



**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ  
PIANO ATTIVITÀ 2012-2014**

**Attività di ricerca,  
di controllo, valutazione e parere**

**Vol. 2**

Istituto Superiore di Sanità.

**Istituto Superiore di Sanità. Piano Attività 2012-2014. Attività di ricerca, di controllo, valutazione e parere. Vol. 2.**

2012, iii, 810 p.

Il presente Piano Attività 2012-2014 è costituito da tre volumi. Il primo volume contiene un quadro di riferimento sul contesto organizzativo e normativo dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), illustra sinteticamente la programmazione delle sue attività di ricerca, controllo, consulenza e formazione suddivise per Dipartimenti, Centri e Servizi e fornisce un quadro sintetico di tali attività nel triennio precedente (2009-2011). Il secondo volume presenta le linee di ricerca e le attività di controllo per il triennio 2012-2014 suddivise per Dipartimenti, Centri e Servizi. Il terzo volume riporta in elenco alfabetico le pubblicazioni dei ricercatori dell'ISS prodotte nel triennio 2009-2011.

*Parole chiave:* Istituto Superiore di Sanità, Relazioni triennali, Sanità pubblica

Istituto Superiore di Sanità

**Istituto Superiore di Sanità. Activity Plan 2012-2014. Research, control and evaluation activity. Vol. 2.**

2012, iii, 810 p. (in Italian)

This Plan 2012-2014 of the Istituto Superiore di Sanità (ISS, the National Institute of Health in Italy) is published in three volumes. The first volume contains a description of the organizing and normative structure of the ISS, and the planning of its activity in research, control, expertise and education divided into Departments, Centres and Services, and gives a brief outlook of these activities performed in the previous three year period (2009-2011). The second volume offers the research and the control activity for 2012-2014 divided into Departments, Centres and Services. The third volume contains the alphabetical list of the bibliographic references of the publications of ISS scientists in 2009-2011.

*Key words:* Triennial reports, Istituto Superiore di Sanità, Public health

Questa relazione è stata realizzata con la preziosa collaborazione di Cristina D'Addazio, Fabiola Giuliano (Presidenza) e Paolo Roazzi (Servizio Informatico, Documentazione, Biblioteca ed Attività Editoriali).

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it).

---

© Istituto Superiore di Sanità

*Coordinamento redazionale:* Paola De Castro e Sandra Salinetti (Settore Attività Editoriali)

# INDICE

<b>Lista degli acronimi</b> .....	iii
<b>Dipartimento Ambiente e connessa prevenzione primaria</b>	
Attività di ricerca .....	1
Attività di controllo, valutazione, parere .....	67
<b>Dipartimento Biologia cellulare e neuroscienze</b>	
Attività di ricerca .....	83
Attività di controllo, valutazione, parere .....	147
<b>Dipartimento Ematologia, oncologia e medicina molecolare</b>	
Attività di ricerca .....	155
Attività di controllo, valutazione, parere .....	183
<b>Dipartimento Farmaco</b>	
Attività di ricerca .....	191
Attività di controllo, valutazione, parere .....	233
<b>Dipartimento Malattie infettive, parassitarie e immunomediate</b>	
Attività di ricerca .....	243
Attività di controllo, valutazione, parere .....	353
<b>Dipartimento Sanità pubblica veterinaria e sicurezza alimentare</b>	
Attività di ricerca .....	373
Attività di controllo, valutazione, parere .....	435
<b>Dipartimento Tecnologie e salute</b>	
Attività di ricerca .....	445
Attività di controllo, valutazione, parere .....	493
<b>Centro nazionale AIDS per la patogenesi e vaccini contro HIV/AIDS</b>	
Attività di ricerca .....	505
Attività di controllo, valutazione, parere .....	531
<b>Centro nazionale Epidemiologia, sorveglianza e promozione della salute</b>	
Attività di ricerca .....	535
Attività di controllo, valutazione, parere .....	635
<b>Centro nazionale Malattie rare</b>	
Attività di ricerca .....	659
Attività di controllo, valutazione, parere .....	669

<b>Centro nazionale Sangue</b>	
Attività di ricerca .....	673
Attività di controllo, valutazione, parere .....	689
<b>Centro nazionale Sostanze chimiche</b>	
Attività di ricerca .....	695
Attività di controllo, valutazione, parere .....	707
<b>Centro nazionale Trapianti</b>	
Attività di ricerca .....	715
Attività di controllo, valutazione, parere .....	721
<b>Centro per la ricerca e la valutazione dei prodotti immunobiologici</b>	
Attività di ricerca .....	727
Attività di controllo, valutazione, parere .....	745
<b>Organismo notificato per i dispositivi medici e la valutazione dei cosmetici</b>	
Attività di ricerca .....	759
Attività di controllo, valutazione, parere .....	765
<b>Servizio biologico e per la gestione della sperimentazione animale</b>	
Attività di ricerca .....	769
Attività di controllo, valutazione, parere .....	773
<b>Servizio informatico, documentazione, biblioteca ed attività editoriali</b>	
Attività di ricerca .....	781
Attività di controllo, valutazione, parere .....	791
<b>Presidenza Ufficio relazioni esterne</b>	
Attività di ricerca .....	795
<b>Presidenza Unità di bioetica</b>	
Attività di ricerca .....	807

## LISTA DEGLI ACRONIMI

### *Dipartimenti*

<b>AMPP</b>	Ambiente e connessa prevenzione primaria
<b>BCN</b>	Biologia cellulare e neuroscienze
<b>EOMM</b>	Ematologia, oncologia e medicina molecolare
<b>FARM</b>	Farmaco
<b>MIPI</b>	Malattie infettive, parassitarie ed immunomediate
<b>SPVSA</b>	Sanità pubblica veterinaria e sicurezza alimentare
<b>TES</b>	Tecnologie e salute

### *Centri*

<b>CNAIDS</b>	Centro Nazionale AIDS per la patogenesi e vaccini contro l'HIV/AIDS
<b>CNE (o CNESPS)</b>	Centro Nazionale di epidemiologia, sorveglianza e promozione della salute
<b>CSC</b>	Centro Nazionale sostanze chimiche
<b>CRIVIB</b>	Centro per la ricerca e la valutazione dei prodotti immunobiologici
<b>CNMR</b>	Centro Nazionale Malattie Rare
<b>CNS</b>	Centro Nazionale Sangue
<b>CNT</b>	Centro Nazionale Trapianti
<b>ONDICO</b>	Organismo notificato per i dispositivi medici e la valutazione dei cosmetici

### *Servizi*

<b>SBGSA</b>	Servizio biologico per la gestione della sperimentazione animale
<b>SIDBAE</b>	Servizio informatico, documentazione, biblioteca ed attività editoriali

<b>URE</b>	Ufficio per le Relazioni Esterne
------------	----------------------------------



**Dipartimento**  
**Ambiente e connessa prevenzione primaria**

---

**Attività di ricerca**



## **Acquasense**

Il progetto selezionato nel quadro del Bando “Industria 2015 – Nuove Tecnologie per il Made in Italy” del Ministero dello Sviluppo Economico, prevede la realizzazione di un sistema innovativo per il monitoraggio capillare e in tempo reale della qualità dell'acqua potabile.

Il nuovo sistema integrerà un insieme di sensori aspecifici a concetto innovativo, un modello idrogeologico, un modello dei flussi di sostanze inquinanti all'interno del sistema di distribuzione dell'acqua e un sistema avanzato di gestione e supporto alla decisione.

Il Sistema Acquasense sarà implementato, testato e validato in laboratorio e presso aziende acquedottistiche e industrie del settore interessate alla validazione del sistema.

Una volta ultimato il Sistema Acquasense consentirà una serie di azioni quali:

- Possibilità di monitoraggio di sostanze inquinanti non rilevabili con metodi classici.
- Possibilità di misure vicine alla fonte di inquinamento.
- Generazione di allarmi in tempo reale; riduzione al minimo dei “falsi positivi”.
- Efficace supporto alla decisione con avvisi e suggerimenti per gli operatori; rappresentazione visiva dei dati georeferenziati attraverso un Sistema Territoriale Informativo di nuova concezione; la localizzazione delle sorgenti di inquinamento; la previsione dei flussi di sostanze inquinanti; simulazione di interventi correttivi.

### **Risultati attesi nel triennio**

Nel triennio tra i risultati previsti si attende:

- Redazione della metodologia di monitoraggio e valutazione del Ciclo Sperimentale, che sarà usata dai partner nel progetto pilota, con l'obiettivo ultimo di effettuare una valutazione indipendente della sonda multiparametrica sviluppata e delle sue funzionalità in un contesto sperimentale;
- Dimostrare le caratteristiche di prestazione e la funzionalità dei sensori nella determinazione semi-quantitativa di elementi chimici e cianotossine in acque da destinare e destinate al consumo umano, attraverso la definizione e l'implementazione di metodologia di valutazione *ad hoc*.

### **Trasferibilità dei risultati**

Oltre alle applicazioni nei sistemi di distribuzione idrica, le tecnologie sviluppate dal progetto si potranno impiegare anche per il monitoraggio ambientale su larga scala (monitoraggio dell'acqua marina, di fiumi e laghi, delle acque irrigue e degli effluenti industriali) e per il monitoraggio di liquidi impiegati dall'industria alimentare e da altre industrie manifatturiere.

Si prevede che il progetto creerà delle sinergie con un'ampia gamma di aziende ed enti di ricerca quali società di ingegneria impegnate nell'implementazione e gestione di grandi infrastrutture idriche, società di consulenza, aziende elettroniche e altre aziende manifatturiere, enti di ricerca specializzati nella tecnologia sensoristica.

## **Comunicazione del rischio in tema di analisi del rischio delle acque potabili**

Il progetto intende supportare la predisposizione dei contenuti in materia di acque destinate al consumo umano nell'ambito del portale nazionale acque elaborando informazioni scientificamente solide e aggiornate, dati validati, metodi e comunicazioni decisionali in fase di emergenza, nell'ambito di un progetto informativo finalizzato, nel suo insieme, ad orientare i comportamenti che possono incidere sulla salute e promuovere corretti stili di vita.

### **Risultati attesi nel triennio**

Nel triennio tra i risultati previsti si attende:

- Elaborazione e validazione dei contenuti del portale nazionale acque in materia di acque destinate al consumo umano al fine di promuovere la conoscenza sulla qualità delle acque in Italia, sulle azioni normative e di controllo che presiedono alla sicurezza d'uso delle acque potabili e sul loro impatto sulla salute. Inoltre, all'interno del "portale nazionale acque" saranno curati i seguenti aspetti correlati alla comunicazione, quali:
  - interazioni acqua e salute;
  - consumo delle acque nella filiera idrica, ruolo e azioni delle autorità sanitarie, basi normative europee e nazionali, fattori di rischio associati al consumo delle acque, utilizzo in sicurezza delle acque per la prevenzione di malattie idro-diffuse, acque di irrigazione e allevamento animale, sicurezza d'uso di nuovi dispositivi di trattamento domestico, stato di manutenzione delle reti idriche domestiche;
  - informazioni su processi di valutazione e gestione del rischio in caso di superamenti occasionali dei valori parametrici;
  - informazione sulle azioni del Ministero della Salute, dell'ISS e di altre istituzioni nella ricerca e prevenzione su rischi emergenti nel settore delle acque destinate al consumo umano.
- Sono revisionate sotto il profilo del linguaggio comunicativo nell'ambito del portale nazionale acque le modalità comunicative e il linguaggio utilizzato per le informazioni sui contenuti in materia di acque destinate al consumo umano.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati attesi sono direttamente trasferibili al Ministero, alle Autorità regionali e ai sistemi di gestione idrica, mediante diffusione sul web.

I risultati saranno inoltre diffusi mediante redazione di rapporti sullo stato di avanzamento del progetto, altre pubblicazioni in materia con differenti modalità di comunicazione (es. workshop, siti web).

## **Efficienza degli impianti di depurazione nel trattamento degli Interferenti Endocrini (IE)**

Obiettivo generale del progetto è il miglioramento dell'efficienza dei trattamenti depurativi applicati agli scarichi domestici/civili. I gestori del Servizio Idrico Integrato (SII) hanno infatti come obiettivo prioritario il mantenimento della qualità delle risorse idriche erogate, e in tal senso la loro attenzione è rivolta all'ottimizzazione degli impianti di trattamento e depurazione, e nel contempo alla salvaguardia dell'ambiente e delle risorse idriche utilizzate a scopo potabile. In tale contesto il progetto intende approfondire gli aspetti legati alla verifica dei livelli di IE nelle acque di depurazione.

Il progetto si avvarrà della collaborazione di rappresentanti di enti istituzionali operanti sul territorio, quali le Università di Genova e Trento e l'ISS, coinvolgendo inoltre le società attive nella gestione del SII.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Adattamento di un metodo di analisi per la quantificazione degli IE già messo a punto e pubblicato per le acque naturali;
- Applicazione di test biologici di estrogenicità e la realizzazione di un monitoraggio della durata di 18 mesi, presso alcuni impianti di depurazione italiani.

- Fornire ai gestori del SII uno strumento di indagine per verificare le performance dei propri impianti di trattamento nella rimozione degli IE;
- Avere a disposizione know-how e dati sulla presenza di IE nelle acque di depurazione al fine di contenere l'impatto di questi composti sull'ambiente circostante;
- Proteggere le risorse idriche naturali al fine di un loro utilizzo a scopo potabile.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati attesi sono direttamente trasferibili alle ai sistemi di gestione idrica, in forma, tra l'altro, di linee guida e moduli informativi e formativi da diffondere sul web.

È prevista inoltre la pubblicazione e condivisione con la comunità scientifica dei rapporti tecnici sull'andamento del progetto e sui risultati scientifici ottenuti.

### **Microcistine algali nelle acque destinate al consumo umano**

Il progetto prevede l'approfondimento, lo sviluppo e la diffusione delle tecniche analitiche attualmente in uso per la determinazione di microcistine algali nelle acque destinate al consumo umano e un monitoraggio mirato sulle più importanti risorse idriche del territorio nazionale.

Inoltre il progetto prevede il monitoraggio delle acque dei principali bacini italiani, in modo da avere a disposizione, valori reali di concentrazione delle tossine nelle acque italiane, e fornire ai gestori elementi conoscitivi per affrontare la problematica specifica.

Il progetto vuole inoltre concludere l'elaborazione di linee guida (avviata nel 2011) per la valutazione del rischio derivato dalla presenza di specie patogene nelle risorse idriche destinate a scopo potabile e continuare la messa a punto di metodi di analisi in *Polymerase Chain Reaction* (PCR) per specie di maggiore interesse.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- condividere e applicare criticamente il metodo di analisi per la determinazione delle tossine algali con i gestori degli acquedotti;
- monitoraggio di acque di approvvigionamento lacustri per valutare la presenza di tossine algali nella realtà nazionale;
- mettere a disposizione dei gestori di acquedotto di dati e modalità operative per la gestione del problema della presenza di tossine algali, anche in vista della recente pubblicazione delle Linee Guida da parte dell'ISS;
- verifica delle performance di abbattimento delle tossine algali da parte degli impianti in uso.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati attesi sono direttamente trasferibili alle ai sistemi di gestione idrica, in forma, tra l'altro, di linee guida e moduli informativi e formativi da diffondere sul web.

È prevista inoltre la pubblicazione e condivisione con la comunità scientifica dei rapporti tecnici sull'andamento del progetto e sui risultati scientifici ottenuti.

### **Sperimentazione del modello dei *Water Safety Plans* (WSP) per la valutazione e gestione del rischio nella filiera delle acque destinate al consumo umano**

Obiettivo del progetto è sperimentare il modello dei WSP per monitorare la qualità delle acque destinate al consumo umano per tutelare la Salute pubblica su *case study* specifici selezionati per la loro rappresentatività, generalizzabilità e trasferibilità ad altre Regioni italiane.

Per un'efficace gestione del rischio lungo la filiera idrica è infatti necessario il rafforzamento della collaborazione tra autorità sanitarie preposte ai controlli e alla sorveglianza e tutti coloro che operano nel settore dei servizi idrici (enti gestori, Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente – ARPA, Regioni, ISS). Risulta pertanto necessario sperimentare la capacità di integrarsi dei vari Soggetti (comunicazione efficace tra i soggetti) coinvolti nei WSP al fine di identificare i vari nodi della rete di collaborazione e verificarne il grado di utilità, la pertinenza, l'efficacia, in particolare alla luce dell'esito del referendum popolare che ha sancito il criterio della gestione pubblica della risorsa idrica.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Risultati attesi nel triennio sono:

- Migliorare le conoscenze attuali sull'uso delle acque destinate al consumo umano.
- Ottimizzare il monitoraggio delle acque destinate al consumo umano.
- Sorveglianza e monitoraggio (migliorare la qualità) delle acque destinate al consumo umano.
- Predisporre criteri gestionali uniformi per gli enti gestori.
- Promuovere l'uso corretto delle acque destinate al consumo umano e rendere disponibili le informazioni.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Particolare attenzione verrà data alla comunicazione del progetto e dei suoi risultati, data l'attenzione, presente a diversi livelli, verso la problematica delle acque potabili. In quest'ottica si inserisce la realizzazione di opuscoli come veicolo locale della comunicazione e lo sviluppo sperimentale dell'“Interfaccia” del sistema informativo “Aziende Sanitarie Locali Servizi Igiene Alimenti e Nutrizione – Progetto di Sistema Informativo Unificato” sulle Acque potabili della Regione Piemonte accessibile al cittadino/consumatore (favorire il processo di “Cittadinanza digitale” nei tre momenti di partecipazione, informazione, interazione) e ai diversi pubblici interessati (decisori, cittadini, tecnici e media) necessario per la complessità del tema e la ricchezza quantitativa dei dati da rendere pubblici.

### **Verifica apparecchi per il trattamento delle acque potabili**

Il progetto si propone di valutare il rischio igienico-sanitario correlato al consumo umano di acque trattate mediante caraffe filtranti diffuse in commercio, anche in relazione alle differenti tipologie di acque in distribuzione in Italia, al consumo di acque trattate nel lungo periodo e da parte di eventuali categorie a rischio.

A tal fine viene proposta una serie di azioni articolate in due fasi principali. Nella prima fase saranno definiti criteri e metodi per la valutazione delle specifiche tecniche e igienico-sanitarie delle caraffe filtranti comprendenti requisiti dei materiali a contatto con l'acqua trattata, modalità di studio sugli effetti prodotti dal trattamento su parametri microbiologici, chimico-fisici e chimici di potenziale impatto sulla salute; sarà definita la composizione dell'acqua tipo per le prove di filtrazione, la durata delle prove e pianificazione dei prelievi, sulla base delle istruzioni del produttore contemplando eventuali utilizzi impropri, e gli aspetti relativi ai metodi analitici.

Nella seconda fase si procederà ad una valutazione della sicurezza igienico-sanitaria di tipologie rappresentative di caraffe filtranti diffuse in commercio in Italia, anche in relazione alle differenti tipologie di acque in distribuzione, al consumo di acque trattate nel lungo periodo e da parte di eventuali categorie a rischio, mediante prove sperimentali condotte secondo i criteri e metodi prestabiliti su caraffe reperibili in commercio.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Risultati attesi nel triennio sono:

- Definizione di criteri e metodi per la valutazione delle specifiche tecniche e igienico-sanitarie delle caraffe filtranti comprendenti:
  - requisiti dei materiali a contatto con l'acqua trattata;
  - valutazione della sicurezza igienico-sanitaria dei dispositivi mediante uno studio sugli effetti prodotti dal trattamento su parametri microbiologici tra i quali eterotrofi a 22°C e *Pseudomonas aeruginosa*, e su parametri chimico-fisici e chimici tra cui quelli rilevati critici tra cui durezza, ioni idrogeno, ione ammonio, ferro, sodio, potassio, argento.
  - composizione dell'acqua tipo per le prove di filtrazione;
  - durata delle prove e pianificazione dei prelievi, sulla base delle istruzioni del produttore contemplando eventuali presumibili utilizzi impropri, quali conservazione a temperatura fuori specifica, permanenza dell'acqua trattata in caraffa per periodi prolungati e utilizzo del dispositivo oltre il termine prescritto da specifica;
  - metodi analitici.
- Valutazione della sicurezza igienico-sanitaria di tipologie rappresentative di caraffe filtranti diffuse in commercio sul territorio nazionale, anche in relazione al consumo di acque trattate nel lungo periodo e da parte di eventuali categorie a rischio, mediante prove sperimentali condotte secondo criteri e metodi prestabiliti (cfr. obiettivo 1).

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati attesi sono direttamente trasferibili al Ministero e alle Autorità regionali in forma di linee guida e moduli informativi e formativi da diffondere sul web da parte delle strutture sanitarie centrali e periferiche.

I risultati saranno inoltre diffusi mediante:

- redazione di rapporti sullo stato di avanzamento del progetto;
- rapporto su criteri e metodi per la valutazione delle specifiche tecniche e igienico-sanitarie delle caraffe filtranti;
- rapporto su valutazione della sicurezza igienico-sanitaria di tipologie rappresentative di caraffe filtranti diffuse in commercio sul territorio nazionale.

Sarà infine organizzato un workshop di presentazione dei risultati del progetto.

#### **Gestione del rischio correlato alla presenza di cianobatteri nella filiera idrica delle acque destinate al consumo umano captate dal lago di Vico**

Il progetto ha come obiettivo generale la gestione del rischio correlato alla presenza di cianobatteri nella filiera idrica delle acque destinate al consumo umano captate dal lago di Vico.

In tale contesto le attività previste riguardano:

- valutazione del rischio correlato ad eventuale presenza di cianobatteri e loro tossine nelle acque di origine, trattate e in distribuzione, da effettuarsi mediante un monitoraggio adeguato;
- supporto al comune nell'implementazione di misure di mitigazione dei rischi, in particolare sui processi operativi impiantistici in essere per l'abbattimento nelle acque in distribuzione nel comune di Caprarola;
- supporto al comune nelle attività di informazione e di comunicazione del rischio agli organi di vigilanza e alla popolazione interessata, anche mediante rapporti su siti web e incontri con i gruppi di interesse.

Le metodologie utilizzate si basano su metodiche ufficiali per le analisi delle acque, mediante approcci convenzionali e innovativi.

### **Risultati attesi nel triennio**

Risultati attesi nel triennio sono:

- Monitoraggio delle specie algali e ricerca di eventuali tossine nelle acque da destinare a consumo umano captate dal lago di Vico e di gestione dei rischi associati al consumo acque in distribuzione;
- Studio sulla presenza di cianobatteri e loro tossine nelle acque in entrata al sistema di potabilizzazione e una valutazione sistematica delle misure di mitigazione del rischio, in particolare i processi operativi impiantistici in essere per l'abbattimento delle tossine nelle acque in distribuzione nel comune di Caprarola;
- Monitoraggio del corpo idrico e dell'intera filiera di trattamento e distribuzione delle acque, anche a garanzia dell'efficacia dei trattamenti, secondo quanto previsto nei principi del WSP della *World Health Organization* (WHO).

