d'onda considerata.

Questo lavoro preliminare di costruzione della popolazione statistica degli originali è stato effettuato sulle compresse e sul confezionamento secondario dei seguenti farmaci:

- Viagra Pfizer: 100 mg, 50 mg, 25 mg;
- Cialis Lilly: 20 mg, 10 mg;
- Levitra Bayer: 20 mg, 10 mg.

3.4. Applicazione di metodi chimico-fisici

Metodi non tradizionali possono essere utilizzati vantaggiosamente per la risoluzione di casi complessi di contraffazione. L'analisi termica (calorimetria differenziale a scansione: *Differential Scanning Calorimetry*, DSC; e termogravimetria: *Thermal Gravimetric Analysis*, TGA), l'analisi spettroscopica infrarossa (spettroscopia FT-IR: *Fourier Transform-InfraRed*) e di risonanza magnetica nucleare (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) possono permettere di

distinguere principi attivi o formulazioni differenti sulla base delle loro caratteristiche strutturali. Inoltre, l'NMR può fornire indicazioni per l'identificazione di un principio attivo incognito in una matrice complessa.

La WHO nel proprio *Action sheet* del novembre 2003 dal titolo "Substandard and counterfeit medicines" invita le Autorità Regolatorie ad iniziare un ampio e diffuso utilizzo di tecniche analitiche atte allo screening per l'individuazione di farmaci contraffatti e sub-standard. È ovvio che più tali tecniche sono rapide e di semplice utilizzo e più saranno appropriate. Pertanto le tecniche termoanalitiche e la spettroscopia infrarossa sembrano proprio di prima scelta per lo scopo.

3.4.1. Calorimetria differenziale a scansione: screening di un formulato contraffatto

La DSC permette di ottenere un profilo specifico per ogni sostanza o miscela di sostanze. Il termogramma che tale tecnica produce per ogni composto, dunque, costituisce una sorta di impronta digitale termica. Pertanto, la calorimetria permette di fotografare una data formulazione farmaceutica e distinguerla da un'altra formulazione che sia anche leggermente diversa. Le formulazioni studiate, però, devono essere di facile manipolazione: deve essere cioè possibile prelevarne un'aliquota (su alcune capsule molli, ad esempio, ci sarebbero notevoli difficoltà pratiche nel campionamento).

Un farmaco contraffatto o sub-standard può non contenere il principio attivo (p.a.), contenere principi attivi diversi, eccipienti diversi, o più di una di queste cose contemporaneamente:

– *Assenza di principio attivo*

Nel profilo termico del formulato, il picco di fusione del p.a. sarà assente. Non è applicabile nel caso in cui il p.a. si decomponga senza fondere.

– *Principio attivo diverso*

La presenza di un picco di fusione diverso (o eventuali altre curve legate a differenti transizioni) indica immediatamente la frode. Anche in questo caso, problemi di interpretazione possono sorgere qualora sia il principio attivo vero che quello falso non presentino fusione né altre transizioni, ma solo decomposizione.

– *Eccipienti diversi*

Se il principio attivo è lo stesso, il farmaco contraffatto può comunque essere individuato dall'eventuale presenza di eccipienti diversi dall'originale. Tali eccipienti diversi possono presentare fenomeni termici (fusioni e transizioni varie) diversi dagli originali. Inoltre, il profilo caratteristico del principio attivo potrebbe mostrare uno *shift* della temperatura di fusione/transizione se gli eccipienti cambiano rispetto al formulato originale. Nel formulato originale, infatti, gli eccipienti vengono scelti in modo da non presentare interazioni chimico-fisiche con il principio attivo. Nel contraffatto la scelta degli eccipienti si basa invece su criteri ben diversi, come il loro basso costo e la facilità di lavorazione. Spesso sono state registrate interazioni tra eccipienti non adeguati e p.a. evidenziate chiaramente dallo spostamento del picco di fusione o dall'allargamento dello stesso (Figura 7 e 8). Se, invece, il farmaco contraffatto contiene gli stessi eccipienti e lo stesso principio attivo, ma in quantità differente dall'originale, la calorimetria non permette di evidenziare la contraffazione.

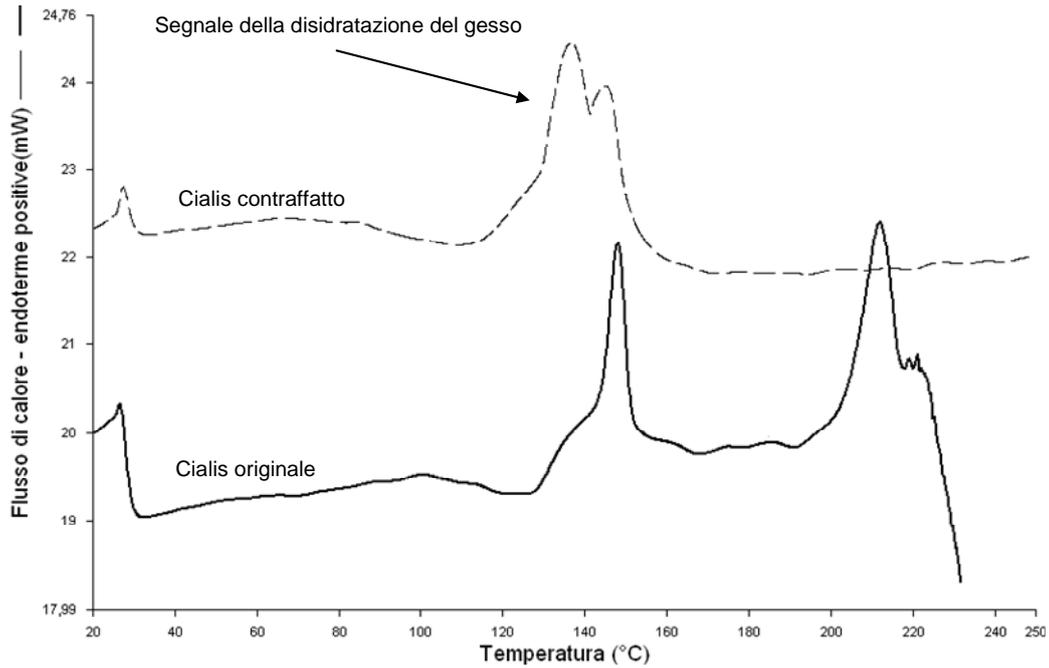


Figura 7. Profili calorimetrici di una compressa di Cialis® originale e di una contraffatta: si osserva la grave e pericolosa sostituzione degli eccipienti originali con del gesso

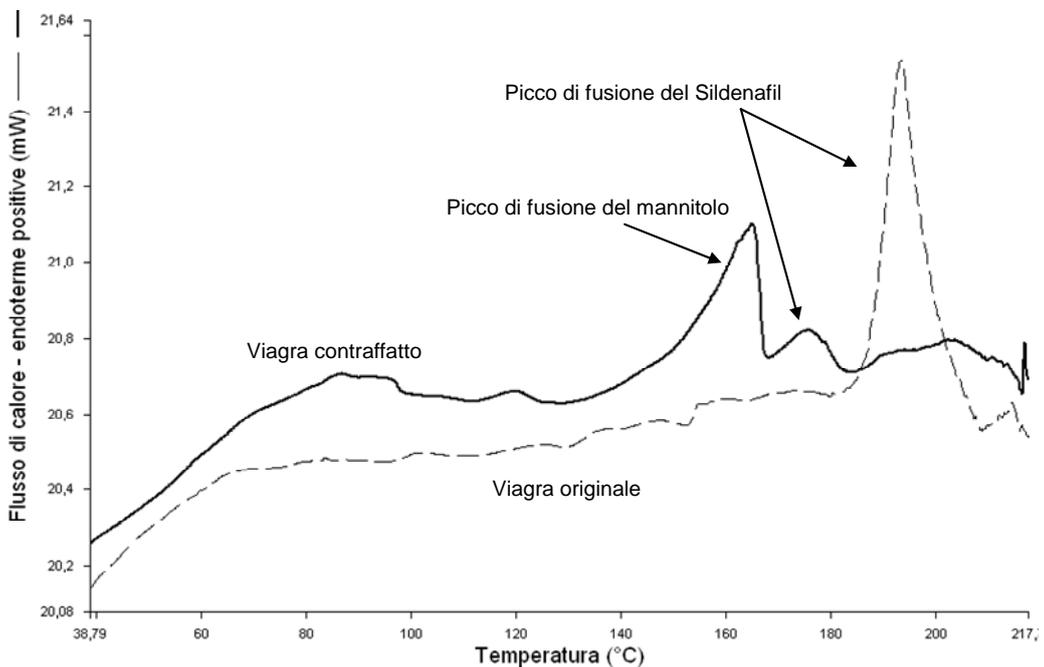


Figura 8. Profili calorimetrici di una compressa di Viagra® originale e di una contraffatta: si osserva la modifica del picco di fusione del principio attivo Sildenafil causato dalla sua interazione con il mannitolo, eccipiente non idoneo aggiunto dai contraffattori

3.4.2. Termogravimetria

La termogravimetria consente di determinare la perdita in peso di una sostanza al variare della temperatura. Ogni sostanza è caratterizzata da una specifica perdita in peso conseguente ad una disidratazione/desolvatazione oppure, più in generale, alla sua decomposizione: queste perdite in peso caratteristiche permettono quindi di riconoscere, all'interno di un formulato, la presenza di specifici eccipienti e principi attivi.