### **Trasferibilità dei risultati**

Approfondimento e diffusione ad ARPA, Azienda Sanitaria Locale (ASL) e gestori idrici delle conoscenze nell'ambito delle problematiche connesse alla valutazione e gestione dei rischi sanitari associati alla presenza di cianotossine nelle acque interne, in particolare a quelle da destinare e destinate al consumo umano e per la sicurezza della filiera idropotabile.

Pubblicazione e condivisione con la comunità scientifica dei risultati scientifici ottenuti nell'ambito del progetto.

## **Gestione del rischio da cianobatteri e loro metaboliti nella filiera produttiva delle acque destinate al consumo umano: criteri e metodi di sorveglianza, allerta e risposta ad emergenze sanitarie**

Il progetto intende elaborare e validare un modello metodologico globale con possibile valenza regolatoria, adottabile dalle autorità sanitarie e dai sistemi di gestione idrica per l'implementazione di efficaci azioni di sorveglianza e gestione di emergenza relativamente alla contaminazione da cianobatteri e tossine in acque destinate a consumo umano, tenendo conto anche di altri utilizzi civili e agricoli.

In considerazione della natura delle problematiche da affrontare saranno utilizzate, l'approccio perseguito è di tipo multistadio, articolato in metodologie di sorveglianza e allerta, anche con l'ausilio di tecniche automatizzate di *early-warning*, e su differenti misure di gestione del rischio, funzionali al livello di contaminazione stimato nelle acque (livelli di allerta) e alle specifiche risorse del sistema di gestione idrica.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto si prefigge di:

- Verificare/sviluppare e validare sistemi innovativi di *early-warning* automatizzati per il controllo contestuale di parametri ambientali e biologici nei corpi idrici, finalizzati all'individuazione in tempo quasi-reale di proliferazioni anomale di alghe potenzialmente tossiche; campionamento analisi di screening e conferma per la determinazione di cianotossine in matrici ambientali ad utilizzo delle strutture di controllo sanitario e dei sistemi di gestione idrica.
- Sviluppare e validare metodi di mitigazione del rischio in fase di captazione e nei diversi processi del sistema idrico, fino alla fase di utenza, contestualmente alla valutazione di benefici e rischi diversi connessi agli stessi trattamenti, anche per quanto riguarda la formazione di sottoprodotti di disinfezione.
- Predisporre un modello metodologico con possibile valenza regolatoria direttamente applicabile dalle autorità sanitarie e negli attuali sistemi di gestione idrica, per l'implementazione coordinata delle azioni di prevenzione e risposta ad emergenze,

incluse le attività di formazione e la comunicazione del rischio. Il modello si baserà su informazioni validate mediante controlli ambientali e monitoraggi, verifiche dei metodi di risposta implementati in differenti realtà territoriali, risorse idriche e contesti impiantistici, confrontate con le indicazioni disponibili a livello internazionale.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati attesi sono direttamente trasferibili alle strutture sanitarie di controllo e ai sistemi di gestione idrica, in forma, tra l'altro, di linee guida e moduli informativi e formativi da diffondere sul web da parte delle strutture sanitarie centrali e periferiche.

È prevista inoltre la pubblicazione e condivisione con la comunità scientifica dei risultati scientifici ottenuti nell'ambito del progetto.

### **Messa a punto di soluzioni tecniche, impiantistiche o di gestione per la riduzione dell'arsenico nell'acqua distribuita dai gestori dell'Ambito Territoriale Ottimale (ATO) 1**

Le finalità generali del progetto consistono nell'individuazione e nella messa a punto di soluzioni tecniche, impiantistiche o di gestione utili alla riduzione del parametro arsenico presente nell'acqua distribuita dai diversi gestori dell'ATO 1 ad un costo sostenibile per l'utenza tenendo conto anche delle problematiche connesse al possibile superamento dei valori di concentrazione ammissibili per fluoro, vanadio e selenio.

Lo studio si articola nelle seguenti fasi:

- Fase 1: analisi delle problematiche con relativo monitoraggio (verifica e interpretazione);
- Fase 2: quantificazione dell'incidenza reale nei comuni e sulla popolazione interessata;
- Fase 3: analisi strategica delle soluzioni a confronto (trattamento; nuove adduzioni per miscelazioni; soluzioni miste) anche mediante l'adozione di impianti pilota o impianti a scala naturale in considerazione delle maggiori emergenze riscontrate;
- Fase 4: prima quantificazione degli interventi;
- Fase 5: valutazione della fattibilità tecnica delle soluzioni individuate per l'avvio della progettazione degli interventi con relativo reperimento delle risorse nel quadro di quanto previsto dal piano d'ambito e dalla LR 6/96 e succ. aggiornamenti e integrazioni.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Messa a punto di metodologie di analisi chimica per il monitoraggio di arsenico, fluoro, vanadio e selenio presenti in tracce nell'acqua potabile.
- Acquisizione di informazioni sulle caratteristiche chimiche e chimico-fisiche dell'acqua sotterranea da destinare al consumo umano della provincia di Viterbo.
- Individuazione di soluzioni tecniche, impiantistiche o di gestione utili alla riduzione dei livelli dei parametri arsenico, fluoro, vanadio e selenio nelle acque destinate al consumo umano all'interno dei limiti fissati dal DL.vo 31/2001.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Approfondimento e diffusione con ARPA, ASL e gestori idrici delle conoscenze nell'ambito delle problematiche connesse al possibile superamento dei valori di concentrazione ammissibili (DL.vo 31/2001).

Pubblicazione e condivisione con la comunità scientifica dei risultati scientifici ottenuti nell'ambito del progetto.

Sviluppo di un modello applicabile a risorse idriche da destinare al consumo umano per le quali sussistono sistematici superamenti dei valori di parametro.

**Studio per l'individuazione o messa a punto di criteri di analisi, soluzioni tecniche, impiantistiche o gestionali utili a risolvere le problematiche concernenti l'attuazione del DL.vo 31/2001 legato al rispetto di alcuni parametri in particolare a: clorito, arsenico, vanadio, bromato**

Il progetto ha come obiettivo generale l'individuazione e la messa a punto di criteri di analisi, soluzioni tecniche, impiantistiche o gestionali utili a risolvere specifiche problematiche concernenti l'attuazione del DL.vo 31/2001 per alcuni parametri quali clorito, arsenico, vanadio, bromato.

In particolare è previsto l'approfondimento di tematiche inerenti la revisione della direttiva 98/83/CE, la formazione di gruppi di lavoro sul tema dei WSP e le problematiche inerenti le zone di rispetto delle risorse idriche.

Lo studio è coordinato e condotto dal Reparto di Igiene delle acque interne dell'ISS, insieme a gruppi di lavoro *ad hoc* a cui afferiscono esperti dell'Istituto e responsabili della gestione di acquedotti.

**Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono identificabili con gli obiettivi sopra riportati. In particolare saranno elaborate linee guida e moduli informativi e formativi sulla valutazione e gestione dei rischi sanitari associati alle acque interne, in particolare a quelle da destinare e destinate al consumo umano e per la sicurezza della filiera idropotabile, sul tema dei WSP e sulle problematiche inerenti le zone di rispetto delle risorse idriche.

**Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti nell'ambito di questo progetto sono direttamente trasferibili alle strutture sanitarie di controllo e ai sistemi di gestione idrica, in forma, tra l'altro, di linee guida e moduli informativi e formativi da diffondere sul web da parte delle strutture sanitarie centrali e periferiche.

**Supporto al Ministero della Salute nelle attività centrali di area previste nel programma CCM 2010 con particolare riguardo al monitoraggio deroghe acque potabili e alla comunicazione**

Il progetto intende supportare il Ministero della Salute nelle attività centrali di area previste nel programma CCM 2010 con particolare riguardo al monitoraggio delle deroghe acque potabili e alla comunicazione.

Il progetto intende supportare e rafforzare le azioni del Ministero della Salute finalizzate ai piani di rientro delle deroghe in itinere e nella gestione di altre problematiche e non conformità transienti o prolungate correlate alla presenza d'inquinanti nelle acque da destinare e destinate al consumo umano.

Attività specifiche consisteranno nella verifica sugli interventi tecnici promossi da ATO e Regioni per il ripristino della conformità, nell'intensificazione delle azioni di confronto con le Regioni e la Commissione Europea (CE) per il regime di deroghe nel triennio 2010-2012, nell'ottimizzazione della comunicazione e informazioni fornite alla popolazione interessata. L'obiettivo finale è di risolvere le non conformità attualmente sottoposte a regime di deroga entro il termine del progetto (2012) e di fornire modelli gestionali adottabili nella gestione dei superamenti di valori parametrici.

Nello stesso contesto il progetto intende supportare il Ministero della Salute e le Autorità regionali con informazioni scientificamente solide, dati validati, metodi e comunicazioni decisionali in fase di emergenza, in materia di acque destinate al consumo umano, con modalità informative moderne, finalizzate ad orientare comportamenti che possono incidere sulla salute.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Monitoraggio deroghe acque potabili, comprendente, in particolare:
  - valutazione e aggiornamento dei piani di rientro e degli interventi tecnici promossi da ATO e Regioni incluso il monitoraggio del calendario di intervento e delle azioni correttive intraprese per il ripristino della conformità delle acque, e le attività di verifica su impianti di trattamento, sistemi di diluizione mediante nuove sorgenti di captazione ecc.;
  - rapporti con la CE per lo stato di avanzamento del rientro;
  - rapporti con Regioni e ATO per l'implementazione delle azioni di rientro;
  - informazione alla popolazione;
  - gestione di nuovi casi di non conformità al valore di parametro per i quali azioni correttive sufficienti a risolvere il problema possono essere implementate entro 30 giorni.
- Supporto alla elaborazione e validazione dei contenuti dell'informazione in materia di acque destinate al consumo umano. In particolare:
  - metodi e comunicazioni decisionali in fase di deroga, dati sul ripristino della conformità e altre emergenze idriche nel territorio;
  - contenuti sul significato sanitario dei diversi parametri chimici e microbiologici delle acque, impieghi delle acque nella produzione alimentare, gestione degli impianti di distribuzione domestica e di eventuali dispositivi di trattamento, aspetti normativi e corretta prassi igienica;
  - focus e domande poste frequentemente (*Frequently Asked Question*, FAQ) su questioni attuali in tema di promozione della salute e su questioni controverse quali le deroghe.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati attesi sono direttamente trasferibili al Ministero, alle Autorità regionali e ai sistemi di gestione idrica, in forma di linee guida e moduli informativi e formativi da diffondere sul web da parte delle strutture sanitarie centrali e periferiche.

I risultati saranno inoltre diffusi mediante redazione di rapporti sullo stato di avanzamento del progetto e sulla qualità delle acque sul territorio (con particolare riferimento al rientro nell'ambito delle deroghe) e informazioni correlate, evidenze oggettive del ripristino della conformità delle acque (es. relazioni regionali, verbali), altre pubblicazioni in materia con differenti modalità di comunicazione (es. workshop, siti web).

### ***μAQUA Universal microarrays for the evaluation of fresh-water quality based on detection of pathogens and their toxins***

I metodi tradizionali per il rilevamento di agenti patogeni in matrici acquose si basano sulla coltivazione, caratterizzazione biochimica e identificazione microscopica, sono laboriosi e richiedono tempi lunghi. Il progetto μAQUA mira a progettare un chip universale basato sulla tecnologia del *microarray* per la rilevazione di patogeni e patogeni emergenti (virus, batteri, protozoi e cianobatteri) e di valutare la qualità delle acque attraverso indicatori selezionati come ad esempio le diatomee. Inoltre prevede la messa a punto un chip

in grado di rilevare le tossine dei più diffusi cianobatteri.  $\mu$ AQUA mira inoltre anche ad individuare cianofagi in grado di controllare o ridurre la periodica fioritura di cianobatteri tossici nelle riserve di acque.

**Risultati attesi nel triennio:**

I risultati attesi sono:

- Strategie di mitigazione attraverso la ricerca di cianofagi.
- Standardizzazione dei metodi per la concentrazioni dei campioni e taratura dell'intensità di segnale del microchip.
- Multiplex basata su sensori di rilevamento della contaminazione di tossine in acque superficiali.
- Applicazione del chip basato sulla tecnologia microarray ai siti di monitoraggio.
- Diffusione e distribuzione del chip.

**Trasferibilità dei risultati**

Questi metodi molecolari innovativi rappresentano un utile strumento da utilizzare nel monitoraggio semi continuo per la valutazione della qualità delle acque. Nel complesso, queste tecnologie innovative ridurranno il fabbisogno energetico e miglioreranno le prestazioni di trattamento delle acque, consentiranno una gestione migliore, data dalla rapidità nella risposta, del rischio derivante da modifiche delle caratteristiche ambientali, comprese quelle climatiche, degli ecosistemi acquatici.

**Approcci metodologici per valutare l'esposizione alimentare a contaminanti tossico-persistenti attraverso stime della dose esterna: Total Diet Studies (TDS) e Duplicate Diets/Portions (DD)**

Lo studio si propone di sviluppare un approccio analitico-tossicologico di metodo che, prescindendo dagli specifici limiti di legge nelle singole derrate alimentari, valuti l'esposizione alimentare a contaminanti tossico-persistenti e metallo-organici nella popolazione italiana attraverso il cibo così come viene assunto, tenendo conto degli differenti apporti (compresa l'acqua), dell'origine e provenienza dell'alimento, e delle tecniche di preparazione, cottura, conservazione e distribuzione al piatto, e facendo riferimento ai valori guida di esposizione alimentare (*Tolerable Daily Intake*, TDI).

**Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Requisiti prestazionali dei laboratori che intendono analizzare pasti campionati nell'ambito di studi TDS e DD.
- Definizione degli ambiti in cui è consigliato eseguire TDS rispetto a DD, in Italia.
- Definizione delle incertezze associate alla stima di *intake* rispetto a metodi che si basano sulla elaborazione di dati di contaminazione a fini regolamentari nelle derrate alimentari. Studi di TDS e DD con particolare riferimento a contaminanti tossici persistenti e metallo-organici in differenti ambiti regionali, in Italia.

**Trasferibilità dei risultati**

I risultati prodotti saranno trasferiti alla committenza tramite report e *deliverable*. Quest'ultima avverrà mediante pubblicazioni scientifiche e organizzazione di eventi di formazione e dimostrativi.

### **Approccio integrato ai fini della valutazione del danno ambientale negli ecosistemi lacustri**

Lo scopo del presente progetto di studio è la valutazione ambientale degli ecosistemi lacustri di origine vulcanica nell'Italia centrale attraverso una gestione integrata tra approccio ecosistemico ed ecotossicologico, al fine di evidenziare possibili indicatori ecologici integrati che rispondono a specifici stress ambientali.

In tale contesto si prefissano differenti obiettivi di studio di seguito elencati:

- Analisi della diversità biologica attraverso lo studio della comunità diatomica, produttori primari e di quella macrobentonica, consumatori primari, dei laghi di origine vulcanica.
- Analisi dei parametri chimici, chimico-fisici e idromorfologici; inoltre verranno eseguite analisi microbiologiche sugli ecosistemi oggetto di studio.
- Valutazione degli stress ambientali attraverso batterie di saggi ecotossicologici multispecie.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto di ricerca verrà articolato in quattro fasi:

- Fase 1 (due mesi): verrà effettuata sia una ricerca bibliografica per individuare i siti oggetto di studio che i successivi sopralluoghi per definire le stazioni di campionamento.
- Fase 2 (14 mesi): prelievi dell'acqua per analisi chimiche, chimico-fisiche e microbiologiche ed esecuzione degli esami di laboratorio per la loro caratterizzazione; campionamenti delle comunità macrobentoniche e diatomiche; attività di laboratorio per lo smistamento e l'identificazione degli organismi campionati.
- Fase 3 (12 mesi):
  - Individuazione dei siti caratterizzati da forti stress ambientali
  - Applicazione dei test ecotossicologici multispecie
  - Analisi chimiche, chimico-fisiche e microbiologiche
  - Campionamento delle comunità macrobentoniche e diatomiche
- Fase 4 (otto mesi):
  - Elaborazione dei dati per la caratterizzazione ecologica dei siti oggetto di studio e per l'individuazione di possibili indicatori ecologici integrati che rispondano a specifici stress ambientali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Sperimentazione e validazione di metodologie per la valutazione della qualità degli ecosistemi lacustri tra attività di ricerca e prenormativa ai sensi della Direttiva Quadro 2000/60/CE.

### **Approccio integrato in ecosistemi fluviali connessi ad impianti di ittiocoltura intensiva**

L'ittiocoltura intensiva, da cui deriva la maggiore aliquota di produzione ittica d'allevamento in ambito nazionale, essendo sviluppata soprattutto nelle zone più sensibili degli alti corsi fluviali, può produrre esternalità negative di notevole intensità. Ciò può avvenire attraverso la diversione verso gli impianti di porzioni rilevanti del corso d'acqua interessato e, soprattutto, con la restituzione al fiume delle stesse acque "arricchite" di residui di mangimi e talvolta di chemioterapici.

Lo scopo di questo progetto è valutare gli effetti che i reflui degli impianti di ittiocoltura hanno sui corpi idrici recettori, attraverso l'analisi di indicatori biologici, microbiologici, ecotossicologici e parametri chimico e chimico fisici, a monte e a valle degli impianti.

### **Risultati attesi nel triennio**

Determinare gli effetti che gli impianti hanno sui corpi idrici recettori, valutare la qualità biologica dei sistemi fluviali oggetto di studio ai sensi della Direttiva 2000/60/CE.

### **Trasferibilità dei risultati**

Ampliare la conoscenza sugli impianti di itticoltura in Italia e fornire indicazione per una gestione ecosostenibile di questi impianti, seguendo anche le linee guida europee (“Code of conduct for responsible fisheries” e “Code of conduct of European aquaculture”).

## **Aspetti igienico-sanitari dei materiali di cui agli art. 31 e 75 del DPR 285/90**

Sono numerose le richieste di parere che pervengono dal Ministero della Salute su nuovi materiali (cartone, plastica, metallo ecc.), di cui agli art. 31 e 75 del DPR 285/90, proposti da ditte interessate all'autorizzazione a produrre e commercializzare manufatti in nuovi materiali.

In realtà con gli art. 31 e 75 del DPR 285/90, l'obiettivo è quello di:

- migliorare, sulla base del progresso tecnologico: le condizioni igienico-sanitarie, nella gestione della salma dal momento del decesso alla sepoltura e, successivamente, a seguito di operazioni di esumazione/estumulazione, lo smaltimento ultimo dei manufatti; la esposizione dei addetti ai lavori alle operazioni di esumazione/estumulazione; la protezione ambiente per quanto riguarda i materiali (sostanze emesse e/o cedute, biodegradabilità, sostanze cedute);
- far fronte agli eventuali inconvenienti igienico-sanitari derivanti dall'uso degli attuali manufatti in particolari condizioni di esercizio (es. inumazioni di salme a distanze oltre i 100 km – vedasi il comma 2 dell'art. 75 del DPR 285/90).

È importante evidenziare come i materiali e/o i relativi manufatti proposti nelle istanze di autorizzazioni (di cui agli art. 31 e 75) spesso non rispondano a tutti i requisiti della normativa e le autorizzazioni vengano respinte.

Pertanto, è necessario effettuare uno studio sui materiali che potrebbero sostituire quelli in uso (zinco e legno) con migliori prestazioni.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Definizione dei requisiti che i nuovi materiali e relativi manufatti di cui agli art. 31 e 75 del DPR 285/90 devono avere dal punto di vista resistenza meccanica, igienico-sanitario e ambientale.
- Materiali ammissibili ai sensi degli art. 31 e 75 del DPR 285/90.

### **Trasferibilità dei risultati**

Revisione degli art. 31 e 75 del DPR 285/90.

## **Assessing the impact of GIV Norovirus on human health: a molecular epidemiological investigation on environmental and clinical samples as a basis for the design of novel diagnostic tools for an emerging pathogen**

I norovirus (NoV) sono importanti patogeni gastroenterici dell'uomo, con un ruolo importante sia nei casi sporadici che negli episodi epidemici. Sono classificati in cinque genogruppi (GI-GV), di cui GI, GII, e GIV possono causare infezioni nell'uomo. In tutto il mondo sono responsabili di circa la metà dei casi di gastroenterite e di oltre il 90% delle epidemie di gastroenterite nonbatterica.

Il genogruppo II è responsabile della maggior parte delle epidemie soprattutto quelle trasmesse attraverso gli alimenti; il genogruppo I ha un ruolo minore ed è in associato principalmente alle epidemie idrotrasmesse. I dati sul genogruppo IV, sono invece scarsi e frammentari. Attualmente non esistono metodologie diagnostiche sensibili e specifiche per questo genogruppo; pertanto i sistemi diagnostici utilizzati nella sorveglianza delle gastroenteriti da NoV sono in grado di identificare esclusivamente i genogruppi I e II.

L'obiettivo della ricerca è quello di ottenere informazioni sulla epidemiologia dei NoV GIV, in particolare sulla loro diffusione nell'ambiente (reflui urbani) e in ambito clinico (pazienti ospedalizzati con sintomi gastroenterici). L'unità di ricerca del partner USA, presso i *National Institutes of Health* (NIH), è esperta internazionale sulla genetica ed evoluzione dei Calicivirus. Inoltre, il progetto prevede la collaborazione di una unità di ricerca italiana presso l'Università degli Studi di Bari.

#### **Risultati attesi nel triennio:**

I risultati attesi del progetto ricadono in tre principali aree di conoscenza:

- Epidemiologica – fornire un quadro epidemiologico dei ceppi di NoV GIV circolanti in Italia e comprendere il loro ruolo come patogeni gastroenterici;
- Diagnostica – sviluppare un sistema di diagnostica molecolare sensibile, specifico e riproducibile;
- Filogenetica – ottenere informazioni sulle origini e sull'evoluzione del NoV GIV mediante lo studio di campioni clinici di archivio raccolti nell'arco di tre decenni.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La conoscenza della diffusione dei NoV GIV e del loro ruolo nelle gastroenteriti virali può essere utilizzata per attuare più efficaci strategie di intervento e misure di prevenzione.

La collezione di sequenze nucleotidiche ottenute durante il progetto potrà essere utilizzata per il confronto con sequenze identificate in paesi e periodi diversi e per definire la tracciabilità dei ceppi implicati in epidemie intra- ed extra-territoriali.

L'ottimizzazione delle strategie diagnostiche permetterà di ridurre il numero delle enteriti virali non ancora diagnosticate; inoltre sarà molto utile in interventi d'emergenza come per esempio nella identificazione del patogeno in epidemie in contesti comunitari, che necessitano risposte attendibili ed efficaci in tempi brevi.

La collezione di ceppi di norovirus GIV potrà in futuro essere utilizzata per la produzione di antigeni sintetici, o per la produzione di reagenti sierologici per lo screening di campioni biologici.

### **Atto integrativo dell'accordo di collaborazione "Messa a punto di soluzioni tecniche, impiantistiche o di gestione per la riduzione dell'arsenico nell'acqua distribuita dai gestori dell'ATO 1" del 29/9/2006**

Le finalità generali del progetto sono indirizzate a:

- monitorare gli impianti sperimentali che si intendono adottare per l'abbattimento dell'arsenico e del fluoro nell'acqua distribuita dal Gestore unico del SII nell'ATO 1;
- condurre uno studio sul controllo algale e sull'eventuale presenza e rimozione di tossine algali nelle acque di falde superficiali e nelle acque prelevate dai laghi di Vico e di Bolsena impiegate per l'adduzione di acque da destinare al consumo umano.

Le attività sono articolate come segue:

- realizzazione di un monitoraggio sugli impianti sperimentali che si intendono adottare per l'abbattimento dell'arsenico e del fluoro nell'acqua distribuita dal Gestore unico del SII nell'ATO 1;

- valutazione dei risultati del monitoraggio sulle soluzioni impiantistiche adottate utili alla riduzione dei livelli dei parametri arsenico e fluoro nelle acque destinate al consumo umano all'interno dei limiti fissati dal DL.vo 31/2001;
- studio dei popolamenti di cianobatteri nelle acque di falde superficiali e nelle acque prelevate dai laghi di Vico e di Bolsena con relativo monitoraggio (verifica e interpretazione) mediante campionamento e analisi *in situ*, applicazione di metodologie spettroscopiche per analisi tossine algali e il possibile rischio connesso alla potabilizzazione delle acque stesse.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Valutazione mediante monitoraggio delle soluzioni tecniche, impiantistiche e di gestione adottate per la riduzione dei livelli dei parametri arsenico e fluoro nelle acque destinate al consumo umano all'interno dei limiti fissati dal DL.vo 31/2001.
- Identificazione, quantificazione e caratterizzazione delle diverse specie fitoplanctoniche potenziali produttrici di tossine.
- Valutazione della eventuale produzione di cianotossine.
- Determinazione di limiti indicativi del rischio di contaminazione delle acque per la potabilizzazione.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati trasferibili ci sono:

- Approfondimento e diffusione ad ARPA, ASL e gestori idrici delle conoscenze nell'ambito delle problematiche connesse al possibile superamento dei valori di concentrazione ammissibili (DL.vo 31/2001).
- Pubblicazione e condivisione con la comunità scientifica dei risultati scientifici ottenuti nell'ambito del progetto.
- Sviluppo di un modello applicabile a risorse idriche da destinare al consumo umano per le quali sussistono sistematici superamenti dei valori di parametro.
- Approfondimento e diffusione ad ARPA, ASL e gestori idrici delle conoscenze nell'ambito delle problematiche connesse al controllo algale ed eventuale presenza e rimozione di tossine algali impiegate per l'adduzione di acque da destinare al consumo umano.

### **Aumento del rischio di esposizione a microrganismi patogeni o tossici in ambienti costieri in seguito a cambiamenti climatici**

Le zone costiere hanno valore strategico per le regioni del Mediterraneo per le molte attività economiche e per la densità abitativa. Essendo zone di transizione, sono condizionate da terra e mare e gli effetti combinati dei cambiamenti climatici e dell'impatto antropico possono essere molto forti.

Obiettivo del progetto è verificare il ruolo di alluvioni o piogge eccezionali, eventi sempre più frequenti, nell'aumento delle fioriture di cianobatteri tossici negli ambienti estuari e costieri e nel trasferimento delle cianotossine lungo la catena alimentare. Inoltre, si verificherà se le interazioni dei cianobatteri, anche marini, con i batteri costieri causino un aumento di specie patogene. Si valuterà infine, l'effetto dell'alterazione della costa per cause climatiche e/o antropiche sulla diffusione di organismi tossici alieni, introdotti da zone più calde. Saranno effettuati campionamenti sul campo, negli invasi d'acqua dei bacini idrografici considerati più a rischio di alluvioni (DL.vo 49/2010) e in acqua costiera in seguito ad eventi eccezionali di forti piogge, in collaborazione con le strutture territoriali preposte al controllo della qualità marina, secondo la direttiva europea sulla strategia marina

(2008/56/EC). Saranno inoltre effettuati esperimenti di laboratorio per testare gli effetti delle diverse condizioni ambientali sulla tossicità e sopravvivenza di cianobatteri.

#### **Risultati attesi nel triennio**

La prima attività consisterà nel selezionare le zone costiere d'interesse secondo due criteri:

- Tipo 1: in base al rischio di alluvione e alla presenza di cianobatteri nel bacino idrografico;
- Tipo 2: in base a condizioni ambientali (forte impatto antropico, aree con acqua più tranquilla e più calda, ecc.) che potrebbero favorire l'insediamento di specie aliene.

Per le zone di tipo 1, a seguito di un evento eccezionale, in stretta collaborazione con le istituzioni locali, saranno effettuati campionamenti costieri di acqua e sedimento subito dopo l'evento e successivamente a scadenze mensili, per acquisire informazioni sulla sopravvivenza e proliferazione dei cianobatteri, sulla loro tossicità e sugli effetti sulle comunità batteriche autoctone, in particolare sulle specie potenzialmente patogene. In caso di persistenza dei cianobatteri nell'ambiente, si camperanno organismi filtratori e altri organismi eduli per determinare l'accumulo e il potenziale trasferimento delle tossine lungo la catena alimentare. Prove di laboratorio forniranno indicazioni sulla sopravvivenza e tossicità dei cianobatteri lungo gradienti di salinità, tipici degli ambienti estuari e di transizione. Nelle zone di tipo 2, saranno effettuati campionamenti durante il periodo della balneazione, per raccogliere informazioni sulla presenza/abbondanza e tossicità di specie aliene introdotte, che permetteranno di avere un quadro più completo dei fattori di rischio associati ad organismi tossici e/o patogeni.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La diffusione di cianobatteri tossici in ambienti costieri o altri organismi, può rappresentare un rischio di esposizione diretta a tossine (durante la balneazione) e indiretta, attraverso la catena alimentare. Sulla base dei risultati raggiunti sarà possibile determinare se e in quale area i cianobatteri rappresentano un rischio da considerare all'interno dei piani di prevenzione e recupero delle aree più a rischio di alluvione, secondo quanto previsto dal DL.vo 49/2010.

La determinazione degli effetti delle interazioni fra diverse specie tossiche/patogene negli ambienti costieri, e le informazioni sulla presenza di nuove specie, forniranno indicazioni utili per una corretta determinazione del rischio e per eventuali strategie di monitoraggio da parte delle istituzioni preposte.

## **Biologia dei Sistemi**

Sin dagli anni '80 si è acquisita l'idea che lo studio della struttura di relazione fra gli elementi caratterizzanti i sistemi biologici sia più importante dell'analisi dettagliata dei particolari. Questa consapevolezza è derivata da un lato dal sostanziale fallimento applicativo della biologia riduzionista (es. crollo del numero di nuovi farmaci) e dall'altra dallo sviluppo di tecnologie in grado di acquisire grandi masse di dati sugli stessi campioni (es. *high throughput screening*).

Continuando una linea di ricerca di più di venti anni, esplorerò la congruenza di tecniche tradizionali di analisi multidimensionale dei dati (es. analisi in componenti principali, *cluster analysis*) e di tecniche innovative (analisi frattali, analisi di reti complesse) con la visione sistemica della biologia per rendere questa nuova scienza alla portata del pubblico più possibile vasto di ricercatori.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono legati ai diversi filoni ora in studio:

- Caratterizzazione strutturale e chimico-fisica dell'effetto allosterico.
- Analisi del campo morfogenetico di cellule staminali neuronali.
- Studio delle modificazioni morfologiche delle cellule cancerose.
- Meccanica statistica delle correlazioni fra geni nella patologia.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Con riferimento ai punti del paragrafo precedente:

- Indicazioni struttura/attività di farmaci di rete.
- Chiarimento della teoria di campo (*Tissue Organization Field Theory*, TOFT) della cancerogenesi.
- Sviluppo di nuovi *tool* diagnostici e di previsione della cancerogenesi.
- Definizione sistemica di patologia.

### **Biomarcatori di danno cromosomico e suscettibilità agli agenti genotossici: un approccio per l'identificazione di fattori di rischio**

L'analisi della risposta individuale agli agenti mutageni, basata sull'uso di biomarcatori di danno al DNA o ad altre strutture implicate nella stabilità genomica, come i micronuclei, le aberrazioni cromosomiche e la non-disgiunzione, può fornire utili indicazioni sulla suscettibilità individuale agli effetti a lungo termine (tumori, patologie degenerative) associati alla esposizione ad agenti genotossici ambientali. Biomarcatori di suscettibilità al danno genotossico si sono infatti mostrati capaci di discriminare non solo soggetti affetti da patologie tumorali rispetto ai controlli, ma anche di fornire indicazioni sul rischio futuro di contrarre tali patologie in studi prospettici su soggetti sani.

L'ampia variabilità interindividuale nella risposta al danno al DNA, evidenziata da studi di popolazione su biomarcatori, viene in parte ricondotta alla naturale variabilità genetica della specie umana, mentre rimane di origine ignota per la quota restante.

Questa linea di ricerca si propone di studiare i fattori, di tipo genetico ed epigenetico, responsabili della modulazione della risposta individuale al danno al DNA e all'apparato mitotico. A tal fine verrà valutata la risposta indotta su cellule umane *ex vivo* dalla esposizione ad agenti modello, e le conseguenze sulla stabilità genomica di modificazioni epigenetiche a carico delle sequenze implicate nel controllo dell'espressione genica e della riparazione del DNA (telomeri, promotori specifici).

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi forniranno informazioni su:

- l'influenza di fattori individuali (età, sesso) e dello stile di vita (abitudine al fumo, consumo di alcol, dieta) sulla sensibilità individuale agli effetti mutageni e sulla variabilità interindividuale in importanti meccanismi coinvolti nel processo di cancerogenesi (segnalazione del danno sul DNA, riparazione, apoptosi);
- le conseguenze sulla stabilità del genoma dell'alterazione di specifiche strutture cromosomiche (centromeri, telomeri) e del fuso mitotico;
- l'influenza di fattori ambientali sul profilo individuale di modificazioni epigenetiche (epigenoma) e sulle conseguenze di quest'ultimo sull'espressione genica e sulla stabilità genomica.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il rischio individuale associato all'esposizione ad agenti tossici e genotossici ambientali è in larga misura modulato da fattori di suscettibilità individuale, a tutt'oggi solo parzialmente identificati. La conoscenza della natura e dei meccanismi sottostanti tale variabilità è d'altra parte un elemento essenziale per realizzare efficaci politiche di prevenzione, capaci di tutelare la salute anche delle fasce di popolazione suscettibili. Si ritiene che i risultati delle

ricerche programmate possano contribuire ad ampliare tale bacino di conoscenze, contribuendo ad una migliore valutazione e prevenzione dei rischi.

Un'area di più immediata applicabilità delle ricerche proposte attiene lo sviluppo di protocolli per la valutazione del rischio individuale a specifici agenti (chemioterapici e/o radiazioni ionizzanti), ai fini della ottimizzazione e personalizzazione dei trattamenti oncologici chemio- e radioterapici.

### **Colori in movimento – Prevenzione delle disabilità nella popolazione anziana**

Il progetto si propone quale modello di intervento finalizzato a fornire alla popolazione anziana le necessarie competenze per rimanere attivi e far fronte all'aumento della speranza di vita e del periodo lavorativo in un modo più appropriato. Il progetto si colloca nell'ambito della *Lifelong Learning* intesa quale processo continuo attraverso il quale ciascun essere umano aumenta e adatta le proprie conoscenze e abilità al fine di partecipare attivamente alla costruzione di una società democratica e di controllare il proprio stato di salute. Un concetto centrale alla base di tutte le politiche socio-sanitarie e educative. Il modello di intervento che si intende proporre consiste in un sistema educativo informale incentrato sull'aumento dell'attività motoria e sull'ottimizzazione del regime alimentare volto a garantire un miglioramento generale della qualità di vita e il contenimento dei costi socio-sanitari. Ciò verrà realizzato attraverso l'individuazione e l'addestramento di mediatori socio-sanitari (medici, gerontologi, assistenti sociali, psicologi e farmacisti) i quali verranno formati attraverso l'impiego di tecniche di marketing sociale basate sul coinvolgimento emotivo. Verrà utilizzato all'uopo un concetto di training come strategia per realizzare una società più integrata che includa la popolazione anziana tra gli attori principali di uno sviluppo socio-economico sostenibile.

#### **Risultati attesi nel triennio**

L'attività del progetto sarà finalizzata al raggiungimento di quattro obiettivi:

- sviluppo di linee guida per il miglioramento dell'approccio emozionale nell'attività dei mediatori socio-sanitari;
- produzione di materiale educativo come supporto all'addestramento dei mediatori sanitari;
- messa a punto di un corso di formazione per mediatori socio-sanitari;
- produzione di un kit didattico-formativo da diffondere tra i partecipanti al progetto.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La metodologia messa a punto nell'ambito del progetto europeo CHANGE prevede la realizzazione di un pacchetto formativo basato su un modello educativo e culturale, centrato sulla persona, sulle sue risorse personali e relazionali. Un modello incentrato sul coinvolgimento degli operatori sociali e sanitari che insieme con gli anziani contribuiscono alla costruzione di una nuova cultura della vita e ad un invecchiamento sano. In questo senso l'innovazione metodologica per la formazione a distanza messa a punto dal progetto può costituire un prodotto modulabile e trasferibile in ogni territorio (ASL).

### **Contratto per l'affidamento di attività di consulenza tecnico scientifica volta alla determinazione di tossine algali prodotte dai Cianobatteri presenti nelle acque degli invasi sardi finalizzata ad una migliore qualità delle acque erogate per uso potabile**

Il progetto è volto alla caratterizzazione dell'eventuale stato di eutrofizzazione tossica delle acque di 16 corpi idrici della Regione Sardegna adibiti ad uso potabile, in

collaborazione con le strutture di controllo dell'Ente acque della Sardegna (ENAS), e all'individuazione di strategie tecniche e amministrative per il recupero e la tutela dei complessi lacustri.

**Risultati attesi nel triennio**

Lo scopo del programma scientifico sarà lo studio di caratterizzazione tossicologica e relativo monitoraggio di specie algali e cianobatteriche tossiche nelle acque di 16 corpi idrici superficiali della Regione Sardegna adibiti ad approvvigionamento o riserva di acqua potabile, ai fini di individuare proposte che definiscano le azioni di tutela dei complessi lacustri in esame sotto il duplice aspetto qualitativo e quantitativo.

**Trasferibilità dei risultati**

I risultati della ricerca realizzeranno il controllo di siti acquatici compromessi da eutrofizzazione e adibiti ad uso potabile, con la contemporanea creazione di capacità tecniche locali per la verifica e la rilevazione di situazioni di potenziale rischio per la salute umana.

**Definizione di criteri di qualità e valutazione e gestione del rischio sanitario in impianti di piscine naturali (biopiscine) sul territorio italiano**

La proposta prevede lo svolgimento di attività atte a coprire una carenza normativa necessaria a definire i requisiti di qualità e le procedure per il controllo e la gestione di ambienti ad uso ricreativo adatti al nuoto. Mentre, infatti, esiste una normativa per le piscine più tradizionali, mancano una legislazione e norme tecniche di monitoraggio, o anche semplicemente linee guida, per la gestione delle "biopiscine" che si stanno rapidamente diffondendo sul territorio nazionale. Attualmente, non viene rilasciata dalle Regioni alcuna certificazione igienico-sanitaria con dichiarazione di balneabilità per questi invasi artificiali bio-depuranti; le autorità sanitarie non sono in grado di esprimere un giudizio di qualità igienico-sanitaria; spesso non svolgono controlli analitici sull'acqua di queste strutture.

Da qui nasce la necessità di svolgere attività di verifica, controllo e valutazione di quelle strutture che si caratterizzano per essere sottoposte a trattamenti delle acque dell'invaso con filtri a ghiaia e lavici e a processi biologici che avvengono in un'area delimitata, in cui si ricrea un ambiente ad elevata biodiversità caratterizzato da piante acquatiche, invertebrati, batteri. Impianti regionali di biopiscine saranno monitorati per parametri microbiologici e virologici dalle UO dell'ISS. Obiettivo finale del progetto è l'elaborazione di criteri di valutazione del rischio sanitario e di requisiti di accettabilità della qualità delle acque nelle biopiscine.

**Risultati attesi nel triennio**

In base ai risultati ottenuti, verranno proposte linee guida e raccomandazioni che potranno fungere da riferimento per una proposta normativa condivisa tra Ministero della Salute, Regioni e Province autonome. Verrà quindi prodotto un catasto georeferenziato. I risultati del progetto saranno anche importanti per aumentare l'attuale conoscenza sui rischi di malattie a trasmissione idrica associati ad attività ricreative. Documenti, raccomandazioni e linee guida verranno prodotti e presentati durante convegni nazionali e internazionali e tramite pubblicazioni e rapporti tecnici.

**Trasferibilità dei risultati**

Nell'ambito di attività pregresse del coordinatore scientifico, relative alla definizione di condizioni idonee all'uso ricreativo di impianti natatori, questa proposta rappresenta un'integrazione e un approfondimento della tematica legata alle strutture ricreative. L'attività precedentemente svolta ha condotto a prodotti successivamente tradotti nell'Accordo tra il

Ministero della Salute, le Regioni e le Province autonome di Trento e di Bolzano, pubblicato nel marzo del 2003, che costituisce un importante traguardo nella definizione dei requisiti minimi igienico-sanitari, tecnici e gestionali degli impianti natatori.

### **Diagnosi e caratterizzazione genica di microbi eucariotici di origine autotrofa ed eterotrofa dannosi per la salute umana in campioni di matrice ambientale, in particolare acquosa**

Gli eucarioti unicellulari autotrofi e eterotrofi costituiscono la maggior parte della biomassa planctonica e bentonica dell'ambiente marino e dulciaquicolo. Possono essere patogeni o tossici e la loro numerosità può costituire una seria minaccia per la salute umana e quindi il progetto si propone di:

- utilizzare metodi molecolari e di coltura *in vitro* per la loro identificazione in ambienti marini e lacustri d'interesse umano in particolare per scopi di balneazione;
- ricercare con metodi d'ingegneria genetica i meccanismi molecolari e di regolazione genica della tossicità causa di problemi di salute per l'uomo.
- valutare l'applicazione nelle acque di balneazione degli attuali parametri di tipo microbiologico, basati sulla presenza di coliformi ed enterococchi nei confronti di questi organismi eucariotici.

Il progetto si rivolge a protozoi parassiti e a protofitti tossici il quale fattore di rischio da bacini idrici è ben documentata. I protozoi patogeni sono causa di epidemie soprattutto di gastroenteriti e di malattie neurologiche e oculari, censite annualmente in USA e UK. In Italia non ne esiste una sorveglianza e non si conosce neanche la prevalenza e incidenza di tali patologie. Il progetto si rivolge anche ai protozoi così detti emergenti in quanto a vita libera ma patogeni per l'uomo in condizione di opportunismo. Tra questi ultimi vi è la capacità di veicolare batteri patogeni per l'uomo rappresentando un problema di salute pubblica in ambiente nosocomiale.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono di tipo conoscitivo, quali:

- ottenere una dimensione del fattore di rischio per l'uomo di contrarre infezioni da protozoi patogeni con stadi infettanti nelle acque di bacini interni e marini;
- definire l'impatto di questi fattori di rischio sulla salute umana sia su base locale che nazionale;
- definire il ruolo della "vettorialità" di protozoi che ospitano batteri e funghi cause di epidemie in ambienti nosocomiali;
- comprendere il fenomeno della tossicità da alghe unicellulari anche in relazione al fenomeno dei così detti "bloom algali".

I risultati attesi di tipo applicato sono

- predisporre un programma di sorveglianza ambientale e sanitario in Italia delle malattie protozoarie correlate all'ambiente acquoso;
- prevedere interventi di prevenzione dell'ambiente acquoso e del suo utilizzo da parte dell'uomo;
- formulare linee guida e protocolli da sottoporre a validazione per identificare le specie di protozoi e alghe patogeni per l'uomo nelle acque marine e interne destinate alla balneazione, oggi completamente assenti;
- suggerire una modificazione dei parametri attualmente in uso per definire la qualità delle acque da balneazione esclusivamente sulla base della presenza di coliformi ed enterococchi senza tener conto della componente protozoaria,

- fornire elementi utili per l’ottimizzazione degli impianti di depurazione e riciclaggio dell’acqua per scopi umani nelle aree marine e lacustri d’interesse turistico e ambientale.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La trasferibilità dei risultati consiste in primo luogo nel comunicarli alla comunità scientifica tramite pubblicazioni internazionali indicizzate nonché attraverso la comunicazione a convegni di settore a livello sia nazionale che internazionale. I risultati saranno, inoltre, trasferiti alle autorità e operatori del settore ambientale e sanitario attraverso l’organizzazione di workshop, corsi di formazione, stesura di report istituzionali da diffondere capillarmente a livello periferico locale e pubblicazione di linee guida da parte dell’ISS sull’esecuzione del monitoraggio ambientale specifico per i microbi eucariotici. La trasferibilità consiste, infine, nell’utilizzo dei risultati per la formulazione di piani d’intervento ambientale basati su strumenti biotecnologici di indagine (monitoraggio) e di contenimento (depurazione).

#### **DNA repair as potential therapeutic target in human cancer**

La riparazione del DNA per escissione di basi (*base excision repair*, BER) è un processo fondamentale per la rimozione del danno endogeno. Questo ruolo è spesso coordinato con un altro meccanismo di riparazione noto come *mismatch repair* (MMR). È stato proposto che l’up-regolazione del BER nei tumori solidi sia una risposta adattativa al microambiente tumorale (dove si origina molto danno endogeno). Le cellule tumorali staminali, che sono considerate le cellule dalle quali si originano i tumori, sono caratterizzate da un’elevata capacità di riparazione e alta espressione dei geni del BER rispetto alla loro controparte differenziata. Studi recenti indicano che l’inibizione del BER possa conferire letalità specifica per le cellule tumorali in particolare quando geni dell’MMR sono inattivati (Martin *et al. Cancer Cell* 2010;17:235). Dati non pubblicati del nostro laboratorio indicano che nel cancro gastrico è presente una relazione inversa tra i livelli di espressione di geni dell’MMR (MLH1) e del BER (DNA polimerasi beta) suggerendo che possano agire da meccanismi di back-up. Sulla base di queste osservazioni noi proponiamo:

- di studiare la deregolazione del BER nel cancro gastrico;
- di analizzare come il BER e l’MMR si coordinano nella risposta al danno endogeno e alla chemioterapia;
- di studiare i meccanismi del BER in cellule tumorali staminali;
- di usare questa informazione come base per il disegno di terapie per il cancro individualizzate.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Identificazione del *cross-talk* tra BER e MMR nella risposta ad agenti chemioterapici-modello in linee cellulari derivate da tumori gastrici in cui sono stati silenziati i geni d’interesse.
- Caratterizzazione di inibitori di proteine del BER, in particolare della DNA polimerasi beta, nella sopravvivenza di cellule di tumori gastrici con difetti nell’MMR.
- Caratterizzazione del profilo di riparazione di cellule staminali tumorali di colon.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La caratterizzazione del profilo di riparazione del DNA di tumori gastrici potrà fornire informazioni importanti per ottimizzare le esistenti terapie chemioterapiche e fornire la base per lo sviluppo di nuovi protocolli. Inoltre, lo scopo di questo studio è di fornire biomarcatori

predittivi per l'identificazione di pazienti con maggiore probabilità di rispondere ad antagonisti del BER.