Formulati differenti presentano termogrammi differenti. Eccipienti diversi hanno contenuti d'acqua diversi o temperature e profili di decomposizione diversi (Figura 9).

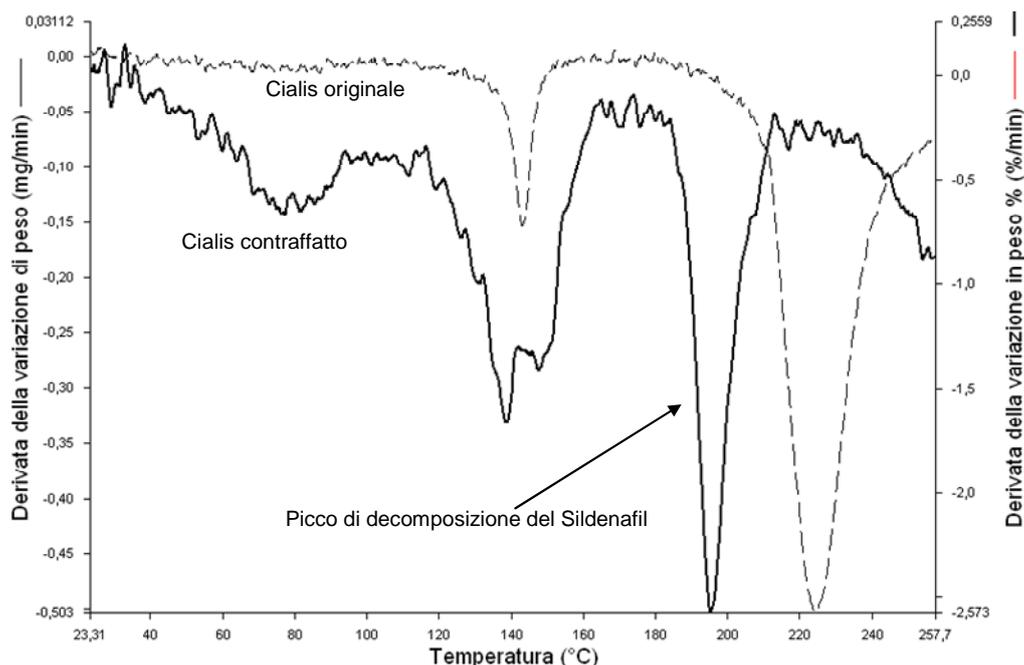


Figura 9. Termogrammi di una compressa di Cialis® originale e di una contraffatta: si osserva la sostituzione del principio attivo Tadalafil con il Sildenafil, principio attivo del Viagra®

3.4.3. Spettroscopia infrarossa: screening di un formulato contraffatto

La spettroscopia FT-IR può dimostrarsi una tecnica valida e complementare alla DSC. Nei casi più semplici, la presenza di principi attivi differenti all'interno del formulato contraffatto viene evidenziata, per confronto con il medicinale originale, dalla mancanza delle bande specifiche della sostanza e dalla presenza di bande alternative. La presenza di eccipienti diversi, allo stesso modo, viene individuata dall'assenza delle bande corrispondenti agli eccipienti originali e dalla presenza di bande alternative. Nei casi più complessi, però, lo spettro del principio attivo può essere mascherato da quello degli eccipienti che a loro volta possono presentare bande poco specifiche o troppo larghe (Figura 10).

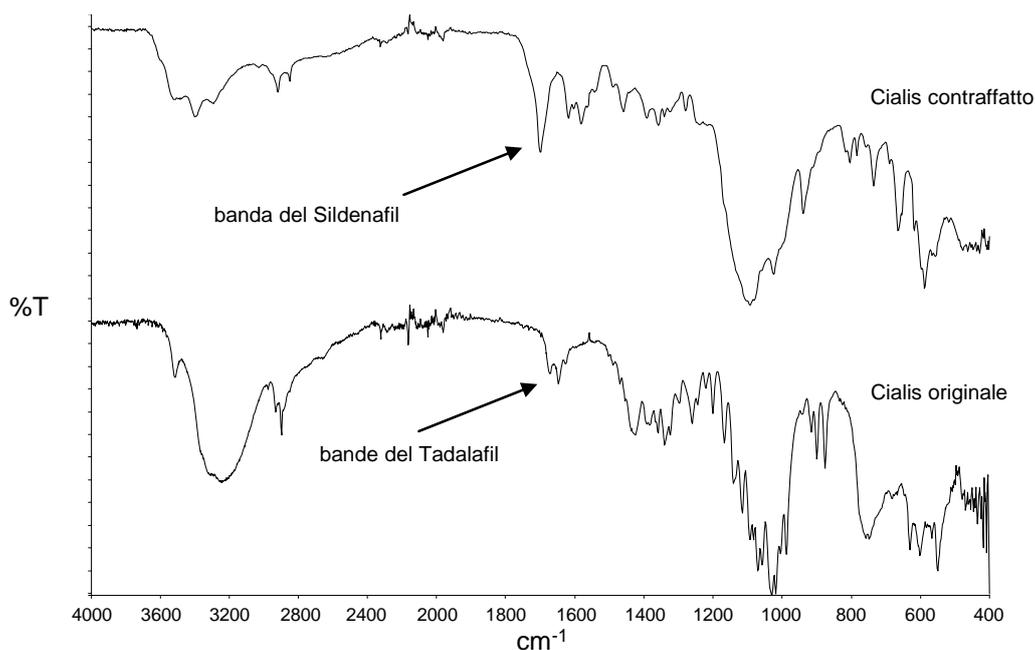


Figura 10. Spettro IR di una compressa di Cialis® originale e di una contraffatta: si osserva la mancanza delle bande caratteristiche del Tadalafil (principio attivo del Cialis®) e la presenza della banda caratteristica del Sildenafil (principio attivo del Viagra®)

3.4.4. Microscopia *Hot-Stage FT-IR*

Questa tecnica, che consiste nell'accoppiare la spettroscopia infrarossa ad un microscopio e una base riscaldante (*hot-stage*), permette di indirizzare il raggio infrarosso direttamente sulla particella che si presume essere di principio attivo, così da evitare i problemi di interferenza con gli eccipienti. Il riscaldamento della polvere consente di osservare l'immagine di questa ed eventualmente il suo spettro IR in funzione della temperatura. Una miscela di eccipienti diversa da quella originale presenta modificazioni della struttura fisica e dello spettro IR a temperature diverse rispetto alla miscela originale. Questa tecnica è complementare alla DSC.

3.4.5. Risonanza Magnetica Nucleare

L'NMR rappresenta una delle tecniche più efficaci e promettenti, sia per stabilire rapidamente se un farmaco è contraffatto, sia per identificare l'esatta natura delle sostanze incognite una volta dimostrata la contraffazione. L'NMR viene utilizzata vantaggiosamente da alcuni laboratori ufficiali di controllo come tecnica preliminare alla cromatografia liquida, allo scopo proprio di identificare immediatamente la presenza di principi attivi non dichiarati e/o eccipienti anomali.

Grazie alla sua versatilità e alla straordinaria quantità di esperimenti che è possibile mettere a punto, l'NMR fornisce un numero di dettagli sul contenuto di un campione incognito proporzionale al tempo che si dedica all'indagine.