### **Riparazione del danno ossidativo al DNA, instabilità genomica, neurodegenerazione e invecchiamento**

In un nostro studio precedente abbiamo riportato che l'enzima della riparazione del DNA hMTH1 fornisce un alto livello di protezione dalla neurodegenerazione osservata modello chimico della malattia di Huntington (HD) in topi transgenici che esprimono alti livelli della proteina umana hMTH1 (De Luca *et al. PLoS Genet.* 2008;4(11):e1000266). Questa protezione mediata da MTH1 era associata ad una diminuzione significativa nella dimensioni delle lesioni striatali indotte dal trattamento con la tossina mitocondriale acido 3-nitropropionico e ad un abbassamento significativo del livello delle lesioni al DNA di tipo ossidativo (8-oxodG). Risultati preliminari indicano che i topi transgenici vivono più a lungo dei loro corrispettivi topi *wild-type*. Questi risultati suggeriscono l'esistenza di un legame causale tra neurodegenerazione e danno ossidativo agli acidi nucleici e indicano un importante contributo di precursori ossidati della sintesi del DNA/RNA nell'invecchiamento del cervello. Prevediamo di studiare in maggior dettaglio i meccanismi alla base della protezione fornita da MTH1 contro l'invecchiamento utilizzando sia modelli *in vitro* che *in vivo*.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto è un avanzamento nello studio dei meccanismi responsabili della neurodegenerazione che si osserva in una rara malattia genetica, la malattia di Huntington. Prevediamo di determinare il ruolo dell'accumulo delle basi ossidate del DNA a livello nucleare e mitocondriale durante i processi neurodegenerativi che si osservano in HD. Dal momento che mutazioni nel DNA mitocondriale sono state ipotizzate essere alla base del processo di invecchiamento, verrà anche studiato il ruolo dell'ossidazione nel modulare i tassi di mutazioni a livello mitocondriale.

I risultati attesi sono:

- Ruolo di MTH1 nel mediare la protezione del DNA mitocondriale dal danno ossidativo associato all'espressione della Huntingtina mutata in neuroni di striato.
- Ruolo di MTH1 nel mediare la protezione verso la senescenza in modelli sia *in vitro* che *in vivo*.
- Costruzione di vettori lentivirali per esprimere *in vivo* MTH1 in un modello genetico di HD (topi R6/2).

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questa proposta costituisce un ovvio proseguimento delle ricerche precedenti in un tentativo di identificare un possibile approccio terapeutico associato all'uso di hMTH1 contro i meccanismi di neurodegenerazione che si osservano in HD.

### **Effetti di basse dosi di agenti genotossici**

Gli effetti biologici associati all'esposizione a basse dosi di agenti genotossici chimici o fisici sono attualmente oggetto di un ampio dibattito scientifico. I dati sperimentali ed epidemiologici sono limitati, e la probabilità di effetti avversi a basse dosi viene stimata generalmente con modelli matematici che assumono l'assenza di soglia e la linearità della relazione dose-effetto a basse dosi. Dati recenti, però, indicano che molte sostanze a basse dosi seguono una curva dose-risposta a forma di J (andamento con soglia) o una curva invertita a forma di U (ormesi), mettendo così in discussione l'appropriatezza dei modelli applicati. Allo stato attuale appare necessario estendere le indagini sperimentali per acquisire

ulteriori informazioni sui meccanismi biologici attivati dalla esposizione a basse dosi di mutageni chimici o fisici, anche ai fini di una migliore valutazione dei rischi posti da agenti genotossici ambientali.

Nel triennio indicato si prevede di condurre indagini sperimentali su modelli *in vitro* per indagare:

- la relazione dose-risposta a bassissime dosi di agenti alchilanti in ceppi batterici con diverse capacità riparative del DNA;
- la verifica della induzione di un effetto di ormesi da parte di selezionate sostanze chimiche in ceppi batterici;
- la sensibilità alle basse dosi di radiazioni in tipi cellulari diversi (cellule normali vs cellule tumorali o cellule staminali) e in linee cellulari mutate o silenziate in geni specifici.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- L'impiego di procarioti permetterà di analizzare la forma della relazione dose-risposta a basse dosi con una potenza non consentita in sistemi eucariotici, permettendo di accettare o rifiutare con elevata confidenza l'ipotesi di assenza di soglia nelle condizioni sperimentali adottate.
- Analogamente, sarà possibile verificare in modo rigoroso l'evidenza di un effetto ormetico a basse dosi, proposta in modo retrospettivo per una serie di agenti chimici, allestendo esperimenti *ad hoc*.
- L'uso di un pannello adeguato di linee cellulari opportunamente differenziate permetterà di procedere nella caratterizzazione dei processi cellulari coinvolti nella risposta alle basse dosi.

Complessivamente, si ritiene che i risultati attesi possano contribuire alla conoscenza sugli effetti biologici delle basse dosi di agenti genotossici, un aspetto di cruciale rilevanza anche ai fini della valutazione del rischio delle sostanze chimiche ambientali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Una migliore conoscenza dei meccanismi e della risposta cellulare indotta dalla esposizione a basse dosi di agenti genotossici è indispensabile per un'adeguata modellizzazione degli effetti attesi e per la valutazione del rischio. Si ritiene quindi che le informazioni acquisite attraverso le attività descritte possano avere rilevanza ai fini della valutazione dei rischi posti da basse dosi di agenti genotossici ambientali. Al riguardo si rileva come recenti evidenze sperimentali, scaturite da indagini analoghe a quelle programmate, abbiano evidenziato limiti e incongruenze nei presupposti teorici alla base dei correnti approcci per la valutazione del rischio genotossico a basse dosi, innescando un ampio dibattito sulla problematica che ha già avuto ricadute in ambito normativo.

### **Effetti genotossici delle nanoparticelle**

Lo sviluppo delle nanotecnologie ha portato sul mercato migliaia di nuovi materiali di dimensioni nanometriche. Le peculiari proprietà dei nanomateriali (NM) li rendono utili nei campi più disparati delle tecnologie con un impatto progressivo sulla nostra vita. Le loro proprietà chimico fisiche si diversificano da quelle dei loro componenti primari, ne consegue che le proprietà tossicologiche non siano sempre prevedibili sulla sola base della composizione chimica. Numerosi progetti di ricerca finanziati dalle istituzioni internazionali hanno allo scopo di colmare il vuoto di conoscenze e valutare al meglio gli effetti sulla salute umana legati alla diffusione di questi materiali e verificare l'effettiva capacità dei saggi attualmente validati di identificare il rischio potenziale degli NM. L'attività di questa linea di

ricerca, in collaborazione con altri Reparti del Dipartimento AMPP e all'interno di progetti finanziati dal Ministero della Salute, si propone di identificare il potenziale genotossico di NM di larga diffusione (diossido di Titanio, ossido di Zinco e Argento) utilizzando il Test del Micronucleo e il *Comet assay in vitro* in linfociti umani primari e/o in altri modelli cellulari rappresentativi dei bersagli cellulari legati alle potenziali vie di esposizione umana. Scopo dello studio sarà quindi di identificare la genotossicità degli NM in relazione alle loro proprietà chimico-fisiche (dimensione, stato di aggregazione), ai possibili meccanismi e protocolli di trattamento.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I principali risultati attesi sono:

- identificazione degli effetti genotossici di nano materiali selezionati (TiO<sub>2</sub>NP, ZnONP e Ag) in modelli sperimentali *in vitro*;
- messa a punto di protocolli sperimentali adatti alla valutazione della genotossicità dei nanomateriali *in vitro*;
- identificazione delle proprietà chimico-fisiche in grado di modulare l'effetto genotossico dei nanomateriali utilizzati nello studio;
- identificazione dei meccanismi di danno cellulare responsabili dell'effetto genotossico;

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati prodotti consentiranno di:

- verificare l'applicabilità agli NM dei saggi tossicologici esistenti;
- contribuire alla messa a punto di linee guida specifiche per gli NM;
- supportare la classificazione e conseguente etichettatura degli NM basata sulle proprietà chimico-fisico nel quale vengono posti sul mercato o nel quale si prevede vengano ragionevolmente utilizzati.

### **Elaborazione di procedure per la valutazione del rischio da cianobatteri tossici presenti nei laghi ed elaborazione di misure per il contenimento dei rischi e per la gestione delle emergenze nell'ambito del progetto EULAKES**

Le tossine cianobatteriche sono fortemente nocive per animali ed esseri umani. Esse sono causa di gravi intossicazioni acute e croniche, ed è perciò importante garantire alle popolazioni acqua esente da tossine, o almeno garantire un livello di tossine al di sotto di un sicuro limite di soglia. Per i casi in cui la contaminazione dell'acqua non può essere evitata, verranno elaborate adeguate misure da mettere in opera per evitare gli episodi di intossicazione.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Verrà sviluppato un protocollo per una veloce e affidabile valutazione delle minacce rappresentate dai cianobatteri; combinando sia l'analisi chimica che quella biologica. Verrà elaborato un insieme di strumenti per sviluppare adeguate contromisure in risposta ad un rischio da cianobatteri tossici. L'insieme comprenderà procedure per evitare o minimizzare la contaminazione da cianotossine di reti acqueduttali e l'esposizione umana e la definizione di misure di pronto soccorso.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati della ricerca realizzeranno un protocollo di misure gestionali aggiornate per il controllo del rischio da eutrofizzazione tossica, e la elaborazione di capacità tecniche per la rilevazione e la gestione di situazioni di potenziale rischio per la salute umana, da trasmettere alle autorità di controllo locale.

### **Profiling the toxicity of new drugs: a non animal-based approach integrating toxico-dynamics and biokinetics**

L'obiettivo principale del progetto è quello di sviluppare una strategia sperimentale che utilizzi test *in vitro* e che permetta di identificare le molecole in grado di indurre effetti avversi nella popolazione nelle fasi precoci dello sviluppo di un farmaco. Al contempo una tale strategia permetterebbe la riduzione del numero di animali nella sperimentazione tossicologica attraverso lo sviluppo di metodologie *in vitro* in grado di essere predittive per gli effetti a carico di fegato, rene e sistema nervoso centrale in seguito a somministrazioni ripetute. L'obiettivo sarà raggiunto attraverso la caratterizzazione degli aspetti tossicocinetici e tossicodinamici nella risposta cellulare ad effetti tossici *in vitro* di farmaci opportunamente selezionati. Lo studio dei parametri biocinetici *in vitro* permetterà di dare risposte alla attuale incapacità di tradurre le concentrazioni *in vitro* in dosi da cui derivare i *No Observed Adverse Effect Levels* (NOAEL) come base per la valutazione del rischio. Le informazioni ottenute saranno poi trasformate in equivalenti di dose nella specie umana utilizzando modelli matematici tra cui i modelli farmacocinetici a base fisiologica (*physiologically based pharmacokinetic* – PBPK – model).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il risultato finale del progetto è l'identificazione e messa a punto di una strategia sperimentale che utilizzi modelli non animali e che possa essere utilizzata a scopi regolatori per la identificazione di effetti tossici indotti da farmaci e/o dai loro metaboliti a medio e lungo termine.

La Unità Operativa (UO) dell'ISS contribuirà essenzialmente agli obiettivi del workpackage (WP) 3 (*Non animal-based models for in vitro kinetics and human kinetic prediction*) di cui ha anche il coordinamento, i cui risultati principali saranno:

- l'identificazione dei parametri biocinetici rilevanti
- la caratterizzazione biocinetica dei modelli sperimentali attraverso la misura e/o la predizione dei suddetti parametri
- l'identificazione di fattori di suscettibilità metabolica. I parametri identificati verranno forniti e discussi con le altre UO impegnate nell'uso dei modelli predittivi PBPK per la derivazione dei NOAEL.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto prevede di trasferire i propri risultati che potrebbero avere un notevole impatto su tutto il settore della tossicologia regolatoria e della *safety pharmacology*, alla Unione Europea (UE) e in particolare a tutte le autorità competenti in materia di sicurezza dei farmaci. Tale approccio potrebbe essere trasferito anche alla sicurezza delle sostanze chimiche. L'identificazione di una strategia che permetta la riduzione dei tempi dei costi e del numero di animali utilizzati, accettata per la sua validità e predittività dagli organismi internazionali a scopi regolatori potrebbe essere di interesse comune sia per le autorità competenti che per le imprese chiamate a presentare dossier di registrazione delle varie tipologie di sostanze chimiche.

### **Emergenza nella gestione del rischio in acqua potabile per la tutela della salute pubblica (Progetto di gemellaggio TR08EN05 Ministero della Sanità della Turchia/ISS)**

Lo scopo del progetto è il potenziamento del Ministero della Salute in materia di acqua potabile nelle sue capacità istituzionali per la valutazione del rischio, l'allarme e la gestione dei casi di emergenza, in linea con la normativa comunitaria sulle acque potabili (98/83/CE).

Inoltre le attività del progetto contribuiranno alle priorità di prevenzione istituito dal nono Piano di Sviluppo 2007-2013, nell'ambito dei servizi di igiene ambientale e tutela della salute pubblica.

Con il raggiungimento dei suoi risultati, il progetto contribuirà al rafforzamento della capacità amministrativa del servizio pubblico e la diffusione delle conoscenze circa l'acqua potabile, la valutazione del rischio e l'allarme tempestivo in caso di emergenza.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Migliorare l'attuale capacità di valutazione del rischio del Ministero della Sanità (*Ministry of Health*, MoH) della Turchia in materia di acqua potabile.
- Identificare la contaminazione in acqua potabile. In particolare saranno sviluppati:
  - metodologia per identificare la contaminazione DW attraverso il monitoraggio della qualità microbiologica e chimica;
  - metodologia per la valutazione dei punti di controllo e l'individuazione di contaminazione;
  - efficiente organizzazione del trasferimento dei risultati delle analisi di acqua potabile tra laboratori e direzioni medico in caso di contaminazione;
  - serie di linee guida e strumenti per sviluppare un database nazionale internet di metodi biologici e chimici da utilizzare per l'analisi acqua potabile.
- Migliorare la capacità di allarme precoce del Ministero della Salute in materia di acqua potabile, in particolare:
  - la capacità del Ministero della Salute nell'organizzazione di allerta precoce per acqua potabile sia a livello di organizzazione centrale e nelle 81 direzioni sanitarie provinciali attraverso la formazione di 200 tecnici;
  - predisposizione e pubblicazione delle linee di orientamento che riassumono le procedure sviluppate di preallarme in DW.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tutti i risultati del progetto saranno trasferiti al MoH della Turchia e ai Dipartimenti di Salute provinciale, durante diversi workshop, seminari, incontri di formazione e visite studio. Inoltre, alcune linee guida, documenti di indirizzo e rapporti tecnici saranno preparati e pubblicati.

### **Fitofarmaci: valutazione dell'esposizione della popolazione ai loro residui attraverso la dieta**

Compito dell'autorità sanitaria è il controllo dei requisiti di qualità e la valutazione delle implicazioni tossicologiche e sanitarie dei prodotti fitosanitari immessi in commercio e la verifica dell'esistenza di residui nelle derrate alimentari nel rispetto dei Limiti Massimi di Residuo (LMR) fissati dalla normativa vigente.

Dalla fissazione di LMR deriva l'esigenza di valutare il livello di esposizione del consumatore a residui di fitofarmaci per verificare se detto livello è coerente con le proprietà tossicologiche e con le ipotesi di esposizione considerate al momento della fissazione di LMR. Tutto ciò con particolare riferimento agli alimenti per la prima infanzia, considerata tra le classi di popolazione più sensibili anche a causa del particolare tipo di dieta seguito.

Per l'organizzazione delle indagini relative all'individuazione di residui nelle derrate alimentari:

- selezione delle derrate in base all'importanza nella dieta per fasce di età;

- individuazione dei gruppi di fitofarmaci da ricercare per tipologia di derrata agricola e di prodotto alimentare, con particolare attenzione ai fitofarmaci di più recente introduzione nel mercato italiano;
- sviluppo e validazione di metodologie multiresiduo per l'analisi di fitofarmaci di recente immissione sul mercato.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Valutazione del livello di esposizione del consumatore a residui di fitofarmaci e verifica che detto livello sia coerente con le proprietà tossicologiche e con le ipotesi di esposizione considerate in base agli LMR fissati dalla normativa vigente.
- Valutazione del significato sanitario dell'ingestione stimata per i fitofarmaci selezionati e riscontrati nelle indagini, attraverso il calcolo del rapporto delle *National Estimated Daily Intake* (NEDI) con le *Acceptable Daily Intake* (ADI) definite dalla Commissione Consultiva per i Prodotti Fitosanitari o raccolte dalla letteratura.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- Collaborazione con i laboratori di controllo ufficiali (ARPA, Agenzia Provinciale per la protezione dell'ambiente – APPA, Istituti Zooprofilattici – IZS) per l'applicazione delle metodiche sviluppate e validate.
- Segnalazione all'autorità sanitaria di eventuali situazioni di rischio per i consumatori, riscontrate sulla base dei risultati ottenuti nel corso delle indagini.

### **Gestione delle emergenze microbiologiche legate al consumo di prodotti di origine vegetale (unita operativa acque di irrigazione)**

Il progetto si propone i seguenti obiettivi:

- sviluppare metodi analitici rapidi (colturali e molecolari) capaci di identificare i patogeni enterici in campioni vegetali di I e IV gamma;
- messa a punto di metodi rapidi per la determinazione dei patogeni con particolare riguardo alla Salmonella nei semi germogliati e nelle loro acque di cultura;
- determinare attraverso l'utilizzo di metodi rapidi molecolari la diffusione di Salmonella, Yersinia, *Listeria monocytogenes* e altri batteri patogeni in campioni di acqua e di vegetali di I e IV gamma;
- confermare tramite metodi analitici colturali la presenza dei suddetti patogeni nei campioni di acqua, preventivamente analizzati e risultati positivi in *real-time* PCR;
- caratterizzare fenotipicamente e genotipicamente i ceppi ed eseguire un'analisi di correlazione genetica tra i ceppi isolati da fonti diverse;
- valutare la persistenza in ambiente idrico di differenti germi patogeni, in particolare dei sierotipi di salmonella più frequentemente isolati da campioni ambientali come S. Napoli e S. Veneziana, in comparazione con i sierotipi più comunemente isolati da alimenti di origine animale;
- identificare attraverso sistemi dedicati e georeferenziati l'uso del suolo e l'inquinamento diffuso potenziale con particolare riferimento all'identificazione delle sorgenti di contaminazione da parte di salmonella nella valle del Sele.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Si attendono i seguenti risultati:

- Rintracciare la/le fonte/i di contaminazione riguardo le Salmonelle e specificamente riguardo la S. Napoli
- Individuare i principali serbatoi di trasmissione

- Definire linee guida per il monitoraggio dei prodotti vegetali e ambientale
- Elaborare e diffondere alle autorità sanitarie delle linee guida descrizione contenenti i flussi informativi in caso di allerta comunitarie
- Redazione di Linee Guida per la gestione del rischio associato all'uso di acque contaminate destinate all'irrigazione
- Definizione di un metodo di estrazione e purificazione del DNA batterico da utilizzarsi per il controllo della contaminazione dei semi germogliati.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Migliorare le conoscenze circa gli aspetti ecologici, ambientali e tecnologici delle diverse produzioni vegetali in relazione alle pratiche di produzione e alle condizioni climatiche.

#### **Il laboratorio nazionale di riferimento per la determinazione dei residui di antiparassitari mediante metodi mono residuo: sviluppo di metodologie analitiche specifiche**

Il Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) per la determinazione dei residui di antiparassitari mediante metodi mono residuo, in accordo alle normative comunitarie vigenti (Regolamenti Comunitari n. 396/2005/EC e n. 882/2004/EC), ha il compito di:

- partecipare agli *European Union Proficiency Test* (EUPT) organizzati dal Laboratorio Comunitario di Riferimento per i metodi mono residuo;
- collaborare con i laboratori nazionali per il controllo ufficiale dei residui di antiparassitari in prodotti di origine vegetale mediante interscambi di informazioni; organizzare circuiti interlaboratorio a livello nazionale;
- collaborare con il Ministero della Salute in questioni inerenti la determinazione dei residui di antiparassitari mediante metodi a singolo residuo. Nell'ambito di tali attività, il progetto si propone di sviluppare e validare metodi di analisi mono residuo specifici per quei composti previsti dai programmi di monitoraggio 2012-2014, quali: 2,4-D, Abamectina, Amitraz, Amitrol, Ione bromuro, Captan, Chlormequat, Chlorthalonil, Ditiocarbammati, Ethephon, Fenbutatin ossido, Folpet, Fluazifop, Glyphosate, Haloxyfop, Haloxyfop-R, Mepiquat, Propamocarb. Tali composti, data la loro natura chimica, devono essere analizzati con tecniche analitiche specifiche e sensibili (LC/MS/MS, GC/MS/MS). Lo sviluppo di metodi mono residuo specifici permetterebbe un più rapido controllo dei residui di sostanze che spesso sono eclissate dai piani di monitoraggio comunitari a causa delle loro difficoltà analitiche.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Nella prima fase del progetto, è prevista un'indagine conoscitiva dei metodi di analisi attualmente in uso presso i laboratori ufficiali che effettuano controlli relativamente ai principi attivi oggetto del progetto.

Nella seconda fase del progetto, verranno sviluppati e validati metodi di analisi mono residuo per quei principi attivi per i quali sono state evidenziate carenze sperimentali da parte dei laboratori ufficiali nazionali. In particolare saranno studiate le varie combinazioni sostanza attiva/matrice previste dal programma di monitoraggio comunitario.

Nella terza fase del progetto si propone di organizzare un circuito interlaboratorio per una combinazione composto/matrice in collaborazione con i laboratori ufficiali preposti al controllo dei residui di antiparassitari.

I metodi sviluppati verranno proposti per la validazione ai fini dell'accreditamento dell'LNR per i metodi mono residuo.

### **Trasferibilità dei risultati**

Collaborazione con i laboratori ufficiali (ARPA, APPA, IZS) che eseguono controlli in materia di residui di fitofarmaci, collaborazione con il Ministero della Salute e collaborazione con il Laboratorio Comunitario di Riferimento (LCR) per i metodi mono residuo.

### **Impatto sanitario della residenza nei siti inquinati**

Il progetto ha la finalità di stimare l'impatto sulla salute determinato dalla residenza nei siti inquinati, per fornire indicazioni sulle priorità degli interventi di risanamento ambientale.