L’NMR monodimensionale permette (se si dispone di un’adeguata banca dati di spettri di protoni e carbonio, oppure di standard di riferimento) di individuare la presenza di principi attivi o eccipienti diversi da quelli originali. Ad esempio, in tutti quei casi in cui il farmaco ritenuto contraffatto sia costituito da una matrice semplice (si pensi ad uno sciroppo), uno spettro protonico e di carbonio, confrontati con quelli del farmaco di riferimento, possono già da soli dimostrare la contraffazione: la presenza di picchi assenti nello spettro di riferimento indica inequivocabilmente la presenza di sostanze anomale. Un esempio concreto è rappresentato dalla possibilità di individuare una pericolosa contraffazione a danno degli sciroppi: la sostituzione del propilen glicole (glicerolo) con il dietilen glicole (molto tossico). Le due sostanze, infatti, forniscono spettri NMR molto diversi.

Una volta dimostrato che il farmaco in studio è effettivamente contraffatto, l’NMR mette a disposizione un gran numero di esperimenti bidimensionali per individuare la natura delle sostanze presenti in miscela (26). Il tipico esperimento COSY (*Correlation Spectroscopy*) permette di stabilire quali protoni si trovino vicini tra loro nella struttura della molecola. Similmente, i cosiddetti esperimenti etero-correlati come l’HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) e HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*) permettono di evidenziare a quali carboni della struttura i vari protoni siano legati. Un altro esperimento etero-correlato, l’HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) permette infine di stabilire, all’interno di uno spettro generato da una miscela complessa di sostanze, quali protoni e carboni facciano parte della stessa molecola, consentendo così di conoscere il numero di sostanze di cui è composta la miscela e di avere indicazioni sulla loro natura.

L’NMR dello stato solido, infine, può permettere di eseguire analisi direttamente sulle forme farmaceutiche solide, eliminando tutti i laboriosi passaggi di estrazione. Le polveri ottenute da compresse originali e quelle dei corrispondenti contraffatti, possono presentare spettri anche molto diversi, permettendo così una rapida conferma dell’avvenuta contraffazione (27).

4. CASI DI CONTRAFFAZIONE DI FARMACI PERVENUTI E ANALIZZATI IN ISS

Negli ultimi cinque anni un cospicuo e crescente numero di campioni di farmaci contraffatti o presunti tali, sequestrati dai Carabinieri NAS e dalla Guardia di Finanza sono stati inviati al Dipartimento del Farmaco dell'ISS per analisi. Si riportano di seguito i risultati evidenziati su alcuni dei campioni analizzati.

4.1. Medicinali per la terapia delle disfunzioni erettili

Numerosi campioni contraffatti, provenienti dal mercato illegale, che imitavano il Viagra® e il Cialis® sono stati oggetto di sequestri dei Carabinieri NAS e della Guardia di Finanza. I campioni sono stati analizzati mediante cromatografia liquida, spettroscopia IR e analisi termica per determinare la composizione quali-quantitativa in principio attivo ed eccipienti in confronto ai campioni originali. Lo standard di riferimento e i campioni originali sono stati forniti dalle Ditte produttrici ufficiali dei due farmaci. I risultati hanno evidenziato diverse tipologie di contraffazione farmaceutica: assenza del principio attivo indicato; sostituzione del principio attivo con un altro (es. sostituzione del tadalafil con il sildenafil in campioni di Cialis® contraffatto); co-presenza dei due principi attivi (sildenafil e tadalafil); sotto-dosaggi e pericolosi sopra-dosaggi (fino al 170% del dichiarato) con gravi rischi per la salute pubblica. Lo studio effettuato sugli eccipienti mediante spettroscopia FT-IR e termoanalisi ha evidenziato la frequente presenza di eccipienti diversi dai quelli dei campioni originali e di eccipienti non impiegati per uso farmaceutico (es. il gesso). L'analisi visuale dei confezionamenti secondario e primario e delle compresse in confronto ai corrispondenti originali ha spesso indicato, già prima dell'analisi chimica, la possibile contraffazione (scritte, spesso in lingua straniera, loghi, ologrammi e colori non perfettamente corrispondenti). È stata, inoltre, effettuata un'analisi anche sul colorante delle compresse e sui colori caratteristici del confezionamento secondario con metodi strumentali. Questo tipo di indagine ha confermato in molti casi la contraffazione. In Figura 11 sono riportate alcune fotografie di confronto di compresse originali e contraffatte di Viagra e Cialis.



Figura 11. Compresse di Viagra® e Cialis® originali e contraffatte a confronto

La Figura 12 riporta il confronto tra i confezionamenti secondari di Cialis® originale e contraffatto.



Figura 12. Confezionamenti di Cialis® originale e contraffatto

4.2. Anabolizzanti

Nel 2005 e nel 2009 sono stati sequestrati sul mercato illegale italiano ingenti quantitativi di anabolizzanti contraffatti. Alcuni di questi prodotti sono stati analizzati dall'ISS. Allo scopo di verificare la presunta contraffazione è stata effettuata sia una verifica sui confezionamenti primario e secondario, per confronto con i prodotti originali inviati dalle Ditte produttrici (quando possibile) sia l'analisi chimico-farmaceutica mediante cromatografia liquida per determinare la presenza o meno del/i principio/i attivo/i ed, eventualmente, di altri componenti quali conservanti o eccipienti. Si riportano di seguito alcune immagini fotografiche di campioni (Figura 13 e 14) e i risultati ottenuti su alcuni dei prodotti inviati all'ISS.



Figura 13. Fiale di farmaci a base di anabolizzanti contraffatti (si notano alcune imperfezioni, indice di possibile contraffazione: fiale di altezze differenti, etichette attaccate storte e facilmente staccabili, saldatura delle fiale con imperfezioni)



Figura 14. Confezionamento secondario di un farmaco contraffatto a base di anabolizzanti: sulla scatola è riportato l'indirizzo di una officina di produzione inesistente, nella composizione si può notare un errore: "mag 4" al posto di "mg 4"

4.2.1. Prodotti a base di metenolone enantato in fiale iniettabili

In Italia il medicinale non è attualmente in commercio. Il confronto analitico e visuale è stato effettuato mediante confezioni inviate dalla Ditta produttrice, che ha mandato anche gli standard di riferimento. Le confezioni, potenzialmente contraffatte, inviate all'ISS, erano di tre diverse tipologie:

- *Tipologia A*: caratterizzata da un medesimo numero di lotto che compariva sia sul confezionamento primario sia sul secondario, ma riportava due differenti date di scadenza sui due confezionamenti. Il prodotto conteneva 3 fiale per confezione.
- *Tipologia B*: con numero di lotto e data di scadenza sul confezionamento secondario identici a quelli riportati sul confezionamento secondario della tipologia A, ma sul confezionamento primario erano riportati numero di lotto e data di scadenza differenti. Il prodotto conteneva 1 fiala per confezione.
- *Tipologia C*: con numero di lotto e data di scadenza uguali sui due confezionamenti e diverse da A e B. Il prodotto conteneva 1 fiala per confezione.

L'analisi chimico-farmaceutica effettuata mediante cromatografia liquida contro standard di riferimento e in comparazione con il prodotto originale inviato dalla Ditta produttrice, ha evidenziato quanto di seguito riportato:

- *Tipologia A*: totale assenza di principio attivo, dell'eccipiente olio di ricino e del conservante benzil benzoato. Presenza di picchi cromatografici assenti nel campione originale della Ditta.
- *Tipologia B*: totale assenza di principio attivo e del conservante benzil benzoato. Probabile presenza dell'eccipiente olio di ricino.
- *Tipologia C*: totale assenza di principio attivo e del conservante benzil benzoato. Probabile presenza dell'eccipiente olio di ricino.

I valori di densità delle tre tipologie di prodotto sono risultati inferiori a quelli dei campioni di riferimento inviati dalla Ditta. Il test di sterilità effettuato dal Servizio Biologico dell'ISS sui campioni contraffatti ha evidenziato che i campioni erano sterili.

L'indagine visuale del campione ha evidenziato numerosi difetti e differenze nei confezionamenti rispetto ai campioni originali: etichette sulle fiale attaccate storte, parzialmente sovrapposte, caratteri grafici leggermente differenti, errori nel foglietto illustrativo, loghi non identici a quello originale. In Figura 15 è riportata l'immagine fotografica dei tre campioni contraffatti.