Il progetto prende in esame 44 siti di interesse nazionale per le bonifiche (SIN). Per tali siti è già disponibile l'analisi della mortalità per 63 cause o gruppi di cause relative al periodo 1995-2002 (Pirastu *et al.*, 2010; Pirastu *et al.*, 2011).

Nel triennio 2012-2014 verrà aggiornata l'analisi della mortalità prendendo in considerazione gli anni dal 2003 in avanti, nel corso dei quali è stata adottata la decima Revisione della Classificazione Internazionale delle Malattie.

Per i 23 SIN ubicati in aree servite da Registri Tumori verrà studiata l'incidenza della patologia neoplastica, con il duplice vantaggio di produrre dati non influenzati da una eventuale sopravvivenza differenziata, legata a condizioni socio demografiche più complessive e di poter investigare patologie a bassa letalità.

Analogamente, per i SIN ubicati in aree servite da Registri Malformazioni, verrà studiata la prevalenza alla nascita di queste patologie.

Altre linee di ricerca riguarderanno specifici SIN, per i quali sia giudicato appropriato uno studio *ad hoc*. Fra questi vanno citati Laghi di Mantova e Polo Chimico, Priolo, Biancavilla, litorale Domizio-Flegreo, agro Aversano e Bagnoli. Nelle aree oggetto di studi *ad hoc* particolare importanza verrà annessa alla caratterizzazione dell'esposizione.

### **Risultati attesi nel triennio**

Sono attesi i seguenti risultati:

- indicatori di mortalità corretti per deprivazione socioeconomica, per 63 cause di morte, con l'indicazione di quelle per le quali sono disponibili evidenze scientifiche di un'associazione con le fonti di esposizione presenti nel territorio in esame;
- dati di incidenza dei tumori e prevalenza di malformazioni alla nascita nei siti nei quali la rilevazione di queste patologie sono attuabili;
- per quanto attiene i siti oggetto di indagini *ad hoc*, gli specifici risultati saranno funzione degli specifici disegni di studio adottati.

In questo quadro, particolare importanza verrà annessa allo studio della patologia infantile, coerentemente con le indicazioni fornite dalla WHO e da altre autorevoli istituzioni a livello internazionale.

Ulteriori risultati fondati sull'approccio qui descritto potranno riguardare aree che non hanno il riconoscimento di SIN ma che sono state giudicate meritevoli di indagini specifiche da parte di autorità centrali e regionali.

Il progetto si caratterizza anche per la messa a punto di metodologie innovative, in particolare per quanto riguarda l'applicazione dei più recenti approcci di analisi statistica alla definizione dei profili di salute delle popolazioni in esame, l'utilizzo di metodologie di valutazione comparativa e sintesi quantitativa per l'analisi di più siti inquinati, e l'approfondimento di vari aspetti della relazione fra esposizioni ambientali e fattori socio-economici.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati verranno trasferiti in primo luogo alle strutture del Servizio Sanitario Nazionale (SSN) competenti in materia di prevenzione, nonché alle ARPA. I risultati del progetto, corredati da elementi di interpretazione e commento, saranno inoltre trasmessi alle autorità regionali e locali interessate, in particolare agli amministratori degli enti locali coinvolti, evidenziando le possibilità di utilizzo dei processi decisionali in materia di risanamento ambientale, e in particolare di individuare le priorità del risanamento nella prospettiva della tutela della salute della popolazione.

Infine, i risultati del progetto costituiranno la base del processo di comunicazione con la popolazione, le associazioni e i comitati. Tale processo dovrà essere bilaterale, rigoroso, chiaro, idoneo a trasmettere anche la nozione di incertezza e sempre empatico.

### **Instabilità dei siti fragili comuni e cancro: studio del ruolo della proteina Werner nell'attivazione del *checkpoint* dipendente dalla chinasi ATR**

I siti fragili comuni (*Common Fragile Sites*, CFS) sono componenti strutturali dei cromosomi umani e sono particolarmente predisposti alla rottura in seguito a trattamenti con agenti che interferiscono con la fase di replicazione del DNA. Lo studio della stabilità dei CFS ha una grande importanza per la biologia del cancro, poiché queste regioni sono spesso trovate riordinati nei cellule cancerose. Inoltre, è stato dimostrato che i CFS sono target dell'instabilità genomica dalle prime fasi della tumorigenesi. sebbene non siano sufficientemente noti i meccanismi che portano dai difetti in replicazione alle rotture a livello dei CFS, è noto che diverse proteine della risposta del danno indotto al DNA, compreso il *checkpoint* dipendente da ATR, svolgono un ruolo cruciale nel mantenimento della stabilità dei CFS. Recentemente abbiamo dimostrato che la proteina Werner gioca un ruolo fondamentale nella stabilità dei CFS, collaborando con la chinasi ATR, probabilmente favorendo la risoluzione di strutture aberranti che si formano a livello dei CFS.

Questo progetto si propone di comprendere come Werner interagisce con il *checkpoint* per favorire la stabilità dei CFS.

### **Risultati attesi nel triennio**

I nostri dati preliminari suggeriscono che, in risposta alla alterazione dei CFS, Werner svolge un ruolo importante supportando il *checkpoint* dipendente da ATR ed è fosforilata in maniera dipendente da ATR. In questo progetto ci proponiamo di esaminare come Werner regola la stabilità dei CFS, contribuendo al mantenimento della stabilità dell'intero genoma.

A tale scopo noi ci proponiamo di studiare:

- I meccanismi molecolari attraverso i quali Werner promuove l'attivazione del *checkpoint* ATR-dipendente in risposta a stimoli che interferiscono con la stabilità dei CFS.
- Le conseguenze della perdita dell'attivazione del *checkpoint* mediata da Werner sulla replicazione dei CFS.

I nostri studi contribuiranno alla comprensione dei meccanismi che presiedono al mantenimento della stabilità dei CFS sia in condizioni normali che patologiche. Inoltre, poiché i CFS sono target preferenziali del danno indotto al DNA in lesioni precancerose, le nostre scoperte si presume contribuiscano ad elucidare il link esistente tra difetti replicazione e instabilità genomica nella tumorigenesi.

### **Trasferibilità dei risultati**

Questa proposta ci fornirà un quadro più chiaro sulle anomalie molecolari che portano alla progressione del cancro. I risultati ottenuti da questi studi potranno dare luogo a pubblicazioni su prestigiose riviste internazionali del settore. Inoltre, le nostre scoperte

potranno essere sfruttate per sviluppare screening diagnostici finalizzati alla diagnosi precoce e al trattamento dei tumori, con il fine di migliorare la sopravvivenza, riducendo i costi in termini di vite e determinando significativi risparmi di spese mediche per il sistema sanitario nazionale.

**Studio del ruolo della elicasi mutata nella sindrome di Werner e della endonucleasi Mus81 nell'attivazione del *checkpoint* e della risposta allo stress replicazionale: nuovi meccanismi per l'identificazione di terapie personalizzate per la cura dei tumori**

Diversi modelli sono stati ipotizzati per spiegare l'instabilità genomica dei tumori. Negli ultimi anni diversi studi indipendenti hanno dimostrato che l'instabilità del genoma viene rilevata già nelle lesioni precancerose e viene iniziata dall'attivazione di un oncogene. L'attivazione di un oncogene risulta in uno stato cronico di perturbazione della replicazione del DNA che conduce all'accumulo di danno al DNA. Questo "stress replicazionale" può promuovere la tumorigenesi. Dal momento che anche lesioni indotte al DNA da agenti cancerogeni possono generare stress replicazionale, i meccanismi che riducono tale stress o ne riparano le conseguenze sono delle barriere anti-tumoral di primaria importanza.

Il nostro lavoro si concentra sulla identificazione delle relazioni meccanicistiche tra l'attivazione di specifici meccanismi di recupero della replicazione in condizioni di stress, la vitalità cellulare e l'insorgenza dell'instabilità del genoma nel cancro. Basandosi sulla nostra conoscenza di ciò che accade in cellule provenienti da sindromi di predisposizione ai tumori, possiamo ipotizzare che esistano meccanismi alternativi che siano maggiormente utilizzati a seconda del background genetico dello specifico tumore.

La migliore comprensione di quali meccanismi siano usati da uno specifico tumore e la loro *signature* molecolare come instabilità genomica può definire biomarcatori e nuovi obiettivi per la terapia del cancro

**Risultati attesi nel triennio**

Si prevede che i nostri studi possano portare ai seguenti risultati, che rappresentano progressi significativi rispetto allo stato dell'arte attuale:

- identificazione dei meccanismi di recupero della replicazione dopo stress indotto da oncogeni e loro regolazione;
- identificazione della correlazione funzionale tra l'attivazione di uno specifico meccanismo di recupero della replicazione dopo stress indotto da oncogeni, stabilità del genoma e la sopravvivenza delle cellule precancerose e tumorali;
- identificazione di proteine del *pathway* come nuovi potenziali bersagli per la terapia del cancro obiettivo;
- stratificazione dei tumori usando la loro instabilità del genoma e lo stato di specifici meccanismi di recupero della replicazione dopo stress al fine di determinare se tali parametri possono essere utilizzati come biomarcatori per la definizione della terapia e la diagnosi precoce.

**Trasferibilità dei risultati**

Il nostro lavoro è verosimile che possa portare alla definizione di nuovi biomarcatori utili per la selezione terapeutica di specifici tumori e produrre per strumenti potenzialmente brevettabili per una migliore terapia del cancro.

### **Joint Action on Monitoring of Injuries (JAMIE)**

Le informazioni disponibili a livello nazionale ed europeo tendono a focalizzarsi sugli infortuni fatali. Tuttavia, per ogni evento fatale vi sono centinaia d'infortunati per incidenti e violenza osservati in ambito ospedaliero. Oltretutto la mancanza d'informazioni sulle cause e le circostanze dell'infortunio caratterizza generalmente le registrazioni ospedaliere. Attualmente 15 Paesi membri stanno sperimentando lo *European Injuries DataBase* (IDB) volto a fornire le informazioni mancanti nelle statistiche correnti sul fenomeno. Nel 2010 le autorità competenti di 22 Paesi membri hanno lanciato un'azione congiunta per lo sviluppo di un sistema europeo comune di sorveglianza ospedaliera degli infortuni. L'ISS coordina questo progetto in Italia.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono i seguenti:

- definizione di criteri comuni per l>IDB di qualità dei dati (comparabilità e rappresentatività) secondo gli standard del Sistema Statistico Europeo (ESS);
- raccolta dei dati nel database centrale europeo dell>IDB, ospitato dalla CE, DG Salute e Consumatori (DG SANCO);
- fornitura, alla fine dell'anno 2014, da parte di almeno 22 Paesi membri, dei propri dati in modo continuativo al sistema IDB, in ulteriori quattro Paesi dovranno essere implementati piani di sviluppo al riguardo approvati dalle competenti autorità nazionali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il sistema IDB sarà implementato in Italia mediante integrazione con i sistemi di sorveglianza degli incidenti, a partire da quelli domestici e stradali, attivi a livello locale e nazionale. Per gli ospedali che adotteranno le codifiche nazionali semplificate di rilevazione sarà possibile convertire o dati in formato europeo rendendoli comparabili a tale livello. Per tutti i centri di pronto soccorso ospedaliero italiani sarà disponibile un modello semplificato di rilevazione delle cause esterne dei traumatismi e avvelenamenti che inserito nei sistemi informativi correnti renderebbe i loro dati infortunistici comparabili internazionalmente.

### **La contaminazione degli ambienti acquatici da alchilfenoli e altri contaminanti emergenti. Valutazione dell'esposizione e del rischio nell'uomo**

Il progetto prevede due linee di ricerca: la prima sugli alchilfenoli (AF) e la seconda su contaminanti emergenti degli ambienti acquatici

Gli AF sono dei surfattanti non-ionici impiegati in molte attività industriali, agricole e domestiche. Il nonilfenolo (NF) è un contaminante ubiquitario degli ambienti acquatici è altamente lipofilo e si accumula nella fauna acquatica. È un contaminante ubiquitario degli alimenti e i prodotti ittici sono la probabile principale fonte di esposizione per l'uomo (Ferrara *et al.*, 2001, 2005, 2008). È un interferente endocrino, è un promotore tumorale e la UE lo ha inserito tra le sostanze prioritarie e pericolose per l'ambiente acquatico

L'NF è stato inserito nel Piano nazionale triennale di monitoraggio dei contaminanti ambientali in alimenti di origine animale prodotti nei SIN finanziato dal Ministero della Salute.

A seguito dei risultati sulla presenza di AF in tessuto adiposo umano (Ferrara *et al.*, 2011) si ritiene di particolare interesse estendere le indagini anche a sangue e liquido cefalorachidiano umano. Per sviluppare queste attività sono state avviate collaborazioni con il Policlinico Umberto I di Roma, Dipartimento di Fisiopatologia Medica.

Per la seconda linea di ricerca, saranno considerati alcuni farmaci, alcuni ormoni, i perfluorinati e i prodotti fitosanitari con caratteristiche intrinseche di inquinanti delle acque,

la cui rilevanza sanitaria non è sufficientemente definita anche a causa della carenza di informazioni sull'esposizione umana.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il piano di ricerche proposto ha lo scopo di fornire nuovi dati sulla presenza degli AF e dell'NF in particolare, nell'ambiente e del livello di esposizione dell'uomo. Per quanto riguarda il primo gruppo di attività, le indagini permetteranno di stabilire i livelli di contaminazione nelle aree incluse nei SIN e soprattutto sarà possibile valutare l'esposizione dell'uomo associata al consumo di alimenti prodotti all'interno di questi siti e stabilire i potenziali livelli di rischio per la salute della popolazione italiana.

L'indagine dei livelli di APE in tessuti biologici umani, oltre ad aggiungere informazioni importanti per capire il *body burden* di queste sostanze, permetterà di verificare la possibile associazione fra presenza nell'uomo alterazioni del sistema ormonale. A causa della scarsità degli studi disponibili in questo settore, i risultati aggiungeranno informazioni essenziali per stabilire i potenziali rischi per la salute umana.

In relazione alla seconda linea di ricerca, a seguito di un'accurata attività preliminare sui principali inquinanti emergenti appartenenti alle categorie dei farmaci, degli ormoni somministrati come medicinali, di prodotti fitosanitari, saranno selezionati i composti che saranno oggetto dell'indagine. Un'attenta attività di selezione sarà condotta anche sui siti oggetto dello studio, privilegiando le aree costiere.

### **Trasferibilità dei risultati**

Le attività previste nel progetto sui SIN includono la messa a punto di metodi analitici per la determinazione di APE in matrici alimentari e trasferimento alle strutture territoriali che operano nel controllo della qualità degli alimenti (ARPA, IZS, ecc.). I risultati permetteranno la costruzione di un quadro generale a livello nazionale sull'esposizione dell'uomo agli APE attraverso l'ambiente nei siti di interesse nazionale essenziale all'attuazione di politiche di controllo del territorio mirate.

I risultati delle analisi su campioni di tessuti biologici costituiranno la base per la realizzazione di uno studio pilota in collaborazione con il Policlinico Umberto I, Dipartimento di Fisiopatologia Medica, su pazienti affetti da patologie a carico del sistema neuro-endocrino.

Infine le attività di ricerca sulle sostanze emergenti, permetteranno una migliore conoscenza dell'esposizione umana ai contaminanti oggetto dello studio e l'avvio di eventuali studi di approfondimento.

## **La qualità ecologica dei corpi idrici dell'Italia centrale**

Lo scopo di questo progetto di ricerca è lo studio delle componenti biologiche (Direttiva 2000/60 CE) degli ecosistemi acquatici, concentrando l'attenzione sulle comunità diatomiche, supportato dall'analisi delle relazioni tra questi e alcuni indicatori chimico-fisici, chimici e microbiologici e la valutazione delle potenzialità come indicatori biologici delle diatomee per questi ambienti, anche al fine di proporre metodologie di monitoraggio per ottemperare alle richieste della Direttiva Europea 2000/60/CE e individuare eventuali azioni di intervento e risanamento.

In dettaglio gli obiettivi saranno: i) l'analisi della diversità biologica di tali ambienti, con particolare riferimento alla comunità diatomica; ii) l'analisi delle componenti chimico-fisiche, chimiche, microbiologiche e idromorfologiche; iii) l'individuazione di corpi idrici di riferimento, in ottemperanza alle richieste della Direttiva stessa.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati che si vogliono raggiungere in questi primi mesi di lavoro è un'implementazione della conoscenza nella composizione e distribuzione delle comunità di Diatomee Bentoniche e di Macrofite di differenti tipologie di corpo idrico nella Regione Abruzzo.

Il progetto è articolato in tre fasi principali: i) analisi ecologica del bacino Aterno Pescara; sperimentazione di metodologie di campionamento e analisi di laboratorio; ii) ricerca cartografica dei siti di studio; iii) campagna di campionamento con prelievi di acqua e di materiale floristico nei siti selezionati; iv) l'elaborazione grafica e statistica.

### **Trasferibilità dei risultati**

Produzione di valido materiale bibliografico e tecnico scientifico di supporto alle attività di monitoraggio biologico finalizzate alla definizione dello stato ecologico secondo quanto richiesto dalla Direttiva Quadro 2000/60/CE.

### **La sindrome di Cockayne: alterazione della funzionalità mitocondriale e difetti nei processi di riparazione contribuiscono ai processi di invecchiamento precoce**

L'invecchiamento colpisce la maggior parte delle funzioni biologiche. Il declino della riparazione del DNA, l'accumulo di mutazioni, e di disfunzioni metaboliche, sono le principali cause dell'invecchiamento. Le sindromi che presentano difetti nella riparazione del DNA e che mostrano caratteristiche di invecchiamento rappresentano un buon modello per lo studio dei meccanismi biologici alla base dell'invecchiamento precoce.

La sindrome di Cockayne (CS) è una malattia ereditaria multisistemica. Le principali caratteristiche cliniche dei pazienti CS sono: ritardo fisico e mentale, anomalie dello sviluppo, invecchiamento precoce e disfunzioni neurologiche progressive. La maggior parte dei pazienti CS presenta infatti mutazioni in uno di due geni, CSA e CSB, che sono coinvolti nella rimozione di lesioni indotte da luce ultravioletta sul filamento trascritto dei geni attivi, assistendo la RNA polimerasi II nella rimozione dei blocchi trascrizionali indotti dal danno sul DNA.

Studi recenti indicano infatti che le proteine CSA e CSB sono coinvolte anche nella riparazione del danno ossidativo giocando quindi un ruolo importante nella neurodegenerazione (D'Errico *et al. Oncogene* 2007;26:4336).

### **Risultati attesi nel triennio**

Le basi funzionali del coinvolgimento delle proteine CS nella riparazione e nel controllo dello stato redox cellulare e il loro potenziale ruolo nei processi neurodegenerativi e nell'invecchiamento precoce, rimane tuttavia da chiarire.

I principali obiettivi della proposta sono:

- studiare il coinvolgimento delle proteine CSA e CSB nella riparazione del danno ossidativo utilizzando modelli *in vitro* e *in vivo* (fibroblasti umani e murini);
- studiare il ruolo delle proteine CSA e CSB nella regolazione dello stato redox cellulare. Sarà studiato il metabolismo ossidativo (spettri di risonanza magnetica nucleare – RMN o *Nuclear Magnetic Resonance* – NMR), la produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) e la funzionalità mitocondriale;
- analizzare il ruolo delle proteine CS nella riparazione del danno ossidativo nelle cellule target neuronali.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati di questo studio forniranno informazioni significative per la comprensione dei meccanismi molecolari responsabili delle caratteristiche cliniche di questa sindrome ed eventualmente di altre sindromi associate allo stress ossidativo. Una conoscenza dettagliata dei meccanismi di danno e riparazione del DNA e delle loro relazioni con altri processi cellulari fondamentali quali la trascrizione sono di interesse generale per la salute umana fornendo informazioni utili per la comprensione delle cause dell'invecchiamento e della neurodegenerazione in individui "normali".

Oltre che rilevanti per la ricerca di base, alcuni dei risultati ottenuti nel corso di questo progetto potrebbero portare a prodotti di interesse per la nostra industria per le loro ricadute in campo applicativo, in termini di sviluppo di nuovi kit diagnostici e identificazione di nuovi bersagli farmacologici per interventi terapeutici mirati.

### **Laguna di Orbetello**

Aspetti tecnico-scientifici per l'attività di ricerca condotte nell'ambito degli approfondimenti inerenti alla sperimentazione della direttiva 2000/60/CE 23-10\_2000 sulle acque superficiali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Sperimentazione di nuove metodiche biologiche, divulgazione e supporto tecnico-scientifico per la caratterizzazione delle acque superficiali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Metodologie biologiche rivolte alla tutela della salute collettiva e della preservazione delle risorse ambientali per le generazioni future volte anche ad una gestione sostenibile.

### **Prevenzione dei rischi associati all'uso di prodotti per l'infanzia**

Nel progetto sono coinvolti due Reparti del Dipartimento AMPP (Esposizione e rischio da materiali e Meccanismi di tossicità).

I giocattoli e/o prodotti per puericoltura devono essere "sicuri" e quindi non devono presentare rischi per i bambini per i quali il rischio chimico (esposizione a sostanze con potenziale tossico) non è trascurabile. È necessario quindi effettuare una valutazione dei rischi adeguata per un prodotto destinato all'uso da parte di bambini. Il progetto anche mediante studi sperimentali individuerà quali parametri applicare e quali scenari di esposizione definire sviluppando diagrammi a flusso e alberi decisionali che potranno essere applicati quando è necessario stabilire se un prodotto è rischioso e dare indicazioni sulla entità del rischio. Lo schema di *risk assessment* verrà applicato in alcuni esempi reali, individuati *ad hoc* su categorie di prodotti chimici (es. plastificanti, sostanze volatili) presenti in giocattoli, oggetti per puericoltura, articoli scolastici per i quali è necessaria una valutazione del rischio, e per i quali non si dispone né di dati di esposizione sufficienti né di specifici scenari di esposizione e per i quali non sono stati definiti limiti legali di accettabilità.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio:

- elaborazione di Linee guida fruibili per valutare rischi per la salute dei bambini associati all'uso di giocattoli e prodotti di puericoltura;
- identificazione di scenari di esposizione applicabili alla valutazione dei rischi per i bambini;

- indicazione sulle procedure da adottare nei piani di monitoraggio per ottimizzare i controlli e fornire dati utili alla valutazione del rischio;
- esempi pratici di applicazione;
- supporto alle azioni del Ministero delle Comunicazioni.

**Trasferibilità dei risultati**

Pubblicazioni scientifiche.