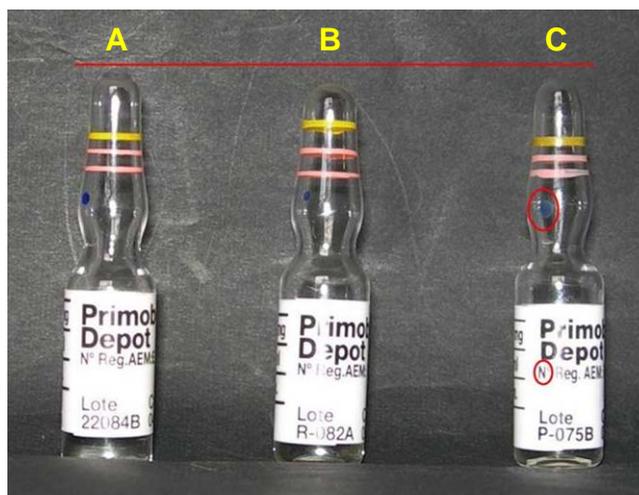


Figura 15. Fiale di farmaci contraffatti a base di metenolone enantato: si nota che sono di diversa altezza e con anelli e punto di rottura differenti tra fiala e fiala; la saldatura delle fiale presenta imperfezioni

4.2.2. Prodotti a base di testosterone fenilpropionato, testosterone isocaproato, testosterone propionato e testosterone decanoato in fiale iniettabili

In Italia il medicinale originale è in commercio, con obbligo di prescrizione medica, ma con un nome leggermente differente dal nome del prodotto potenzialmente contraffatto che è stato sequestrato e inviato all'ISS per analisi. Il confronto visivo e analitico è stato effettuato mediante confezioni originali inviate dalla Ditta produttrice, che ha inviato anche gli standard di riferimento per l'analisi chimico-farmaceutica.

L'analisi, effettuata mediante HPLC su tre campioni prelevati a caso dall'aliquota inviata all'ISS, ha evidenziato la totale assenza dei principi attivi. È stata, inoltre, confermata l'assenza di testosterone, principale prodotto di degradazione dei quattro principi attivi. I profili cromatografici dei tre campioni non sono risultati sovrapponibili né tra loro né a quello del campione di riferimento. Solamente alcuni picchi cromatografici erano sempre presenti nei tre campioni.

Il valore della densità dei tre campioni è risultato inferiore rispetto a quello del campione di riferimento della Ditta, ma l'aspetto esteriore delle soluzioni (liquido oleoso, leggermente

giallastro) era molto simile a quello del campione originale, tanto da poter trarre facilmente in inganno un consumatore.

Dall'analisi visuale sono emerse numerose differenze nel confezionamento primario e secondario, nei caratteri grafici e posizione delle scritte.

Il test di sterilità effettuato dal Servizio Biologico dell'ISS sui campioni potenzialmente contraffatti ha evidenziato che i campioni erano sterili.

4.2.3. Prodotti a base di ormone della crescita in tubofiale

In Italia il prodotto originale è in commercio con obbligo di prescrizione medica. I campioni sequestrati sono stati inviati all'ISS per analisi chimico-farmaceutiche. Il confronto analitico e visuale è stato effettuato con confezioni inviate dalla Ditta produttrice, che ha inviato anche gli standard di riferimento per l'analisi. L'analisi, effettuata mediante cromatografia liquida su 3 campioni prelevati a caso dall'aliquota inviata all'ISS, ha evidenziato la totale assenza del principio attivo e delle sue sostanze correlate. Era invece presente una piccola quantità del conservante m-cresolo (<10% della quantità presente nel campione originale) che impartisce al prodotto un odore caratteristico. Si è osservato, inoltre, che la ricostituzione prima dell'uso del campione contraffatto richiedeva tempi per la solubilizzazione maggiori rispetto al campione originale.

L'analisi visuale ha evidenziato numerose differenze nel confezionamento primario e secondario per quanto concerne caratteri grafici, posizione delle scritte e colori. Il bollino antidoping era assente.

4.3. Creme dermatologiche antinfiammatorie ad azione schiarente

Tra il 2006 e il 2007 sono stati effettuati alcuni sequestri in "ethnic cosmetics shops" di creme e gel antinfiammatori prodotti in Europa per l'export. Tali prodotti per uso topico contengono glucocorticoidi (betametasona dipropionato, fluocinonide, clobetasol propionato, ecc.) e vengono largamente impiegati dalla popolazione migrante di origine africana come schiarenti per la pelle. Indagini effettuate anche in altri Paesi europei hanno messo in luce una duplice problematica: alcuni campioni ritrovati sul mercato europeo sembra siano prodotti legalmente in Europa per l'export e poi reimportati illegalmente in Europa e venduti come cosmetici in negozi non autorizzati alla vendita. Oltre a ciò esiste probabilmente una importazione illegale di questi stessi prodotti contraffatti: quest'ultimi sono risultati contenere quantità di principio attivo inferiori al dichiarato, alte percentuali di prodotti di degradazione o addirittura non contenere affatto la sostanza attiva. Alcuni di questi prodotti sono stati analizzati dall'ISS. In Figura 16 sono riportate le immagini fotografiche di alcuni campioni pervenuti all'ISS per analisi.

Come esempio si riporta il risultato ottenuto su un campione di gel a base di fluocinonide 0,05%, oggetto di un sequestro da parte dei Carabinieri NAS. L'analisi sul campione è stata effettuata mediante cromatografia liquida contro standard di riferimento ed è stata effettuata una comparazione con il prodotto di riferimento della Ditta produttrice. L'identificazione del principio attivo è risultata positiva. Il dosaggio è risultato del 63,6%, cioè inferiore alle specifiche (90-110%). L'analisi visuale comparativa ha evidenziato numerose differenze nel confezionamento secondario e primario: differenze nel logo, nella dimensione della scatola, nella grandezza e nel colore delle scritte e nelle scritte stesse.



Figura 16. Alcuni prodotti utilizzati come schiarenti per la pelle pervenuti all'ISS a seguito di sequestri

4.4. Contraffazione di materie prime: il caso eparina

Nel 2008 l'ISS è stato chiamato a contribuire con la propria *expertise* analitica e di valutazione del rischio nella cosiddetta "emergenza eparina". L'eparina è un principio attivo con attività anticoagulante indicata per la prevenzione e il trattamento della trombosi venosa profonda e delle sue complicanze. La materia prima (eparina grezza) è prodotta a partire dal tessuto intestinale dei suini e la Cina ne è il principale esportatore al mondo. Nei primi mesi del 2008 negli Stati Uniti la *Food and Drug Administration* (FDA) ha segnalato numerosi casi di

reazioni avverse gravi, con oltre 100 casi di morte, correlati alla somministrazione endovenosa di eparina sodica. Le sospette reazioni avverse includevano lo shock anafilattico o l'ipotensione.

Dalle informazioni pervenute dall'FDA si è evidenziato che le reazioni avverse erano associate alla presenza di un contaminante a struttura eparino-simile (condroitina solfato ipersolfatata, OSCS) nell'eparina di provenienza cinese. Il contaminante è stato aggiunto a scopo fraudolento, probabilmente per aumentare in modo fittizio il quantitativo di eparina per far fronte alla momentanea scarsità di materia prima, dovuta ad una epidemia dei suini.

In Italia i Carabinieri NAS, dietro richiesta dell'AIFA, hanno campionato circa 250 prodotti da Ditte che importano eparina in forma grezza dalla Cina. Questi campioni sono stati analizzati dall'ISS (Dipartimento del Farmaco in collaborazione con il Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze e il Centro Nazionale per la Ricerca e il Controllo dei Prodotti Immunobiologici). Su tutti i campioni sono state effettuate analisi con differenti tecniche e, in particolare, con l'NMR per la ricerca del segnale caratteristico dell'inquinante e per il suo dosaggio. Sulla base dei risultati analitici dell'ISS sono stati richiamati dal mercato i lotti risultati contaminati.

Dopo aver seguito il metodo messo a punto dall'FDA per far fronte alla crisi, il Dipartimento del Farmaco ha messo a punto un suo metodo interno capace di individuare contenuti inferiori di contaminante (fino allo 0,1%). Nel dicembre del 2008, infine, il Dipartimento del Farmaco ha partecipato ad uno studio collaborativo dell'EDQM per mettere a punto un metodo che permettesse non solo di individuare la presenza del contaminante, ma anche di dosarlo con precisione. In Figura 17 è riportato uno spettro NMR tipico di eparina contaminata.

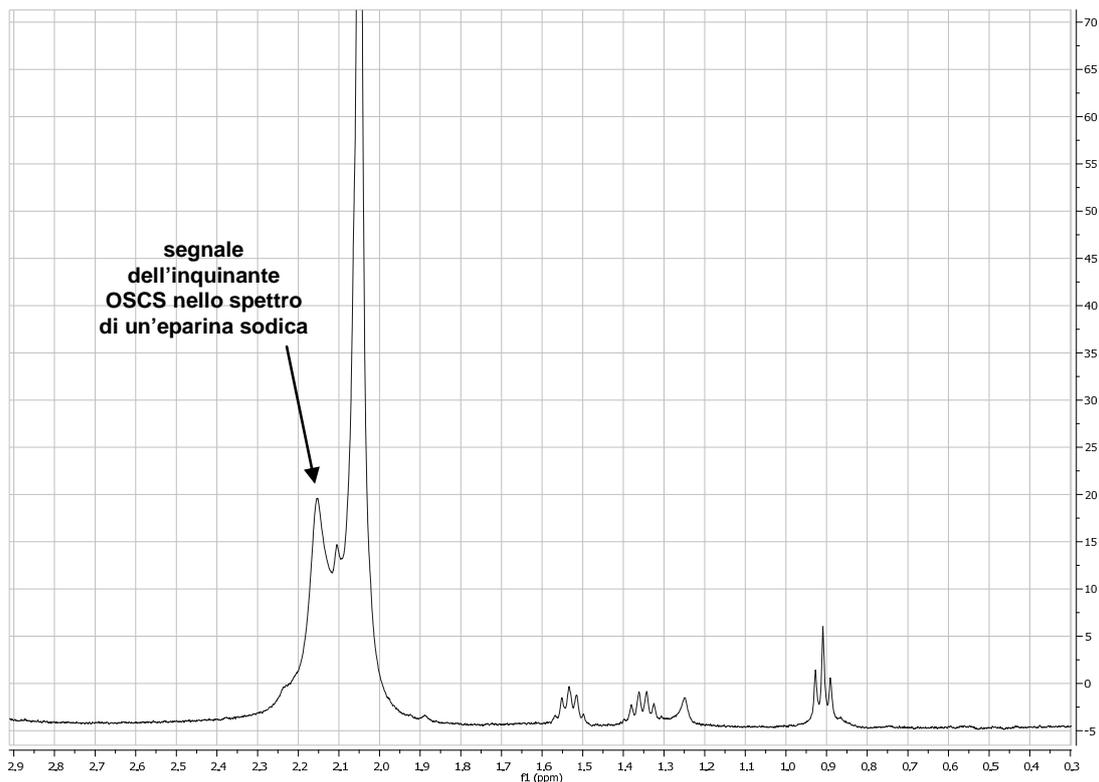


Figura 17. Spettro NMR di eparina sodica in presenza del contaminante OSCS

5. STUDIO AIFA/WHO SULLA PRESENZA DI FARMACI CONTRAFFATTI NELLA RETE DI VENDITA DELLE FARMACIE INTERNET

Oltre alle attività di analisi richieste dalla Magistratura e ai progetti finanziati con fondi istituzionali, nel 2007 ha preso il via uno studio di collaborazione tra la WHO, l'AIFA, l'ISS e i Carabinieri NAS, per la valutazione dell'incidenza del fenomeno della contraffazione tra i farmaci venduti mediante Internet. Lo studio prevedeva l'acquisto online di farmaci e la loro analisi allo scopo di verificarne la qualità ed evidenziarne l'eventuale contraffazione.

Lo studio ha avuto due fasi di esecuzione: nella prima fase sono stati acquistati prodotti per la cura della disfunzione erettile (Viagra®, Cialis® e Levitra®) e alcuni anabolizzanti, nella seconda fase, ancora in corso, l'indagine si è estesa anche ad altre tipologie di prodotti. I farmaci sono stati acquistati in forma anonima e analizzati dal personale dell'ISS.

Nella prima fase sono stati effettuati 28 acquisti, corrispondenti a 34 medicinali, ma dei 19 siti da cui sono stati effettuati acquisti solamente 9 (47%) hanno inviato prodotti. Di questi, solamente 7 (37%) hanno inviato esattamente quanto ordinato. Nel 59% dei casi, pur a fronte dell'avvenuto pagamento, non è stato inviato alcun prodotto. Sui farmaci pervenuti sono stati effettuati il dosaggio del principio attivo mediante metodi cromatografici validati, lo spettro IR, l'analisi termica e l'uniformità di massa (quando possibile, in base alla numerosità e tipologia del campione). Ad eccezione di un campione che è risultato essere originale, gli altri erano, per il 74% dei casi, copie illegali provenienti dall'India, ossia medicinali copie dei prodotti originali ma non autorizzati al commercio in Italia e nel 21% dei casi prodotti contraffatti senza principio attivo o con principi attivi differenti da quanto dichiarato. I campioni contraffatti sono stati spediti sia dall'Europa (Bulgaria, Francia e Italia) che dalla Cina. La Tabella 2 riassume i risultati della prima fase dello studio AIFA/WHO.

Tabella 2. Risultati della prima fase dello studio AIFA/WHO

Medicinali	Medicinali pervenuti	Medicinali autentici		Medicinali contraffatti		Copie illegali	
	<i>n.</i>	<i>n.</i>	<i>provenienza</i>	<i>n.</i>	<i>provenienza</i>	<i>n.</i>	<i>provenienza</i>
Sildenafil	8	-	-	1	Francia (Parigi)	7	India
Tadalafil	6	-	-	2	Cina Italia (Roma)	4	India
Vardenafil	4	1	UK	-	-	3	India
Metenolone enantato	1	-	-	1	Bulgaria (Burgas)	-	-
Totale	19	1 (5%)	-	4 (21%)	-	14 (74%)	

6. PROCEDURA OPERATIVA SUL RITROVAMENTO SOSPETTO DI FARMACI E SCHEDA PER L'ANALISI VISUALE

L'analisi visuale di un campione è il primo passo per evidenziare un farmaco falso. La WHO suggerisce una serie di osservazioni da effettuare sul confezionamento primario e secondario per capire se il farmaco può essere contraffatto (1-2).

Il Reparto Qualità dei Farmaci di Origine Chimica del Dipartimento del Farmaco dell'ISS ha redatto, sulla base delle Direttive Europee sui medicinali e di documenti ufficiali della USP e della WHO, una Procedura Operativa sul ritrovamento sospetto di farmaci, che è stata poi portata allo studio e approvata da *IMPACT Italia*.

La procedura prevede uno schema operativo da applicare da parte dei Carabinieri NAS nel caso di ritrovamento sospetto di farmaci. All'interno di questo schema operativo è prevista un'analisi visuale del campione e una analisi visuale comparativa con un campione di riferimento. Nel caso di sospetta contraffazione, la procedura prevede che il nucleo NAS di competenza debba informare del ritrovamento *IMPACT Italia* e, se del caso, inviare il campione all'ISS per analisi.

È previsto anche un eventuale contatto con la Ditta produttrice del medicinale autentico per il riconoscimento/disconoscimento del lotto rinvenuto.

L'analisi visuale è un tipo di indagine fondamentale per un primo screening dei campioni e permette di valutare immediatamente, in loco, una possibile contraffazione. È raro, infatti, che il medicinale contraffatto sia stato fatto così bene da essere identico nel suo confezionamento secondario, primario e nella sua forma farmaceutica al campione originale. Il tipo di scritte, il loro carattere, le dimensioni, il colore; il materiale del confezionamento; l'aspetto del prodotto (colore, dimensione e forma delle compresse; colore e viscosità di un liquido) sono elementi molto caratteristici che difficilmente possono essere riprodotti perfettamente da un contraffattore. Il logo della Ditta farmaceutica e l'ologramma sono ugualmente elementi caratteristici. Proprio per permettere agli investigatori di effettuare il confronto con i loghi originali delle Ditte titolari di AIC (Autorizzazione all'Immissione in Commercio), in Italia è stata sviluppata dall'Unità Informatica del Dipartimento del Farmaco dell'ISS una banca dati dei loghi ad accesso riservato, utile per l'analisi visuale di un campione sospetto. I dettagli informatici sulla banca dati sono riportati nel capitolo 7.