**Lo stress ossidativo e l'autofagia nell'invecchiamento delle cellule staminali muscolari nella distrofia di Duchenne**

Sebbene la base genetica delle distrofie muscolari sia nota da decenni, il meccanismo patogenetico alla base di queste malattie non è stato ancora chiarito. In particolare, durante la progressione della distrofia muscolare di Duchenne (DMD) il potenziale rigenerativo delle cellule muscolari staminali adulte (cellule satelliti), che rappresentano il *reservoir* fisiologico delle fibre muscolari, è velocemente esaurito determinando una rapida perdita di massa muscolare. Il ruolo cruciale delle cellule satelliti nei processi di rigenerazione compensatoria nel muscolo distrofico è stato chiarito in uno studio recente che evidenzia una perdita precoce della capacità rigenerativa delle fibre muscolari nelle fasi precoci della malattia. Un ambiente altamente rigenerativo, come quello del muscolo distrofico, è caratterizzato da stress ossidativo che a sua volta è legato all'invecchiamento delle cellule staminali e all'autofagia. L'obiettivo principale di questo progetto è la caratterizzazione a livello molecolare della relazione tra stress ossidativo, autofagia, ridotto potenziale rigenerativo delle cellule satelliti e perdita della funzionalità muscolare nella DMD. Tale progetto potrebbe evidenziare il contributo, ancora non noto, sia dello stress ossidativo che del processo autofagico nella DMD e chiarire il loro ruolo nel processo di rigenerazione muscolare.

**Risultati attesi nel triennio**

Il primo obiettivo di questo progetto è quello di capire il ruolo di processi biologici, quali la risposta al danno al DNA, l'autofagia e lo stress ossidativo nella ridotta capacità rigenerativa delle fibre muscolari osservata in pazienti affetti dalla distrofia di Duchenne. La potenziale modulazione di tali processi biologici sarà seguita durante la progressione della malattia. I risultati di questo studio aumenteranno la comprensione a livello molecolare della patogenesi della DMD e permetteranno l'identificazione di nuovi bersagli per interventi terapeutici volti a migliorare le condizioni patologiche dei pazienti nonché a rallentare la progressione della malattia.

**Trasferibilità dei risultati**

La conoscenza più approfondita dei meccanismi molecolari alla base della patogenesi della DMD permetterà l'individuazione di nuovi bersagli terapeutici volti a preservare la massa muscolare e prevenire, o rallentare, l'insorgenza di conseguenze devastanti durante la progressione della malattia.

**Materiali e oggetti con alimenti (MOCA):  
cessione di componenti e rischio per i consumatori**

Il piano svolto all'interno del Reparto Esposizione e rischio da materiali prevede lo studio sperimentale di fenomeni di migrazione da Materiali e Oggetti a Contatto con Alimenti (MOCA). Vengono individuate due principali aree:

- migrazione di costituenti (es. plastificanti, antiossidanti ecc.);

- migrazione di prodotti di degradazione del materiale (es. prodotti di idrolisi prodotti di ossidazione metalli).

Verrà data particolare attenzione alle sostanze di peso molecolare inferiore a 1.000 Da per le quali non esistono limiti di sicurezza già stabiliti.

Verrà effettuata una valutazione del rischio applicando parametri di esposizione specifici per i tipi di alimenti in contatto con il materiale (es. omogeneizzati, alimenti conservati in olio, ecc.).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Parametri di riferimento per giudizi di conformità.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Pubblicazioni scientifiche.

### **Dati di migrazione su sostanze per le quali non è ancora stabilito un limite di sicurezza**

Metodologie analitiche per la definizione della bioaccessibilità dei microinquinanti inorganici da applicare nei siti contaminati.

Il progetto è indirizzato alla valutazione del parametro frazione bioaccessibile dei microinquinanti metallici presenti nel suolo e/o nei sedimenti, ai fini della valutazione del rischio sanitario per l'uomo e ha come finalità la ricerca di un metodo rapido ed economico da applicare in via routinaria nella fase di caratterizzazione delle aree contaminate sottoposte a bonifica.

Negli ultimi tre decenni, in letteratura, sono stati proposti molti metodi alternativi per la valutazione della frazione "biodisponibile" basati su estrazioni chimiche, sia singole che a vari step (schemi di estrazione sequenziale), tali metodi permettono la valutazione della mobilità dei contaminati nell'ambiente.

Dopo un'attenta analisi dei vari metodi riportati in letteratura, ci si propone di studiare alcuni differenti schemi di estrazioni chimiche e metodi di speciazione, in particolare:

- schema di estrazione sequenziale BCR modificato (Mossop *et al.*, 2003);
- schema di estrazione proposto da Wenzel *et al.* (2001);
- speciazione nelle diverse forme chimiche;
- studio della frazione volatile (es. mercurio).

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi dall'attività di questo progetto sono quelli di fornire una lista di metodi analitici di facile esecuzione per la valutazione della bioaccessibilità per specifiche vie di esposizione (ingestione e/o inalazione) di microinquinanti inorganici in matrici solide (terreni e/o sedimenti) da essi contaminati.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tale progetto prevede la collaborazione con le ARPA regionali, con l'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) e con i Laboratori accreditati autorizzati all'esecuzione dei Piani di caratterizzazione dei siti contaminati.

Metodologie per la valutazione dei criteri di qualità economica delle acque, per le sostanze chimiche, con particolare riferimento alle esigenze poste dall'attuazione della direttiva quadro sulle acque 2000/60/CE.

**Realizzazione da parte di ISS di un software (con relativo manuale di istruzioni) compatibile con il Sistema Informativo Nazionale per la Tutela delle Acque Italiane (SINTAI) di ISPRA, per la definizione dello stato ecologico dei corpi idrici fluviali basato sulle comunità diatomiche**

Il software realizzato da ISS permetterà la classificazione dello stato ecologico dei corpi idrici fluviali basandosi sull'analisi della comunità diatomica.

Attività formativa a carattere nazionale da parte di ISS per gli operatori del sistema delle Agenzie nel campo del bio-monitoraggio e della tutela delle acque interne. Nell'ambito di tale formazione verranno presi in considerazione i seguenti punti: Seminari teorico-pratici relativi alla componente diatomica e incontri a carattere divulgativo per la presentazione del sistema operativo realizzato da ISS. Sostegno agli operatori delle ARPA/Agenzia Regionale per a Protezione dell'Ambiente – ARTA/APPA per la comprensione e l'utilizzo del software realizzato per la classificazione dei corpi idrici fluviali basato sulle comunità diatomiche. Supporto tecnico-scientifico da parte di ISS ad ISPRA nelle attività del Gruppo di Lavoro per l'implementazione della Direttiva 2000/60/CE "Fiumi e Laghi". Tale supporto sarà rivolto in linea generale alla armonizzazione dei metodi biologici per il monitoraggio delle acque superficiali, e nello specifico alla pianificazione territoriale dei monitoraggi e alla definizione dei siti di riferimento delle componenti diatomica.

**Risultati attesi nel triennio**

Verrà creato un database contenente le specie diatomiche italiane con i relativi coefficienti per il calcolo dell'indice, i valori di riferimento per la valutazione dello stato ecologico e i limiti delle classi di qualità necessari. Il software verrà realizzato utilizzando i dati raccolti.

Saranno organizzati corsi di formazione per la presentazione e utilizzo del software ai tecnici delle ARPA/APPA. Sarà fornito supporto tecnico alle ARPA/APPA attraverso corsi teorico/pratici.

L'ISS parteciperà ai Gruppi di Lavoro, alle riunioni e alle Commissioni per l'implementazione e intercalibrazione della Direttiva Quadro.

**Trasferibilità dei risultati**

La realizzazione del software e il supporto tecnico alle ARPA/APPA, permetteranno di ottenere nuovi dati sulle comunità diatomiche necessari per la validazione del metodo biologico *Intercalibration Common Metrics Index*, operazione richiesta all'interno dell'attività di implementazione della Direttiva 2000/60/CE.

**Monitoraggio della contaminazione da cianotossine nei laghi di Occhito e Pertusillo: valutazione del rischio sulla fauna ittica degli invasi e delle zone limitrofe**

Caratterizzazione delle cianofite nei laghi di Occhito e del Pertusillo nelle Regioni Puglia e Basilicata, al fine di individuare la presenza di tossine algali del tipo microcistine e cilindrospermopsine nelle acque e nei tessuti di pesci e molluschi bivalvi.

Messa a punto e validazione di un metodo analitico di screening ELISA per la determinazione di cilindrospermossine in acqua, pesci e molluschi bivalvi e sviluppo di un metodo di conferma mediante spettrometri di massa ibridi.

Monitoraggio della contaminazione da microcistina, e cilindrospermossina nei laghi di Occhito e del Pertusillo.

Valutazione del rischio per la salute umana.

### **Risultati attesi nel triennio**

Nel corso del presente progetto verrà effettuata la caratterizzazione delle principali cianofitiche e ricercata la presenza di biotossine del tipo microcistine e cilindrospermopsine nelle acque dei due invasi artificiali e nei tessuti di pesci e molluschi bivalvi. Saranno a riguardo sviluppati e validati i metodi di prova di screening ELISA per le cilindrospermopsine in campioni di acqua e prodotti ittici e sarà estesa la validazione eseguita sulla microcistina ad altre matrici, quali acqua, con i relativi metodi di conferma.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati della ricerca realizzeranno il controllo di siti acquatici compromessi da eutrofizzazione e adibiti ad uso potabile, con la contemporanea creazione di capacità tecniche locali per la rilevazione, la verifica e la gestione di situazioni di potenziale rischio per la salute umana.

## **Poliposi associata a MUTYH: studi *in vitro* e *in vivo* per determinare correlazioni genotipo-fenotipo**

Il gene del BER MUTYH è coinvolto nel mantenimento della stabilità del genoma dal momento che elimina delle lesioni pre-mutagene indotte dal danno ossidativo al DNA. La lesione 8-oxoG è uno dei maggiori prodotti di ossidazione nel DNA in grado di accoppiarsi sia con la citosina che con la adenina. Questi *mismatche* 8-oxoG:A, se non riparati dalla glicosilase MUTYH hanno come conseguenza la formazione di trasversioni GC->TA. In accordo con questa osservazione l'inattivazione del gene di *E. coli* MutY ha come conseguenza un aumento nel tasso di mutazione di circa 10 volte con accumulo di questo tipo di mutazioni missenso. Nell'uomo mutazioni bialleliche in MUTYH causano una sindrome autosomale recessiva denominata *MUTYH-Associated Polyposis* (MAP). Questa sindrome è caratterizzata dallo sviluppo di una poliposi del colon di tipo adenomatoso (tra 10 e 100 polipi) e un aumentato rischio di carcinoma coloretale (CRC) nella maggioranza dei casi in assenza di mutazioni germinali nel gene APC.

### **Risultati attesi nel triennio:**

La caratterizzazione biochimica delle mutazioni nel gene MUTYH ha dimostrato che le varianti identificate nei pazienti affetti da MAP hanno un effetto deleterio sulla attività enzimatica della proteina (cioè nel tasso di rimozione della adenina dai *mismatche* 8-oxoG:A). La maggior parte degli studi sono stati svolti utilizzando proteine purificate di origine batterica o murina, mentre pochi studi hanno utilizzato la proteina umana. Inoltre numerosi pazienti MAP sono portatori di due mutazioni diverse rendendo questo tipo di analisi biochimica in saggi *in vitro* con proteine purificate molto complicata. Ci proponiamo di utilizzare dei nuovi approcci sperimentali per studiare gli effetti biologici di queste varianti, peraltro poco conosciuti. Infine poco si sa sulle correlazioni genotipo-fenotipo clinico delle varie mutazioni nel gene MUTYH e sulla risposta alle terapie di questi pazienti. Questo progetto si propone di riempire queste lacune.

### **Trasferibilità dei risultati**

Questo progetto si propone di ottenere nuove informazioni di tipo meccanicistico sulle conseguenze biologiche associate alle mutazioni nel gene MUTYH al fine di ottenere un miglior *counseling* genetico dei pazienti stessi e una migliore caratterizzazione del decorso clinico della malattia MAP.

## **Nanoparticelle ingegnerizzate: relazione tra le caratteristiche fisico-chimiche e le proprietà tossicologiche**

Numerosi studi tossicologici hanno mostrato che l'attività biologica delle nanoparticelle ingegnerizzate (NP) non può essere predetta a partire dalle proprietà delle sostanze costituenti. Nella valutazione del rischio derivante dall'esposizione e uso delle NP è quindi fondamentale identificare quali caratteristiche fisico-chimiche sono in grado di indurre effetti avversi nella salute della popolazione esposta.

Uno dei problemi legati alla valutazione del rischio derivante dall'esposizione a NP è rappresentato dalla messa a punto di opportuni protocolli di dispersione al fine di ottenere una migliore caratterizzazione delle NP. Un ulteriore problema è rappresentato dall'effettiva capacità dei test, attualmente validati e riconosciuti dalle istituzioni internazionali, di identificare il potenziale citotossico e genotossico delle NP. In quest'ambito si colloca l'attività di questa linea di ricerca che, in collaborazione con altri Reparti del Dipartimento AMPP e all'interno di progetti di Ricerca finanziati dal Ministero della Salute, si propone di sviluppare metodi validati e/o alternativi per la determinazione delle caratteristiche fisico-chimiche e della potenziale attività genotossicologica delle particelle di  $\text{TiO}_2$ , Ag, in scala micrometrica e nanometrica. Scopo dell'attività di ricerca sarà quindi lo sviluppo di metodi per caratterizzare le NP mediante microscopia elettronica analitica e lo studio della relazione tra le loro proprietà fisico-chimiche e tossicologiche.

### **Risultati attesi nel triennio**

I principali risultati attesi sono:

- messa a punto di protocolli di dispersione dei nanomateriali selezionati ( $\text{TiO}_2\text{NP}$  e Ag NP) per la caratterizzazione e per la valutazione del loro potenziale cito/genotossico;
- determinazione delle caratteristiche fisico-chimiche dei nanomateriali oggetto di studio sia "così come ricevuti" dai fornitori che in diversi mezzi biologici: dimensione, distribuzione dimensionale, forma, numero di particelle, area di superficie, composizione;
- identificazione delle proprietà chimico-fisiche in grado di modulare l'effetto citotossico e genotossico dei nanomateriali utilizzati nello studio.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati prodotti consentiranno di:

- dare un contributo alla messa a punto di linee guida specifiche per i nanomateriali;
- fornire un supporto alla classificazione ed etichettatura dei nanomateriali basata sulle proprietà chimico-fisico;
- verificare l'applicabilità ai nanomateriali dei saggi tossicologici esistenti.

## **Osservatorio permanente di sorveglianza sull'uso dei dispositivi di sicurezza (ULISSE)**

Il Piano Nazionale della Sicurezza Stradale ha da tempo messo in luce come far sì che l'uso dei dispositivi di sicurezza passiva (casco, cinture e seggiolini per bambini) pervenga a livelli elevati, senza distinzione su tutto il territorio nazionale, sia una delle azioni più importanti in termini di costi/efficacia per ridurre la mortalità e la morbosità secondarie ad incidente stradale. Monitorare a livello nazionale l'uso dei dispositivi di sicurezza passiva (casco, cinture e seggiolini) e altri comportamenti di interesse per la sicurezza stradale è importante nella gestione di un problema complesso qual è la sicurezza stradale, dove l'armonizzazione di azioni diverse appare essenziale. ULISSE è un sistema di monitoraggio a carattere nazionale che si propone come strumento informativo per avere obiettive indicazioni sull'utilizzo dei dispositivi di sicurezza.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il sistema ULISSE, oltre all'ovvia necessità di quantificare localmente l'uso, si pone due obiettivi principali:

- raccogliere informazioni che permettano di valutare con ragionevole affidabilità l'efficacia di azioni volte ad aumentare la prevalenza d'uso dei dispositivi di sicurezza;
- far sì, nel contempo, che possa essere possibile separare – a fronte di una variazione osservata – effetti indotti da azioni di carattere globale da quelli indotti da azioni attuate localmente. Il primo obiettivo può essere raggiunto dal sistema con l'analisi statistica nel tempo delle prevalenze d'uso dei dispositivi nello specifico territorio. Il secondo, confrontando le variazioni nel tempo in tale territorio con la variazione media (o mediana) di tutti i territori che partecipano al sistema, integrando la lettura con informazioni specifiche sulle attività promosse sul territorio in esame.

### **Trasferibilità dei risultati**

Gli operatori di territorio potranno trovare nel sistema ULISSE indicazioni preziose per il proprio lavoro in quanto per quel che riguarda il monitoraggio locale e la lettura dei risultati ivi ottenuti in un contesto più generale, il sistema potrà essere in grado di fornire gli elementi necessari; per quanto riguarda la rappresentatività del sistema, un adeguato campionamento per numero e ubicazione dei territori monitorati permetterà di pervenire a stime provinciali rappresentative, considerando la provincia come monade del modello multistadio applicato per la stima delle prevalenze nazionali e di macroarea. La prevalenza d'uso dei dispositivi di sicurezza costituisce informazione fondamentale per il Ministero delle Infrastrutture e dei Trasporti (finanziatore del progetto) nella formulazione dei propri piani di prevenzione degli incidenti e valutazione delle azioni.

## **Patogeni virali emergenti nelle acque reflue e superficiali**

L'efficienza della depurazione delle acque reflue urbane rappresenta una base essenziale della strategia adottata in tutto il mondo per massimizzare i benefici dell'utilizzo della risorsa idrica e nel contempo proteggere l'ambiente e la salute pubblica. Verranno studiate le contaminazioni virali dei fiumi Po e Dora Riparia e gli impianti di depurazione dei reflui urbani di Torino e Collegno. Tra i virus enterici umani considerati emergenti nei Paesi industrializzati vi sono i NoV e il virus dell'Epatite E (HEV). I NoV rappresentano un importante problema di sanità pubblica nel mondo e nei Paesi industrializzati e sono tra i più comuni agenti virali responsabili di gastroenteriti epidemiche e sporadiche in tutti i gruppi di età. Il virus dell'HEV rappresenta la principale causa di epatite non-A, non-B nel mondo e l'acqua contaminata da feci è il principale veicolo di infezione. Poiché entrambi i virus non crescono sulle colture cellulari, si usano generalmente gli enterovirus come indicatori virologici.

### **Risultati attesi nel triennio**

Le indicazioni sulla capacità di abbattimento dei virus negli impianti di depurazione della città di Torino, potranno suggerire più idonee strategie volte al miglioramento della qualità della depurazione dei reflui urbani. Il georeferenzamento di dati analitici, demografici e pressione zootecnica, aiuterà a studiare la dinamica delle contaminazioni dell'acqua superficiale e depurata.

### **Trasferibilità dei risultati**

La sorveglianza di patogeni emergenti darà utili indicazioni al sistema di sorveglianza delle malattie infettive per la preparazione di nuovi vaccini e per il miglioramento di linee guida per la tutela della salute pubblica.

## **Prevenzione degli incidenti domestici da ustione nei bambini – Percorso educativo nelle scuole**

In Italia muoiono circa 400 persone all'anno per ustioni, oltre il 70% delle quali in ambito domestico. In particolare, i pazienti tra 0 e 12 anni rappresentano il 35% dei ricoveri presso i Centri Ustioni, prevalentemente tra 1 e 7 anni. Le ustioni coinvolgono il bambino sia dal punto di vista fisico che psico-sociale, e si può stimare un costo diretto di assistenza sanitaria a carico dell'SSN di almeno 15 milioni di euro all'anno per le sole ustioni pediatriche.

Il bambino può essere educato, attraverso modalità e strumenti linguistici ad esso consoni, a prevenire alcune tra le più importanti situazioni a rischio di ustione, mentre il coinvolgimento degli adulti rappresenta un fondamentale passo per prevenire i più comuni incidenti domestici, e quindi anche le ustioni. Il presente progetto propone pertanto un percorso didattico per la prevenzione degli incidenti domestici da ustione (norme di primo soccorso e buone pratiche). Il progetto si rivolge agli alunni delle scuole dell'infanzia e delle scuole primarie (3-10 anni) delle principali città italiane e ai rispettivi docenti e ai familiari degli alunni. Saranno coinvolte otto principali città italiane sedi dei Centri Grandi Ustioni e verrà messo a punto un kit sperimentale che comprenderà materiale didattico/educativo specifico per i diversi target (alunni, genitori, insegnanti), il quale sarà utilizzato per il modulo di formazione che si svolgerà nelle classi di ogni scuola partecipante al progetto.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto prevede la partecipazione e il coinvolgimento attivo al modulo di formazione di circa 500 tra alunni e genitori provenienti dagli Istituti scolastici aderenti al progetto. Ci si attende inoltre che, attraverso l'analisi del materiale valutativo (questionario) pre-post intervento, l'attuazione del modulo di formazione porti ad un significativo cambiamento nei soggetti partecipanti, in termini di informazioni e di atteggiamenti acquisiti sui comportamenti a rischio per gli incidenti di ustione e sulle principali norme di primo soccorso.

### **Trasferibilità dei risultati**

Il Kit didattico/educativo, appositamente elaborato per il presente progetto, sarà reso liberamente distribuibile via web, e si presterà alla disseminazione e all'auto-disseminazione presso le scuole del territorio nazionale.

## **Prodotti fitosanitari: validazione di metodi analitici per la determinazione dei residui in matrici vegetali**

L'impiego dei prodotti fitosanitari in agricoltura può comportare la presenza negli alimenti di residui. I limiti massimi di residuo (LMR) tollerati sono attualmente armonizzati dal Reg. 396/2005/EC.

Il Ministero della Salute stabilisce annualmente un piano nazionale di monitoraggio per verificare il livello di residui cui è esposta la popolazione a seguito dell'ingestione di alimenti, tendente anche a verificare che non siano stati effettuati trattamenti non autorizzati sul territorio italiano.

Il superamento dell'LMR è un reato penale per il detentore/produttore della merce, il quale ha la possibilità di richiedere un'analisi di revisione, effettuata presso il Reparto Antiparassitari.

Il Reparto è anche sede dell'LNR per i residui di fitofarmaci in matrici ortofrutticole e in tal veste ha il compito del coordinamento tecnico/scientifico dei laboratori italiani che svolgono controlli ufficiali relativi ai residui di fitofarmaci in matrici alimentari.

Per i compiti specificati il Reparto Antiparassitari ha necessità di dotarsi di un sistema di qualità e di essere accreditato ai sensi della norma ISO17025:2005.

È necessario disporre di metodi analitici che possano essere applicati alle più varie combinazioni alimento/pesticida in special modo per quanto riguarda le molecole “nuove” e gli alimenti importati da Paesi extraeuropei nei quali potrebbero essere presenti residui di sostanze non ammesse in Europa.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Validazione di metodiche multiresiduo, per i vari alimenti di origine vegetale, basate sul metodo normato (UNI EN 15662/2009), *Quechers*, che potranno quindi essere applicate alle attività istituzionali del Reparto.

I metodi così sviluppati saranno dimostrati applicabili presso il Reparto Antiparassitari testando numerose combinazioni sostanza attiva/matrice, prendendo in considerazione molecole afferenti alle varie classi di pesticidi: insetticidi (organoclorurati, organofosforici, N-metil-carbammici, neonicotinoidi, piretroidi); fungicidi (varie classi chimiche); erbicidi (varie classi chimiche) e verificando che le prestazioni dei metodi applicati in Reparto siano comparabili con le prestazioni dichiarate dal metodo *Quechers* da cui sono derivati.