Anche per l'analisi visuale è spesso necessario l'ausilio di strumentazione, ad esempio per effettuare foto digitali e ingrandire particolari per poter fare un confronto puntuale delle scritte o dei loghi e ologrammi, oppure per analizzare la tonalità dei colori. La Procedura Operativa Standard e la relativa scheda di valutazione dell'analisi visuale servono appunto per eseguire un'analisi visuale standardizzata che permetta di non trascurare nessun elemento importante per la valutazione di un campione.

In Appendice si riporta la scheda di valutazione per l'analisi visuale di un campione elaborata dall'ISS.

7. ARCHIVIAZIONE DELLE IMMAGINI PER UNA BANCA DATI DEI LOGHI DELLE DITTE FARMACEUTICHE

7.1. Premessa

In un panorama così delicato come quello della contraffazione farmaceutica, che non riguarda solo l'oggetto farmaco, ma anche la riproduzione del logo della Ditta farmaceutica produttrice, è stato necessario porre estrema cautela nello sviluppare un'applicazione che garantisca la protezione e il reperimento del dato sotto forma di immagine. Di conseguenza, anche la fruizione e la navigabilità all'interno dell'applicazione hanno dovuto tenere conto dell'erogazione di tutta una serie di informazioni a corollario dell'immagine stessa, al fine di poter soddisfare le varie esigenze investigative scientifico-legali.

7.2. Messa in sicurezza delle immagini

Prima di addentrarsi in modo approfondito nell'argomento, è opportuno fare un breve cenno riguardo alla messa in sicurezza dei file di immagine e alla loro persistenza. Infatti, per raggiungere questa finalità è innanzitutto necessario disporre di un database relazionale (sistema di contenimento e gestione dati strutturato in modo da preservare le reali relazioni dei dati) e di un linguaggio di programmazione che sfrutti il paradigma della programmazione ad oggetti e che abbia in dotazione una buona libreria grafica ("espansione" per un linguaggio di programmazione che aggiunge delle funzionalità per lavorare le immagini). Per quest'ultimo prerequisito i migliori linguaggi hanno un oggetto, generalmente chiamato *Image*, che possiede in dotazione un set di funzioni che lavorano direttamente con i pixel di un'immagine. Questi ultimi, come già accennato nella premessa, sono la parte costituente dell'immagine digitale, la quale può essere concepita come entità equivalente ad una griglia della quale i pixel rappresentano le singole celle definendo proprietà come il colore, la luminosità, ecc. Una volta ottenuto l'indispensabile è possibile salvare il file nella banca dati trattandolo nel modo seguente:

1. Il file deve essere trattato e caricato presso la memoria volatile del computer che esegue l'elaborazione, in "gergo" si dice che viene trasformato in un oggetto.
2. L'oggetto deve essere criptato utilizzando dei buoni algoritmi* che sono proprio adibiti a questo scopo.
3. L'oggetto può essere salvato in un campo binario** del database. Questo particolare campo ha la peculiarità di non esporre in chiaro le informazioni dell'oggetto.

Per riottenere l'immagine originale è sufficiente eseguire le fasi sopra descritte in ordine inverso:

1. L'oggetto immagine salvato nel database deve essere caricato nella memoria volatile del computer.

* Sequenza logica di istruzioni elementari (univocamente interpretabili) che, eseguite in un ordine stabilito, permettono la soluzione di un problema in un numero finito di passi.

** Rappresenta un tipo di dato che funge da contenitore di sequenze di numeri scritti adottando il sistema numerico binario, il quale è direttamente interpretabile dal computer.

2. L'oggetto deve essere decriptato utilizzando lo stesso algoritmo utilizzato per la fase di criptaggio.
3. L'oggetto viene costruito e inviato al terminale video.

7.3. Inserimento di un *watermark*

Questa operazione rimane ancora attinente alle procedure impiegate per rendere inviolabile l'originale, permettendo l'inclusione su di un'immagine di un marchio (anch'esso è un'immagine) che garantisca l'invulnerabilità, in quanto impedisce il riutilizzo dell'immagine nella sua connotazione originale. Tale processo è di seguito schematizzato, tenendo conto di conoscere i fondamenti del linguaggio di programmazione che si intende utilizzare per lo scopo:

1. L'immagine viene estratta dal database e trasformata in un oggetto.
2. Successivamente viene creato un secondo oggetto immagine che, tramite le funzionalità che espone, dovrebbe essere impostato con un grado di opacità basso, in modo da risultare trasparente.
3. Sempre tramite le proprietà intrinseche dell'oggetto è possibile sovrapporre la seconda immagine trasparente sull'originale, ottenendo così un file con copyright.

7.4. Il progetto applicato

L'unità informatica del Dipartimento del Farmaco partendo da queste basi ha realizzato un software web in grado di gestire una libreria di immagini accessibile solo ad utenti autorizzati. Tale sistema, sfruttando quanto descritto nella sezione 7.2, provvede a memorizzare ogni singolo file di immagine modificandone la natura originale, al fine di proteggere tale file da eventuali sottrazioni o violazioni della base dati.

Tenuto conto di ciò, ogni volta che l'utente effettua una richiesta di visualizzazione del file, l'immagine estratta dal database viene decifrata al momento, per poi essere subito elaborata per la sovrapposizione di un *watermark* predefinito. Quest'ultimo passo rende praticamente nulle le possibilità di riutilizzare il file senza il marchio del copyright, quindi senza protezione. Infine, entrando nel dettaglio, l'immagine presentata all'utente non necessariamente viene trattata come immagine, ma avvalendosi della capacità di controllare i suoi connotati atomici, è possibile ricreare a video una struttura che ne contiene tutti i pixel innalzandone il livello di interazione per ciò che riguarda una possibile manipolazione che debba essere svolta a posteriori.

7.5. Possibili utilizzi del sistema

La possibilità di analizzare l'immagine avvalendosi della scomposizione della stessa nelle sue parti basilari, i pixel, apre scenari d'impiego vasti. Infatti, basti pensare che sarebbe possibile ottenere da una qualsiasi foto la percentuale di presenza di una gamma definita di un colore. Ad esempio, è possibile definire la gamma delle tonalità di blu e cercare con questo metodo tutti i pixel che corrispondono all'intervallo della gamma definita, al termine di questo è possibile eseguire delle elaborazioni e ricavare la percentuale di riscontro. Questo potrebbe essere utile per isolare porzioni dell'immagine oppure fare delle ricerche cromatiche.

Per quanto riguarda quest'ultimo aspetto, è preferibile limitare la ricerca, perché sarebbe molto difficile svolgere ricerche "semantiche" come ad esempio utilizzando la parola prato per ricercare quelle foto che hanno una prevalenza delle diverse tonalità di verde. Ovviamente il problema di questo sistema è dovuto al fatto che il computer, almeno per ora, non è in grado di andare oltre la mera analisi oggettiva delle entità rappresentate nelle foto, infallibile rispetto alle facoltà visive dell'uomo, ma totalmente insufficiente per valutare se il verde appartenga a un prato o alla carrozzeria di un'automobile. Altro metodo di utilizzo potrebbe essere quello di poter svolgere un confronto tra foto per stabilire la loro similitudine, indicando il grado percentuale di corrispondenza. Infatti, tale operazione verrebbe svolta dopo un processo di ridimensionamento dell'immagine più grande portandola alle dimensioni di quella più piccola e, in seguito effettuando il confronto pixel per pixel e includendo, se necessario, anche le gamme delle tonalità del pixel in questione. Concludendo, è opportuno annoverare un ultimo modo d'impiego che consiste nel selezionare un'area d'interesse di un'immagine e modificarne il valore cromatico per ottenere un'evidenza in contrasto.

7.6. Conclusioni

Nel panorama informatico odierno non è raro imbattersi in software commerciali, oppure gratuiti, capaci di gestire a più livelli di complessità l'elaborazione delle immagini. Ma nessuno di questi strumenti possiede le capacità per manipolare le "molecole base", i pixel, che strutturano un'immagine visibile su qualsiasi terminale video. L'obiettivo del nostro lavoro è stato quello di tradurre i bisogni progettuali in applicazioni informatiche idonee.

8. ATTIVITÀ DI INFORMAZIONE E FORMAZIONE SULLA CONTRAFFAZIONE

Uno degli obiettivi di *IMPACT Italia* è quello di fare formazione e informazione sul fenomeno della contraffazione farmaceutica. I membri di *IMPACT Italia* dell'ISS hanno pertanto contribuito alle attività di formazione svolgendo seminari sull'argomento. In particolare sono stati svolti corsi di formazione per i Carabinieri NAS, per le Forze di Polizia e Carabinieri (nell'ambito del Programma Operativo Nazionale "Sicurezza per lo sviluppo del Mezzogiorno d'Italia", 2008, Reggio Calabria e Catanzaro), per l'Agenzia delle Dogane (2009, Roma, Milano e Bari); lezioni in master universitari; seminari organizzati da alcune associazioni di categoria e per altre occasioni in cui era stato richiesto un approfondimento sul tema (Simposio AFI e AFTI, 2008, Lugano; Corso organizzato dalla Società Italiana di Andrologia, 2009, Genova; Marchi, Brevetti e Contraffazione, 2008, Milano; SANIT 2008, Roma; Seminario di formazione interna organizzato dal CRIVIB dell'ISS, 2009, Roma).

Nel 2007 è stato realizzato un sito Internet sulla contraffazione farmaceutica all'interno del sito dell'ISS (<http://www.iss.it/faco/>) proprio per informare il cittadino sulla problematica della contraffazione farmaceutica.

Alla fine del 2009 è iniziata una campagna di comunicazione sul fenomeno della contraffazione farmaceutica e sui rischi legati all'acquisto di farmaci on-line e, in generale, da canali non autorizzati. La campagna, promossa da *IMPACT Italia* e lanciata dal Ministero della Salute in collaborazione con l'Agenzia Italiana del Farmaco, con l'Istituto Superiore di Sanità e il Comando Carabinieri per la tutela della Salute, ha prodotto un poster e un pieghevole inviati a tutte le farmacie italiane e agli esercizi commerciali abilitati alla vendita di farmaci e ha portato all'apertura di un sito Internet governativo progettato e realizzato da personale dell'ISS (www.impactitalia.gov.it).

8.1. Il sito governativo

Per la realizzazione del sito Internet è stato indispensabile effettuare un'analisi accurata del tipo di soluzione informatica da adottare, che prendesse in esame sia finalità prettamente divulgative che collaborative. La miglior risposta tecnologica è stata quella di sviluppare un'applicazione modulare in grado di poter aggregare le informazioni e renderle fruibili in maniera organizzata, secondo criteri di accesso determinati dalla tipologia di utente finale e sulla base del ruolo ricoperto all'interno del gruppo di lavoro.

Per quanto concerne il primo aspetto, cioè quello divulgativo, si è provveduto prima a registrare presso il CNIPA (Centro Nazionale per l'Informatica nella Pubblica Amministrazione) il dominio *IMPACTITALIA.GOV.IT* e, successivamente, si è dato inizio alle fasi di sviluppo grazie alle competenze del Settore Informatico dell'ISS. Il sito in oggetto presenta una serie di aree e di contenuti e tiene conto di una platea eterogenea di visitatori. A questi aspetti prettamente contenutistici è stato necessario aggiungere due moduli di accesso online per la creazione di due sportelli telematici ("L'esperto risponde" e "Segnalazioni"), che forniscono il vero collegamento tra il visitatore e le istituzioni. In entrambi gli sportelli si utilizza un modulo web che permette di reperire, in base alla tipologia di richieste, informazioni che vengono convogliate e raccolte in un sito collaborativo che permette a tutti i membri del gruppo di lavoro di *IMPACT Italia* di accedere ai dati, condividere documenti e dare seguito

(documentandolo) alle richieste del cittadino sulla base di un flusso di lavoro predeterminato. Parallelamente al progetto del sito pubblico si è costruito il sito collaborativo, in risposta alla seconda esigenza progettuale (la collaborazione tra i membri di *IMPACT Italia*). Realizzato con tecnologia *3 Layer Engine* è in grado di armonizzare i vari strati di software (*Presentation – Business Logic – Data object*) interconnettendoli tra loro. L'impiego di questa specifica tecnologia software è stato deciso sulla base delle possibili variazioni del flusso di lavoro, al fine di poter intervenire in maniera diretta sui singoli strati interessati, senza compromettere il funzionamento dell'intera applicazione. Una delle funzionalità in esso contenute è un sistema di notifica a mezzo mail: ogni volta che il dato viene acquisito dai vari moduli online presenti nel sito pubblico, avviene congiuntamente al salvataggio la notifica a mezzo mail a tutti i membri del gruppo di lavoro. Onere del flusso di lavoro è concertare tutte le varie azioni successive alla notifica, non solo evitando eventuali sovrapposizioni di competenze, ma anche realizzando una base dati documentale. L'idea di attivare un network collaborativo è stata d'obbligo per creare un sistema integrato di gestione del dato e creare i presupposti per un metodo diverso di lavoro, dove l'informazione in tutti i suoi aspetti (dato archiviato, documento, link, mail, ecc.) diviene un bene condiviso per il raggiungimento dei risultati di un gruppo di lavoro.

BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. *Counterfeit drugs. Guidelines for the development of measures to combat counterfeit drugs*. Geneva: WHO; 1999. Disponibile all'indirizzo <http://www.who.int/medicines/publications/counterfeitguidelines/en/index.html>; ultima consultazione 4/2/2010.
2. International Council of Nurses. *Counterfeit kill. Nurses target counterfeit medicines*. Geneva: International Council of Nurses; 2005.
3. World Health Organization. *Substandard and counterfeit medicines (Fact Sheet no. 275)*, Geneva: WHO; 2003. Disponibile all'indirizzo <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs275/en/>; ultima consultazione 4/2/2010.
4. Shakoor O, Taylor RB, Behrens RH. Assessment of the incidence of substandard drugs in developing countries. *Trop Med Int Health* 1997;2:839-45.
5. Pinel J, Varaine F, Fermon F, Marchant G, Marioux G. Des faux vaccins anti-meningocoque lors d'une epidemie de meningite au Niger. *Med Maladies Infect* 1997;27:1-563.
6. World Health Organization. Fake drugs: a scourge on the system. *WHO Drug Inf*. 1995;9:127-9.
7. Singh J, Dutta AK, Khare S, *et al*. Diethylene glycol poisoning in Gurgaon, India, 1998. *Bull WHO* 2001;79(2):88-95.
8. Bogdanich W, Hooker J. From China to Panama, a trail of poisoned medicine. *The New York Times* (Published: May 6, 2007). Disponibile all'indirizzo <http://www.nytimes.com/2007/05/06/world/americas/06poison.html>; ultima consultazione 4/2/2010.
9. Ahmad K. Antidepressants are sold as antiretrovirals in DR Congo. *The Lancet* 2004;363:713.
10. Dondorp AM, Newton PN, Mayxay M, Van Damme W, Smithuis FM, Yeung S, Petit A, Lynam AJ, Johnson A, Hien TT, McGready R, Farrar JJ, Looareesuwan S, Day NPJ, Green MD, White NJ. Fake antimalarials in Southeast Asia are a major impediment to malaria control: multinational cross-sectional survey on the prevalence of fake antimalarials. *Trop Med Int Health* 2004;9:1241-6.
11. Rozendaal J. Fake antimalarial drugs in Cambodia. *The Lancet* 2001;357:890.
12. McGinnis M. *Matrix of drug quality reports affecting USAID-assisted Countries by the U.S. Pharmacopeia Drug Quality and Information Program*. Rockville: United States Pharmacopeial Convention Inc.; 2008. Disponibile all'indirizzo: http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNADL275.pdf; ultima consultazione 18/6/2010.
13. USP. *Fake antimalarials found in Yunnan Province, China*. Rockville: United States Pharmacopeia 2004.
14. Capell K, Timmons S, Wheatley J, Dawley H. What's in that pill? In Latin America, fake drugs are as lucrative as cocaine. *Bloomberg Businessweek* June 18, 2001. Disponibile all'indirizzo: http://www.businessweek.com/magazine/content/01_25/b3737153.htm; ultima consultazione 23/6/2010.
15. Laserson KF, Kenyon AS, Kenyon TA, Layloff T, Binkin NJ. Substandard tuberculosis drugs on the global market and their simple detection. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;5(5):448-54.
16. Counterfeit drugs spreading in Kyrgyzstan. *Scrip World Pharmaceutical News* 2004;2942:20.
17. Association of International Pharmaceutical Manufacturers. *AIPM position paper. Counterfeit drugs in Russia*. Moscow: AIPM; 2001.
18. Russia in new crackdown on counterfeits. *Daily International Pharma Alert* 2005;2(250).