I risultati e le esperienze acquisite nel corso dell'attività di validazione potranno essere trasferite ai laboratori ufficiali di analisi (ARPA, APPA, ASL, IZS) ed essere di valido supporto per la risoluzione di particolari e specifiche esigenze analitiche che possono presentarsi nel corso dell'attività di controllo.

Inoltre dai risultati dei piani di monitoraggio sarà possibile valutare l'esposizione dei consumatori ai residui di fitofarmaci attraverso la dieta confrontando i valori di NEDI, ricavabili dai dati di monitoraggio, con le ADI, definite dalla Commissione Consultiva per i Prodotti Fitosanitari o raccolte dalla letteratura.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Lo sviluppo e la validazione di metodi multiresiduo per l'analisi dei residui di fitofarmaci in matrici alimentari sarà di supporto alle attività istituzionali del Reparto Antiparassitari per quanto riguarda l'esecuzione delle analisi di revisione e per le attività di competenza dell'LNR-FV.

Inoltre l'attività portata avanti potrà essere di supporto per i laboratori ufficiali italiani (ARPA, APPA, ASL, IZS) nello svolgimento delle loro attività di controllo sul territorio italiano.

Eventuali situazioni di rischio per il consumatore che si evidenzieranno nel corso delle indagini saranno sottoposte all'attenzione dell'autorità sanitaria.

### **Progetto “Osservatorio Permanente CA.PR.I. – Campagne di Prevenzione degli Incidenti”**

Ogni anno, in Italia, gli incidenti che hanno luogo negli ambienti di vita (strada, casa, sport e tempo libero), causano ingenti danni in termini di vite perse, feriti e invalidi, ma anche in termini di costi economici e sociali. Per porre rimedio a questi eventi, numerosi enti pubblici e privati organizzano iniziative di prevenzione a vari livelli, tra cui campagne di comunicazione e interventi di educazione nelle scuole. Tuttavia, non esistono in genere indicatori sicuri sulla validità delle strategie di prevenzione relative al comportamento umano e, in genere, non si può disporre di informazioni specifiche, complete e reperibili sulle iniziative già condotte nei medesimi ambiti. Inoltre, non esistono dati in Italia sulla distribuzione delle iniziative di prevenzione dei comportamenti a rischio e se queste siano o meno correlate ad una minore presenza di eventi negativi a livello epidemiologico. Il progetto CA.PR.I. prevede pertanto la costituzione di un archivio delle iniziative di prevenzione condotte in Italia in ambito accidentologico negli ambienti di vita. Tale archivio costituisce il nucleo centrale di un Osservatorio permanente per il monitoraggio e l'analisi

delle campagne di comunicazione e degli interventi di educazione alla sicurezza nelle scuole in ambito domestico, stradale, dello sport e del tempo libero. L'archivio è attualmente già in corso di realizzazione, con la presenza di numeroso materiale e di un data base elaborato *ad hoc* per l'analisi dei dati.

**Risultati attesi nel triennio**

L'archivio conterrà il materiale inerente a tutte le iniziative (campagne di informazione, educazione, comunicazione, condotte ad ogni livello e organizzate da enti pubblici e privati) condotte in Italia, dal 1980 ad oggi, sulla prevenzione degli incidenti stradali, domestici, dello sport e del tempo libero e sulla prevenzione delle patologie alcol correlate. Tale materiale sarà analizzato per permettere un più facile confronto tra i risultati dell'Osservatorio (in particolare relativi alla distribuzione geografica delle iniziative di prevenzione e delle loro tipologie), in modo da studiarne la possibile valutazione in termini di efficacia, mediante confronto con le evidenze epidemiologiche esistenti. Sarà inoltre possibile confrontare le modalità con cui sono state condotte le campagne di prevenzione nel corso degli ultimi decessi, sia in termini di tipo di immagini e di linguaggio utilizzato, sia in termini di strategie prese in considerazione nelle singole iniziative.

**Trasferibilità dei risultati**

Possibilità di disseminazione delle metodologie relative alle specifiche azioni di prevenzione adottate e di scambio delle informazioni tra gli operatori di prevenzione. definizione di standard di qualità e di valutazione dell'efficacia degli interventi di prevenzione.

**Protocollo d'intesa tra L'Università Europea di Roma e l'ISS**

Verrà instaurato un rapporto di collaborazione finalizzato allo sviluppo di azioni e attività progettuali relative alla valorizzazione, alla tutela e alla fruizione ampia e diversificata del patrimonio naturale, paesaggistico e territoriale in un quadro di protezione dell'ambiente e della salute dei cittadini che di esso fruiscono.

**Risultati attesi nel triennio**

Realizzazione di pubblicazioni scientifiche e materiale tecnico-scientifico sui temi sopra descritti.

**Trasferibilità dei risultati**

I risultati della ricerca contribuiranno a creare capacità tecniche per la verifica e la rilevazione di situazioni ambientali di potenziale rischio per la salute umana.

**Qualità delle acque industriali utilizzate nel settore dei dispositivi medici (DM)**

Redazione di linea guida e attività scientifica nell'approfondire le conoscenze dell'uso delle acque nei processi industriali oltre ad attività prenormativa.

**Risultati attesi nel triennio**

Stato dell'arte con l'ausilio della banca dati del Ministero della Salute e ai sensi delle direttive vigenti sui DM verranno individuati dei processi industriali per la produzione di DM dove l'acqua ha un ruolo centrale e indagati.

**Trasferibilità dei risultati**

L'esperienza di ricerca potrà fornire, tramite i risultati della sperimentazione e della linea guida utile supporto alle attività dell'Organismo Notificato.

### **Qualità delle acque sotterranee e in distribuzione relativamente a rischio di contaminazione da esaclorocicloesano (HCH)**

In accordo con le finalità della Convenzione nell'ambito della quale è generato il presente protocollo, le attività saranno focalizzate sullo studio del corpo idrico e delle acque distribuite mediante i sistemi idrici già operanti sul territorio, per garantire la qualità delle acque sotterranee e in distribuzione relativamente alla presenza di HCH e, laddove necessario, sulla gestione dei possibili rischi a prevenzione dell'esposizione delle popolazioni interessate

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Raccolta di dati preliminari, caratterizzazione delle variabili sperimentali e pianificazione dello studio. Mediante visite nelle aree di interesse viene caratterizzata la tipologia di risorse idriche oggetto di studio e delle filiera idrica di distribuzione raccogliendo anche i dati disponibili sull'emungimento e consumi idrici, al fine di definire le variabili di studio.
- Definizione del piano di monitoraggio, criteri e procedure di campionamento (in collaborazione con ASL competente).
- Ottimizzazione delle risorse strumentali, validazione dei materiali e metodi.
- Monitoraggio del corpo idrico e delle acque distribuite da sistemi idrici già operanti sul territorio, per tenere sotto controllo la qualità delle acque sotterranee e in distribuzione relativamente alla presenza di HCH e, laddove necessario, sulla gestione dei possibili rischi a prevenzione dell'esposizione delle popolazioni interessate (in collaborazione con ASL competente).

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti nell'ambito di questo progetto sono direttamente trasferibili al committente, alle strutture sanitarie di controllo e ai sistemi di gestione idrica, in forma di rapporti tecnici e/o in pubblicazioni scientifiche.

### **Ricostituzione della pelle *in vitro* da cellule staminali per la rigenerazione cutanea da utilizzare in clinica dermatologica**

Il progetto ha lo scopo di sviluppare modelli tissutali da utilizzare in clinica dermatologica. Questo progetto si propone di impiegare cellule staminali epidermiche e mesenchimali nei processi di rigenerazione cutanea, per migliorare gli attuali protocolli clinici in modo da sviluppare approcci innovativi in terapie geniche.

L'accumulo di cellule senescenti nei tessuti durante l'invecchiamento contribuisce a ridurre la loro capacità rigenerativa. L'invecchiamento intrinseco delle cellule staminali può essere ascritto a molti fattori tra cui l'accumulo di ROS, il declino delle attività antiossidante e la riduzione dei sistemi di riparazione del DNA. Questi fattori quindi possono contribuire all'aumento della senescenza e all'esaurimento delle cellule staminali nei tessuti epidermici durante l'invecchiamento.

A tale scopo si confronteranno i dati ottenuti utilizzando sia cellule staminali prelevate da tessuti di donatori giovani che da anziani. Verranno misurati i livelli di ROS, l'ossidazione del DNA e l'espressione di diversi geni della riparazione mediante tecniche di *real time-PCR*. Verrà anche misurata l'attività funzionale di molte proteine della riparazione in funzione dell'invecchiamento utilizzando saggi *in vitro*.

### **Risultati attesi nel triennio**

Verranno misurati i livelli di ROS utilizzando come probe la 2', 7'-diclorofluoresceina diacetato (H2 DCFDA) in cheratinociti isolati da donatori giovani e meno giovani e saranno quantizzati mediante citometria a flusso.

Saranno inoltre determinati i livelli della base ossidata 8-OH-dG mediante HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*)-ED come descritto in Cappelli (Cappelli *et al. Biochimica* 2000;39:10408).

Attraverso l'analisi dell'espressione genica, si analizzerà l'espressione di enzimi coinvolti nella riparazione del DNA quali il BER, il sistema di riparazione di più nucleotidi (NER) e la MMR. A tale scopo l'RNA totale sarà estratto da campioni cellulari utilizzando il kit mini RNeasy. Il cDNA sarà ottenuto utilizzando il kit *High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystem)*. Il cDNA sarà utilizzato per la determinazione dei livelli di espressione dei geni selezionati dei diversi sistemi di riparazione del DNA. I test di riparazione del DNA *in vitro* verranno eseguiti come precedentemente descritto (Fortini *et al. Biochimica* 1998;17:3575).

### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto ha lo scopo di sviluppare nuovi sistemi innovativi di ingegneria tissutale da utilizzare in clinica dermatologica. Questi metodi, utilizzando cellule staminali epidermiche e mesenchimali importanti nei processi di rigenerazione cutanea, saranno fondamentali per migliorare gli attuali protocolli clinici già disponibili e permetteranno di sviluppare approcci innovativi da utilizzare in terapia cellulare.

## **Rilevamento e valutazione della presenza di micobatteri ambientali non-tubercolari in acque da destinare e destinate al consumo umano**

L'attività si colloca in un quadro di studio/ricerca che prevede, sulla base dell'esigenza espressa dal Servizio interzonale PAAP – Esame Progetti, Abitabilità, Acque Potabili dell'ASL RMC, d'intesa con ACEA ATO2, lo svolgimento di analisi di controllo della qualità microbiologica dell'acqua per il rilevamento e l'identificazione di micobatteri non-tubercolari in acque da destinare e destinate al consumo umano, oltre che la formulazione di indicazioni e contributi utili alla redazione di protocolli analitici per gli operatori del settore. Il parametro micobatteri non-tubercolari non è stato al momento regolamentato da alcuna normativa del settore e le procedure analitiche nella matrice acqua sono elaborate e richiedono l'esecuzione da parte di personale specializzato. L'esperienza maturata dall'UO dell'ISS permette anche di formare il personale dei Laboratori di ACEA ATO2, contribuendo quindi allo svolgimento di attività sia di controllo sia di formazione che sono cardine delle attività dell'ISS per la prevenzione e tutela della salute pubblica.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati che ci si attende possano essere raggiunti riguardano:

- produzione di protocolli di indagine, indirizzi, orientamento e conoscenze riguardanti micobatteri ambientali non-tubercolari nelle acque potabili, in considerazione della attuale carenza di informazioni sulla loro eventuale presenza nelle acque in Italia;
- condivisione di esperienze e stimolo per la crescita professionale per gli operatori addetti ai controlli analitici della qualità delle acque potabili. I risultati finali e parziali di tutte le attività previste saranno pienamente condivisi da tutti gli enti coinvolti.

### **Trasferibilità dei risultati**

L'attività, in cui l'ISS ha compiti non solo di studio, ma anche di indirizzo, orientamento e diffusione di conoscenza, permetteranno di svolgere un ruolo significativo nella impostazione dei controlli di verifica della qualità delle acque potabili, ma anche nella formulazione di linee guida per la determinazione di micobatteri ambientali non-tubercolari

nelle acque, fornendo una base conoscitiva scientifica alle istituzioni preposte ai controlli ambientali e sanitari per la tutela della salute della popolazione.

### **Riparazione del danno ossidativo nel DNA: meccanismi di base e analisi funzionale delle proteine**

Nel triennio 2011-2013 proseguiranno gli studi sull'attività funzionale di proteine della riparazione del danno ossidativo nel DNA e coerentemente con l'indirizzo seguito negli anni precedenti gli studi saranno rivolti a:

- identificazione dei meccanismi biofisici e biochimici
- studio sui mutanti della proteina MUTYH con particolare riguardo al caso di mutazioni presenti in domini funzionali coinvolti nell'interazione con altre proteine della riparazione. Si estenderà lo studio dell'attività al caso in cui siano presenti lesioni multiple (lesioni ossidative e intermedi della riparazione). Infine, poiché molte proteine della riparazione del danno ossidativo sono suscettibili alla presenza di ioni metallici, saranno studiate alcune proteine del NER e/o del BER che contengono un elemento strutturale chiamato *zinc finger*, fondamentale nel mantenimento di interazioni corrette sia DNA-proteina che proteina-proteina.
- messa a punto e applicazione di saggi funzionali *in vitro*
- superamento, allo scopo di disporre di un saggio di attività glicosilica adatto a studi di *high throughput screening*, del modello sperimentato negli anni precedenti, basato su analisi di oligonucleotidi fluorescenti "lineari" su gel, e messa a punto di un sistema che impieghi *molecular beacon* e *plates multiwells*. Il metodo si presta alla rivelazione contemporanea dell'attività di riparazione di enzimi diversi utilizzando una tecnologia a multicolori.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Gli studi al primo punto saranno sviluppati con le metodologie già utilizzate dal nostro gruppo essenzialmente fluorimetria, risonanza plasmonica di superficie ed elettroforesi ed effettuati su proteine ricombinanti, purificate in laboratorio. Lo studio sulle *zinc finger protein* prevede anche l'impiego della risonanza elettronica paramagnetica.

Ci si attende una caratterizzazione dei meccanismi di base nella interazione tra il DNA contenente lesioni ossidative e/o suoi intermedi di riparazione e alcune proteine del BER (OGG1 e MUTYH) o del NER (XPA). Ci si attende che lo studio sulle lesioni multiple possa dare informazioni sui meccanismi di *cross-talk* tra i diversi *pathway* della riparazione.

Gli studi al secondo punto saranno sviluppati essenzialmente utilizzando un fluorimetro adatto ad analisi quantitativa di molti campioni. Il risultato atteso è la stessa messa a punto del sistema e la verifica della robustezza del saggio su un campione già analizzato con metodi già verificati.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Pubblicazioni scientifiche.

### **Rischio genotossico nella filiera alimentare**

La dieta rappresenta di gran lunga la maggiore via di esposizione a sostanze xenobiotiche, comprese quelle con caratteristiche genotossiche, che possono essere presenti negli alimenti come componenti naturali o come sottoprodotti dei processi di conservazione o cottura. Gli studi epidemiologici mostrano una consistente associazione tra cancro e dieta, e studi recenti hanno mostrato che potenti mutageni e cancerogeni quali l'acrilamide e il furano possono formarsi in una varietà di matrici alimentari durante i processi di conservazione. Questa linea

di ricerca rappresenta la continuazione di una attività pluriennale finalizzata alla identificazione e caratterizzazione del rischio genotossico di contaminanti/*by-product* e sostanze presenti naturalmente o aggiunte intenzionalmente agli alimenti.

In particolare, nel triennio indicato l'attività prevista seguirà le seguenti direttrici:

- caratterizzazione del potenziale genotossico *in vivo* delle micotossine del genere *Alternaria*, su cui esistono limitate evidenze di attività cancerogena nei roditori;
- caratterizzazione del potenziale genotossico *in vivo* del dolcificante aspartame, la cui innocuità è stata recentemente messa in questione da controverse indicazioni su un possibile effetto cancerogeno;
- valutazione, attraverso approcci sperimentali e non sperimentali, degli effetti dei micronutrienti sulla stabilità del genoma e altre patologie.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I principali risultati attesi sono i seguenti:

- caratterizzazione del potenziale genotossico *in vivo* delle micotossine del genere *Alternaria* sp. (*alternariolo*), con particolare riferimento agli effetti genotossici indotti dalla tossina nel tessuto bersaglio dell'effetto cancerogeno nei roditori (esofago) e agli effetti sul tessuto germinale. Tale informazione è necessaria ai fini della delucidazione del possibile richio di effetti trasmissibili, e per individuare il plausibile meccanismo alla base dell'effetto cancerogeno.
- delucidazione del potenziale genotossico *in vivo* dell'aspartame e del suo principale metabolita (metanolo), un elemento fondamentale nella valutazione complessiva del peso dell'evidenza di attività cancerogena e della sua plausibilità scientifica;
- informazioni sull'influenza dei micronutrienti e delle patologie che ne modificano la disponibilità (es. la malattia celiaca) sulla stabilità genomica e patologie correlate.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'identificazione e la caratterizzazione dei fattori di rischio presenti nell'ambiente, compresa la dieta, è preliminare all'implementazione di misure di prevenzione primaria ai fini della tutela della salute pubblica. Le attività proposte hanno potenziale trasferibilità e ricadute sanitarie: la caratterizzazione del potenziale genotossico delle tossine del genere *Alternaria* e dell'aspartame sono state riconosciute dall'*European Food Safety Authority* (EFSA) come prioritarie per una adeguata valutazione dei possibili rischi per l'uomo, sia come elemento supportivo della evidenza di cancerogenesi che per le informazioni sui sottostanti meccanismi che modulano il rischio alle basse dosi.

Anche la migliore comprensione del ruolo dei micronutrienti sulla stabilità genomica rappresenta un importante fattore conoscitivo, utile ai fini della definizione di modelli nutrizionali ottimizzati per la popolazione.

#### **Sistema Informativo Nazionale sugli Incidenti in Ambiente di Civile Abitazione (SINIACA): integrazione con i sistemi attivi a livello locale col sistema europeo Injury DataBase (IDB) e con il Sistema Informativo sulle Esposizioni Pericolose (SIEPI)**

Il progetto sopra indicato a valenza multiregionale si interesserà di mantenere ed estendere il SINIACA, mediante integrazione con i sistemi attivi a livello locale, secondo quanto previsto dalle linee di supporto delle azioni previste dal Piano Nazionale della Prevenzione 2010-2012, di cui al paragrafo 3.2 (Area della Sicurezza), punti a) incidenti stradali e c) incidenti in ambito domestico. Provvederà, inoltre ad integrare la sorveglianza nazionale degli incidenti nel sistema europeo IDB nell'ambito dell'Azione Congiunta UE-Stati membri *Joint Action on Monitoring Injuries in Europe* (JAMIE) al fine di giungere alla

definizione di un quadro accidentologico nazionale degli incidenti domestici e stradali. Nell'ambito del progetto si provvederà alla sperimentazione pilota dell'estensione della rilevazione dagli incidenti domestici ad altre tipologie d'incidenti d'interesse per l'IDB, alla sperimentazione pilota della registrazione dei prodotti coinvolti in incidente, alla sperimentazione di un sistema di riconoscimento automatico dei prodotti coinvolti in incidente a partire dai referti di pronto soccorso a testo libero. Verranno inclusi nella rete di sorveglianza i Centri AntiVeleni (CAV) partecipanti al SIEPI.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto consentirà l'attuazione della raccomandazione del Consiglio dell'UE n. 2007/C 164/01, che prevede l'utilizzo dei dati esistenti a livello nazionale e regionale in materia d'infortuni e lo sviluppo di sistemi di sorveglianza atti a fornire informazioni comparabili. Consentirà, inoltre, la prosecuzione del SINIACA, previsto dalla normativa vigente (Legge 493/99), e di dare attuazione alle linee di supporto delle azioni previste dal Piano Nazionale della Prevenzione 2010-2012 con particolare riguardo allo sviluppo del SINIACA, mediante integrazione con i sistemi attivi a livello locale.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Lo sviluppo di un Minimum Data Set comune per la sorveglianza degli incidenti e violenza (traumatismi e avvelenamenti) consentirà a ogni pronto soccorso ospedaliero che entrerà nel sistema, e potenzialmente in futuro a ogni centro di Pronto Soccorso (PS) italiano di poter raccogliere e produrre i propri dati di sorveglianza degli incidenti in forma comparabile a livello locale, nazionale ed europeo.

### **Sistema SIMON – Sorveglianza degli Incidenti in Montagna**

L'ISS propone l'attivazione di una linea di ricerca finalizzata al monitoraggio degli eventi accidentali che accadono sulle piste da sci al fine di avere sia una misura del numero degli eventi che si verificano (e quindi di avere un'indicazione dell'incidenza sulla popolazione), sia di caratterizzare questi eventi al fine di quantificarne la gravità e di mettere in luce eventuali gruppi ad alto rischio.

Il monitoraggio degli eventi sarà imperniato su un sistema di sorveglianza coordinato dall'ISS che vedrà coinvolti da una parte gli operatori di soccorso (per il numero e le caratteristiche di incidenti), dall'altra le società che gestiscono gli impianti di risalita (per il numero delle presenze). Nella prima fase del progetto il sistema di sorveglianza sarà mirato alla quantificazione del fenomeno nei suoi aspetti generali (numero eventi, loro tipizzazione e tasso di incidenza). Il progetto vedrà, inoltre, un monitoraggio dell'uso del casco tra la popolazione di sciatori e utenti dello snowboard. Il monitoraggio verrà effettuato presso un campione di stazioni sciistiche di primaria importanza situate su tutto l'arco alpino e appenninico, scelte in maniera da assicurare una copertura adeguata in termini di numerosità e rappresentatività. I rilevatori verranno opportunamente addestrati in base alla metodologia che sarà messa a punto a cura dell'ISS.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Quantificazione del volume complessivo degli incidenti. Identificazione dei traumatismi riportati. Correlazione tra traumatismi osservati e dinamiche prevalenti di incidente. Quantificazione e distribuzione della gravità dei traumi. Quantificazione dei costi di assistenza sanitaria secondari ai traumi sulle piste da sci. Identificazione dei gruppi ad alto rischio onde calibrare opportunamente eventuali strategie di prevenzione. Acquisizione di dati sulla prevalenza d'uso del casco di protezione nella popolazione di sciatori e snowboarder. Valutazione per località sciistica e tempo (e per altre variabili) della prevalenza d'uso del casco. Correlazione tra questi dati e i dati relativi agli incidenti in pista.