19. Manna L, Valvo L. Development and validation of a fast reversed-phase ion-pairing liquid chromatographic method for simultaneous determination of eight cephalosporin antibiotics in pharmaceutical formulations. *Chromatographia* 2004;60:645-9.
20. Gaudiano MC, Di Maggio A, Antoniella E, Valvo L, Bertocchi P, Manna L, Bartolomei M, Alimonti S, Rodomonte AL. An LC method for the simultaneous screening of some common counterfeit and sub-standard antibiotics. Validation and uncertainty estimation. *J Pharm Biomed Anal* 2008;48:303-9.
21. United States Pharmacopeia. *USP 29. NF 24. The official compendia of standards*. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, Inc.; 2006.
22. Gaudiano MC, Antoniella E, Bertocchi P, Valvo L. Development and validation of a reversed-phase LC method for analysing potentially counterfeit antimalarial medicines. *J Pharm Biomed Anal* 2006;42:132-5.
23. Gaudiano MC, Di Maggio A, Cocchieri E, Antoniella E, Bertocchi P, Alimonti S, Valvo L. Medicines informal market in Congo, Burundi and Angola: counterfeit and sub-standard antimalarials. *Malaria Journal* 2007;6(22):1-9.
24. Labbozzetta S, Valvo L, Bertocchi P, Alimonti S, Gaudiano MC, Manna L. focused microwave-assisted extraction and LC determination of ketoprofen in the presence of preservatives in a pharmaceutical cream formulation. *Chromatographia* 2009;69:365-8.
25. Labbozzetta S, Valvo L, Bertocchi P, Manna L. Focused microwave-assisted extraction and LC determination of the active ingredient in naproxen-based suppositories. *J Pharm Biomed Anal* 2005;39:463-8.
26. Berger S, Braun S. *200 and more NMR experiments – A practical course*. 3rd ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2004.
27. Wawera I, Pisklaka M, Chilmonczyk Z. ¹H, ¹³C, ¹⁵N NMR analysis of sildenafil base and citrate (Viagra) in solution, solid state and pharmaceutical dosage forms. *J Pharm Biomed Anal* 2005;38:865-70.

APPENDICE

**Scheda messa a punto dall'ISS
per l'analisi visuale di un campione sospetto**



**Scheda di valutazione
per l'analisi visuale di un campione sospetto**

Nome commerciale del campione:

Nome del principio/i attivo/i:

Forma farmaceutica:

Dosaggio:

Titolare di AIC e/o Produttore:

N. di lotto:

Data di scadenza:

Numerosità del campione rinvenuto (confezioni/unità):

Tipologia di ritrovamento sospetto:

- venditori non autorizzati
- attività investigative
- capannoni o container abbandonati
- presso privati che non possono spiegarne la provenienza
- trasporto senza documentazione o con documentazione falsa
- sequestro alla dogana
- controllo di routine
- altro (specificare)

Confezionamento		
		si no
Il confezionamento primario e la sua chiusura sono tali da garantire la protezione del farmaco dall'esterno? NOTE:		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Il confezionamento primario è sigillato correttamente? NOTE:		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Il confezionamento e la chiusura sono di tipo e dimensioni appropriati per il prodotto medicinale? NOTE:		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

Etichettatura			
		si	no
L'etichettatura è in lingua italiana? NOTE:		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Le parole "lotto" e "data di scadenza" (riportata come mese/anno) sono in italiano? NOTE:		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Le indicazioni sul contenitore primario sono stampate su un'etichetta che aderisce interamente al contenitore? NOTE:		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Le etichette sono attaccate correttamente? (osservare se sono leggermente storte, non attaccate uniformemente, facilmente staccabili dal contenitore, parzialmente sovrapposte) NOTE:		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Le informazioni sul confezionamento secondario sono coerenti con quelle del confezionamento primario? (osservare in particolare il n. di lotto e la data di scadenza) NOTE:		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tutte le informazioni sui confezionamenti primario e secondario sono leggibili e indelebili? NOTE:		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ci sono errori nell'etichettatura? (errori ortografici, errori nelle unità di misura, errori in parole tecnico-farmaceutiche o mediche)? NOTE:		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
È riportato il codice a barre sul confezionamento secondario? NOTE:		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sono presenti sul confezionamento secondario o primario le seguenti informazioni? <ul style="list-style-type: none"> ▪ Denominazione commerciale del medicinale ▪ Dosaggio ▪ Composizione quali-quantitativa delle sostanze attive ▪ Forma farmaceutica ▪ Modalità e, se necessario, via di somministrazione ▪ Avvertenza speciale che prescriva di tenere fuori dalla portata dei bambini ▪ Il numero di lotto ▪ La data di scadenza (mese/anno) ▪ Il nome e l'indirizzo del titolare dell'AIC (o del suo rappresentante legale) ▪ Il numero di AIC 		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Sono presenti sul blister (compresse o capsule) le seguenti informazioni? <ul style="list-style-type: none"> ▪ Denominazione commerciale del medicinale Il nome del titolare dell'AIC ▪ La data di scadenza (mese/anno) ▪ Il numero di lotto NOTE:		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

Nome commerciale del farmaco		
		si no
Il nome commerciale del farmaco è scritto correttamente? NOTE:		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Il nome del farmaco è registrato in Italia? NOTE:		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Il farmaco è venduto in farmacie o in siti autorizzati alla vendita di farmaci? NOTE:		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Nome del principio attivo		
		si no
Il nome del principio attivo è scritto correttamente? NOTE:		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Il nome commerciale del farmaco e il nome del principio attivo corrispondono al farmaco registrato in Italia? NOTE:		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Nome del titolare di AIC e logo		
		si no
Il nome del Titolare dell'AIC esiste? NOTE:		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Corrisponde al Titolare di AIC che ha avuto l'autorizzazione all'immissione in commercio? NOTE:		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
È riportato l'indirizzo completo del Titolare di AIC? NOTE:		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
L'indirizzo del Titolare di AIC è corretto? NOTE:		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
È riportato il n. di AIC? NOTE:		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Il n. di AIC è corretto? NOTE:		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Il medicinale è attualmente commercializzato in Italia da questo Titolare di AIC? NOTE:		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Il logo disegnato sul confezionamento secondario è uguale a quello del confezionamento primario? NOTE:		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Se presente, l'ologramma cambia colore se osservato da diverse angolature? NOTE:		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

Dosaggio			
		<i>si</i>	<i>no</i>
Il dosaggio (contenuto di principio attivo espresso quantitativamente per unità di volume, di peso o di somministrazione) è chiaramente indicato sul confezionamento secondario o, in mancanza, su quello primario? NOTE:		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ci sono discordanze tra le indicazioni del confezionamento primario e secondario? NOTE:		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Il dosaggio indicato è stato autorizzato in Italia? NOTE:		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Forma farmaceutica e numero di unità			
		<i>si</i>	<i>no</i>
La forma farmaceutica è registrata e autorizzata in Italia? NOTE:		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Il contenuto in volume, peso o unità di somministrazione è chiaramente indicato sul confezionamento secondario o, in mancanza, su quello primario? NOTE:		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Il numero di unità di somministrazione indicato sul confezionamento secondario è coerente con quello indicato sul confezionamento primario? NOTE:		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Il numero reale di unità di somministrazione è coerente con quanto indicato sul confezionamento? NOTE:		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Numero di lotto e data di scadenza			
		<i>si</i>	<i>no</i>
Il numero di lotto e la data di scadenza sono stampati in modo leggibile e indelebile sia sul confezionamento primario che secondario? NOTE:		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Il numero di lotto e la data di scadenza riportati sul confezionamento primario sono coerenti con quelli riportati sul confezionamento secondario? NOTE:		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Il farmaco è scaduto? NOTE:		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Foglietto illustrativo			
		<i>si</i>	<i>no</i>
È presente il foglietto illustrativo? NOTE:		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
È in lingua italiana? NOTE:		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, luglio-settembre 2010 (n. 3) 4° Suppl.