### **Trasferibilità dei risultati**

Poiché l'Italia è l'unico Paese che si è dotato di un sistema strutturato di monitoraggio degli incidenti in area sciabile, i risultati del sistema SIMON potranno costituire l'ossatura di un più ampio sistema che riguarderà le nazioni dell'arco alpino. Tale prospettiva si inquadra nell'interesse che la CE ha già manifestato per tali iniziative, finanziando a suo tempo il progetto BE.PRA.S.A (*Best Practices in Skiing Accidents*).

### **Sorveglianza dell'epatite E in Italia: malattia emergente nei Paesi industrializzati**

L'epatite E, infezione nota per essere, in molti Paesi in via di sviluppo, un'infezione endemica a trasmissione feco-orale, nei paesi industrializzati oggi si presenta invece come malattia emergente: è in aumento infatti il numero di casi autoctoni, nonostante sia sempre stata considerata rara in questi paesi e confinata ai viaggiatori provenienti da aree endemiche.

Nonostante le recenti evidenze sierologiche, cliniche e di genetica molecolare a supporto dell'ipotesi dell'epatite E come possibile zoonosi, sarebbe opportuno organizzare, avvalendosi della rete Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta (SEIEVA) dell'ISS, già esistente, una rete di sorveglianza per monitorare l'infezione da HEV.

Per quanto riguarda gli aspetti ambientali, durante il corso dello studio sarà effettuato una sorveglianza utilizzando un network di impianti di depurazione di acque reflue urbane. Il Reparto di Microbiologia e virologia ambientale e wellness dell'ISS si occuperà della identificazione e caratterizzazione molecolare di HEV in acque reflue urbane. La sorveglianza ambientale rappresenta pertanto un'attività di supporto alla sorveglianza clinica, in quanto fornisce indicazioni sui virus circolanti nella popolazione, anche in assenza di casi clinici o in caso di infezioni asintomatiche o subcliniche.

### **Risultati attesi nel triennio**

Si attendono i seguenti risultati:

- Analisi della viremia HEV in soggetti con epatite acuta nonA-nonC afferenti alla rete SEIEVA. Analisi delle IgM e IgG anti-HEV nel caso la ASL non possa eseguire direttamente tali test.
- Stima della proporzione di casi d'importazione e autoctoni, mediante stima delle proporzioni di diversi genotipi HEV circolanti in Italia con l'impiego di tecniche di caratterizzazione molecolare (sequenziamento del genoma virale e analisi filogenetica).
- Definizione dei fattori di rischio per HEV e caratterizzazione clinica.
- Incentivazione, attraverso la rete SEIEVA, dell'esecuzione dei test diagnostici sierologici.
- Sorveglianza della diffusione ambientale del virus HEV e correlazione con le infezioni autoctone e importate nell'uomo.

### **Trasferibilità dei risultati**

Si attendono i seguenti risultati:

- Valutazione della diffusione dell'infezione da HEV in Italia: analisi dei dati, stima dell'incidenza per area geografica, età e sesso.
- Stima della proporzione di casi d'importazione e autoctoni.
- Analisi della viremia in soggetti con epatite acuta nonA-nonC afferenti alla rete SEIEVA; analisi delle IgM e IgG anti-HEV per conto delle ASL che non possano eseguire direttamente le analisi sierologiche per l'HEV. Comunicazione delle

positività dei test al centro di coordinamento dell'ISS che a sua volta renderà noti i risultati alle ASL.

- Definizione dei fattori di rischio per l'infezione da HEV e caratterizzazione clinica.
- Incentivazione, attraverso la rete SEIEVA, dell'esecuzione dei test diagnostici sierologici.
- Sorveglianza della diffusione ambientale del virus HEV e correlazione con le infezioni autoctone nell'uomo.

### **ST.E.P. – Studio Efficacia Paraschiena**

Secondo i dati ISTAT del 2010, a fronte del decremento delle vittime totali dell'incidentalità stradale (-42,4%), tra i ciclomotori e i motocicli la diminuzione dei deceduti nel decennio 2001-2010 è percentualmente inferiore (-19,6%). Se è vero che il casco (integrale) ha ridotto le morti sul colpo e gli accessi ospedalieri per trauma cranico e limitato le lesioni vertebrali alte, questo da solo non può escludere danni e altri esiti gravi da lesione ad organi vitali. A questo proposito la diffusione di altri dispositivi di sicurezza, come il "paraschiena" (guscio, giacca o gilet con airbag) di recente introduzione sul mercato, anche se non obbligatori ai sensi del Codice della Strada, potrebbe ridurre i danni a carico del midollo spinale e della colonna vertebrale. Lo scopo del progetto ST.E.P. (ISS-Polizia Stradale) è appunto quello di indagare, per ciascun incidente in cui siano coinvolte le due ruote, se il paraschiena sia stato utilizzato e quale sia stato il suo impatto sulle conseguenze dell'incidente.

Il monitoraggio, che ha avuto da poco inizio e durerà almeno un anno, si svolgerà su un campione di dieci province italiane, distribuite sull'intero territorio nazionale, in modo tale da costituire un campione e offrire una base dati sulla quale potranno proseguire le attività di analisi e studio dell'ISS, attraverso i dati sanitari relativi ai ricoveri ospedalieri secondari ai sinistri stradali in argomento.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I dati disponibili sugli incidenti che vedono coinvolti motocicli e ciclomotori dovranno permettere il confronto tra uso e non uso del dispositivo paraschiena, in termini di conseguenze sanitarie (nello specifico, trauma alla spina dorsale). Si valuterà pertanto in modo la prevalenza d'uso del dispositivo l'efficacia di popolazione del paraschiena quale dispositivo protettivo dai traumi alla colonna vertebrale.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La conoscenza del dato di prevalenza d'uso di un dispositivo di protezione costituisce informazione essenziale al fine della valutazione di efficacia dell'applicazione del fattore protettivo a una determinata popolazione. La conoscenza dei risultati delle valutazioni d'efficacia costituisce strumento indispensabile per l'implementazione estesa del dispositivo nella popolazione e l'eventuale modifica del quadro normativo sulla sicurezza stradale.

### **Stress ossidativo e danno ossidativo al DNA indotto da nanoparticelle ingegnerizzate**

In questi ultimi anni, a causa dell'enorme sviluppo del settore delle nanotecnologie, l'attenzione della comunità scientifica e delle istituzioni nazionali e internazionali si è concentrata in modo crescente sul potenziale rischio per l'uomo e per l'ambiente associato all'esposizione a particelle ingegnerizzate in forma nanometrica (NP).

Numerosi studi effettuati per valutare la tossicità di differenti tipi di NP hanno indicato un possibile effetto tossico ma si sa ancora relativamente poco sull'interazione NP-sistemi

biologici in termini di meccanismi di azione. Lo stress ossidativo, in particolare, sembra essere uno dei principali meccanismi coinvolti nell'induzione di un effetto tossico da parte di numerosi tipi di NP. Inoltre, una condizione di stress ossidativo può portare all'accumulo di lesioni al DNA, tra cui la più frequente è l'8-oxodG, considerata il principale *marker* di ossidazione al DNA a causa della sua elevata mutagenicità.

La presente linea di ricerca, svolta in collaborazione con altri reparti del Dipartimento AMPP e all'interno di progetti di Ricerca finanziati dal Ministero della Salute, si propone di determinare l'induzione di stress ossidativo e danno ossidativo al DNA, utilizzando NP di larga diffusione e diversi modelli sperimentali *in vitro*, rappresentativi di differenti vie di esposizione. I dati di tossicità ottenuti saranno messi in relazione con le proprietà fisico-chimiche delle particelle oggetto di studio.

#### **Risultati attesi nel triennio**

La presente linea di ricerca si propone di:

- determinare la produzione di ROS da parte di differenti particelle (ossidi di Zinco e Argento, biossido di Titanio), in forma micrometrica e nanometrica, mediante citofluorimetria e l'impiego della molecola fluorescente diclorofluoresceina (DCF<sub>A</sub>);
- valutare il danno ossidativo al DNA, determinato misurando i livelli di 8-oxodG su DNA genomico e mitocondriale, tramite la tecnica di cromatografia con rilevazione elettro-chimica (HPLC/EC) (*European Standards Committee on Oxidative DNA Damage*, ESCODD);
- effettuare le cinetiche di riparazione del danno ossidativo al DNA per dare una possibile interpretazione dei meccanismi coinvolti nell'induzione del danno;
- determinare i livelli di espressione delle principali proteine coinvolte nella riparazione del danno ossidativo al DNA, tramite la tecnica di *Western Blot*;
- identificare possibili correlazioni tra le proprietà fisico-chimiche delle NP e i meccanismi di danno cellulare responsabili dell'eventuale effetto tossico.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'interesse dell'ISS sull'uso responsabile dei materiali in scala nanometrica (NM) è evidenziato dalla recente creazione di un gruppo di lavoro inter-dipartimentale su tale argomento.

La presente linea di ricerca si inserisce a pieno titolo in tale contesto e i risultati prodotti saranno condivisi e integrati con gli altri gruppi coinvolti, nonché discussi a livello europeo nell'ambito di accordi e progetti di ricerca già in essere o in via di attivazione. In particolare, i risultati ottenuti dalla presente linea di ricerca consentiranno:

- la definizione di protocolli sperimentali per lo studio delle NP su sistemi *in vitro* di diversa origine e complessità;
- di dare un contributo alla messa a punto di linee guida specifiche per i nanomateriali;
- di fornire un supporto alla classificazione ed etichettatura dei nanomateriali basata sulle proprietà fisico-chimiche.

### **Studio ai fini della valutazione dell'impatto sull'ambiente delle attività antropiche nell'area della Val d'Agri. Studio relativo agli indicatori di salute della popolazione residente nelle aree di interesse**

Lo studio si propone di caratterizzare e valutare i rischi per la salute di origine ambientale identificando le sorgenti e i fattori di rischio, studiando i determinanti dell'esposizione umana e quantificando quest'ultima per le principali categorie di popolazione (bambini, adulti, anziani, altri). Le conoscenze acquisite consentiranno l'identificazione e la predisposizione di misure di mitigazione e controllo dei rischi (gestione integrata delle

informazioni, sistemi di monitoraggio della qualità dei comparti ambientali, comunicazione del rischio e la partecipazione della popolazione nella gestione delle problematiche connesse, sistemi di sorveglianza sanitaria, sistemi di valutazione dell'efficacia delle iniziative adottate, ecc.), in accordo con le competenti autorità locali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

A conclusione dello studio resterà a disposizione delle autorità locali competenti un sistema di monitoraggio della qualità ambientale, tarato sulla realtà locale, che consentirà un'efficace ed efficiente gestione dei rischi ambientali per la salute eventualmente presenti nell'area.

Inoltre verrà condotto uno specifico studio relativamente agli indicatori dello stato di salute della popolazione residente nelle aree di interesse.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tale studio prevede una collaborazione con l'Assessorato alla Sanità della Regione Basilicata, con le ASL e con le ARPA.

### **Studio dei meccanismi di tossicità e dei parametri tossicocinetici di contaminanti ambientali/alimentari, cosmetici e prodotti di consumo: valutazione del rischio, identificazione di fattori metabolici di suscettibilità e delle interazioni per esposizioni multiple**

Il progetto si propone di contribuire alla conoscenza dei meccanismi di tossicità e della diversa suscettibilità agli effetti contaminanti ambientali/alimentari e dei prodotti di consumo rilevanti dal punto di vista sanitario, a cui gran parte della popolazione è esposta. La diversa suscettibilità in molti casi è determinata da fattori tossicocinetici legati alle caratteristiche genetiche (polimorfismi) e/o ad esposizioni ad induttori/inibitori degli enzimi del metabolismo, in grado di alterare l'equilibrio tra bioattivazione e detossificazione, influenzando drasticamente la tossicità. Anche le interazioni tra sostanze a cui la popolazione è esposta simultaneamente, in grado di produrre effetti diversi dalla semplice additività, sono generalmente dovute a interferenze a livello tossicocinetico. Le informazioni disponibili, pur essenziali, sono ad oggi molto scarse. Le informazioni raccolte saranno utilizzate per lo sviluppo di metodologie più adeguate per la valutazione quantitativa del rischio e la relativa protezione della popolazione.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I principali risultati saranno:

- identificazione di fattori metabolici di suscettibilità agli effetti dei contaminanti in esame, attraverso l'impiego di enzimi umani ricombinanti e di frazioni subcellulari epatiche ed extraepatiche di origine umana e animale per identificare anche possibili differenze di specie. Gli enzimi identificati potranno essere utilizzati come biomarcatori di suscettibilità in studi di popolazione mirati;
- identificazione di eventuali meccanismi di suscettibilità legata alla esposizione nelle diverse fasce di età caratterizzate da livelli di espressione/attività enzimatica diversa, che potranno indicare se i fattori di sicurezza utilizzati nelle attuali procedure di valutazione del rischio coprono anche la popolazione femminile in età fertile e quella infantile;
- individuazione di fenomeni di interazioni tossicocinetiche nella fase di assorbimento e biotrasformazione tra contaminanti diversi in condizioni di esposizione reale, sia rispetto alle dosi che alla possibilità di esposizione combinata, attraverso l'uso di sistemi sperimentali avanzati.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati delle indagini proposte contribuiranno al miglioramento delle procedure di valutazione quantitativa e alla caratterizzazione del rischio da esposizione ai contaminanti in esame, identificando fattori di vulnerabilità (es. bambini, nel caso di giocattoli e prodotti per puericoltura) e possibili fenomeni di interazione da segnalare per limitare eventuali condizioni d'uso. I risultati potranno perciò essere trasferiti sia a livello nazionale (Ministero della Salute) che internazionale (es. EFSA, CE-DG Sanco). Le informazioni ottenute potranno essere utilizzate per disegnare opportuni studi di epidemiologia molecolare per l'individuazione di gruppi di popolazione a maggior rischio e approntare adeguati piani di prevenzione.

### **Studio delle interazioni gene-ambiente attraverso l'identificazione e l'analisi dell'espressione di fattori di suscettibilità individuale in gruppi di popolazione a rischio per lo sviluppo di patologie ad eziologia ambientale**

Le patologie sviluppate in seguito ad esposizione a contaminanti ambientali e a sostanze di origine naturale (es. endometriosi, FAS, epatopatia alcolica ecc.) sono spesso di natura multifattoriale e i meccanismi alla base della loro insorgenza dipendono dall'interazione fra fattori genetici di suscettibilità individuale e fattori ambientali. La capacità di risposta all'esposizione agli xenobiotici regolata dal rapporto tra capacità di attivazione (es. CYP450 etc.) e quella di detossificazione (es. GST, ecc.) è caratterizzata da un'ampia variabilità interindividuale e tali differenze possono spiegare, in parte, la variabilità nella risposta tossicologica agli agenti chimici, soprattutto analizzate in associazione a dati di esposizione.

Questi enzimi sono, infatti, geneticamente polimorfici (presenti come varianti alleliche) e/o sono inducibili, ovvero la loro sintesi (quindi la loro attività metabolica) è regolata da molteplici fattori quali la dieta, l'alcol, i contaminanti ambientali, i farmaci e altri ancora.

La rapida evoluzione delle tecniche di biologia molecolare ha fornito strumenti d'indagine estremamente sensibili e specifici per la caratterizzazione qualitativa e quantitativa dei fattori di suscettibilità.

Quelli utilizzati nel progetto includono la determinazione su base individuale, *in vivo* o *ex vivo*, dei polimorfismi genetici degli enzimi di fase I e fase II (genotipizzazione) e la determinazione dell'espressione multigenica mediante *real-time PCR*.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nell'ambito dell'attività di ricerca sulle interazioni gene-ambiente saranno i seguenti:

- analisi qualitativa dell'assetto genico della popolazione per l'individuazione di gruppi portatori di mutazioni in geni a bassa penetranza;
- misurazione, nell'ambito di studi caso-controllo, delle frequenze alleliche di geni del metabolismo in gruppi di individui esposti a sostanze tossiche o affetti da patologie ad eziologia ambientale e in popolazioni di controllo;
- misura, mediante studi *in silico/in vitro*, dei livelli di up- e down-regolazione di geni del metabolismo in seguito a esposizioni a xenobiotici.

### **Trasferibilità dei risultati**

La comprensione della base genetica delle patologie sviluppate in seguito ad esposizione a xenobiotici (es. endometriosi, FAS, epatopatia alcolica ecc.) tramite l'analisi dei polimorfismi e dei livelli di espressione può aiutare a:

- identificare fattori metabolici di suscettibilità per verificare la presenza nella popolazione di gruppi a rischio;
- fornire strumenti per una diagnosi precoce;

- fornire nuovi approcci per approntare opportune strategie di contenimento dell'esposizione;
- identificare adeguate misure preventive da suggerire a particolari fasce suscettibili della popolazione (es. donne in età fertile o in gravidanza, bambini, anziani ecc.) attraverso le strutture periferiche dell'SSN.

### **Studio dell'esposizione del consumatore all'alluminio derivante dal contatto alimentare**

Gli oggetti di alluminio sono disciplinati a livello nazionale dal decreto n. 76 del 18/4/2007. La conformità degli oggetti di alluminio (Al) al contatto con gli alimenti si basa su requisiti di composizione e limitazioni d'uso. Non sono previste prove di migrazione con simulanti alimentari. Nel 2008 l'EFSA ha pubblicato un parere scientifico che ha stabilito un'assunzione settimanale tollerabile (TWI) di 1 mg di alluminio/kg p.c./settimana. Recentemente a livello del Consiglio d'Europa (CoE), è stato proposto sia un limite di rilascio specifico di alluminio (SRL) che l'utilizzo di una soluzione di acido citrico come simulante alimentare, per testare la conformità degli articoli di alluminio al contatto alimentare. Pertanto il presente progetto ha lo scopo di verificare se la migrazione di alluminio da contenitori per cottura e/o conservazione di alimenti crei rischi per la salute dei consumatori, in condizioni reali di esposizione.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati ottenuti forniranno un approfondimento sulla conoscenza della reale esposizione dei consumatori italiani ad Al, ma nel contempo permetteranno di valutare l'idoneità delle leghe realizzate in conformità al Decreto n. 76 del 2007 a venire a contatto con gli alimenti nel rispetto del nuovo TWI di 1 mg di alluminio/kg p.c./settimana. Inoltre lo studio del comportamento migrazionale di articoli di Al a contatto con il simulante acido citrico permetterà di confrontare quanto proposto a livello del CoE con le regole stabilite nel decreto nazionale sulla base delle quali gli articoli di Al vengono dichiarati conformi al contatto alimentare.

Conoscenze tecnico scientifico su un settore di grande interesse a livello europeo.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Pubblicazioni scientifiche.

### **Studio di caratterizzazione tossicologica e relativo monitoraggio di specie algali e cianobatteriche tossiche nelle acque del lago Pertusillo**

Valutazioni trofiche e poter individuare proposte che definiscano le azioni di tutela del complesso lacustre in esame sotto il duplice aspetto qualitativo e quantitativo.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Studio di caratterizzazione tossicologica e relativo monitoraggio di specie algali e cianobatteriche tossiche nelle acque del corpo idrico e delle eventuali cause di rischio da eutrofizzazione tossica per gli usi antropici dell'invaso.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati della ricerca realizzeranno il controllo di un sito acquatico compromesso da eutrofizzazione e adibito ad uso potabile, con la contemporanea creazione di capacità tecniche locali per la rilevazione, la verifica e la gestione di situazioni di potenziale rischio per la salute umana.

### **Studio di meccanismi di migrazione da strutture complesse di materiali a contatto con alimenti**

Il Piano prevede lo studio di materiali di imballaggio flessibile a contatto con gli alimenti per verificare la migrazione di sostanze dal materiale ad alimenti. Verranno approfonditi i parametri chimico fisici e strumentali che determinano l'entità della migrazione. Saranno studiate alcune formulazioni-tipo per individuare il comportamento di migranti attraverso strati di materiali diversi (diversi polimeri plastici, diversi materiali).

I parametri sperimentali (ottenuti da test di migrazione e determinazioni strumentali) saranno anche paragonati con parametri di modellistica per verificare la rispondenza dei modelli alla situazione reale.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- conoscenza scientifica su fenomeni di migrazione attraverso strutture complesse;
- possibilità di applicare modelli previsionali;
- possibilità di prevedere l'entità dei fenomeni di migrazione e di indirizzare le attività di controllo e di ricerca.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Pubblicazioni scientifiche.

### **Studio e validazione di metodi multiresiduo per l'analisi di fitofarmaci organoclorurati, organofosforati e piretroidi nei prodotti alimentari di origine animale e alimenti con alto contenuto di grassi e organizzazione di circuiti interlaboratorio**

L'uso di prodotti antiparassitari, impiegati sia per la protezione di derrate alimentari che come farmaci veterinari, determina la presenza di residui in alimenti di origine animale, i cui LMR sono stabiliti al momento della registrazione o la rivalutazione tossicologica del prodotto fitosanitario.

Piani di monitoraggio, sia nazionali che europei, hanno lo scopo di verificare la conformità agli LMR fissati e valutare l'esposizione del consumatore. Il Reg.(CE) 1274/2011, che descrive il prossimo programma coordinato di monitoraggio europeo 2012-14, ha incrementato il numero dei fitofarmaci da ricercare sui prodotti di origine animale, introducendo composti con proprietà chimico fisiche diverse.

Il progetto ha lo scopo di sostenere l'attività dell'LNR per i residui di pesticidi nei prodotti alimentari di origine animale e alimenti con alto contenuto di grassi, che ha sede presso il Reparto Antiparassitari del Dipartimento AMPP, tra i cui compiti è previsto lo sviluppo di metodi per il controllo ufficiale dei campioni. I metodi devono essere validati e accreditati in conformità alle norme e documenti guida di pertinenza che impongono requisiti specifici per i metodi di analisi e i laboratori che effettuano controlli ufficiali.

Si prevede la preparazione di esercizi inter-laboratorio su matrici di origine animale o con alto contenuto di grassi, ai quali i laboratori ufficiali sono tenuti a partecipare.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Nel triennio 2012-2014, si prevede lo studio di metodi multiresiduo per l'analisi di fitofarmaci organoclorurati, organofosforati e piretroidi da usare per l'attuazione dei piani di monitoraggio nazionali ed europei e per l'analisi di conferma di campioni dove si sia riscontrato il superamento dell'LMR.

Il progetto si propone di migliorare e implementare le metodiche già sviluppate nel Reparto Antiparassitari, ampliando e mirando la ricerca dei principi attivi selezionati nei

piani di monitoraggio nazionali ed europei, in relazione alle matrici individuate negli stessi piani.

Si prevede lo studio delle condizioni di analisi più adeguate per analizzare residui di fitofarmaci appartenenti a varie classi di composti, ottimizzando le procedure di estrazione e purificazione dei campioni di alimenti di origine animale, al fine di abbattere ulteriormente i tempi e i costi delle analisi stesse.

Particolare attenzione verrà posta alla fase di determinazione analitica, utilizzando strumentazione in grado di determinare selettivamente gli analiti.

Le metodiche sviluppate saranno sottoposte a validazione e accreditamento, in ottemperanza alle direttive di settore.

Verranno organizzati gruppi di lavoro tra laboratori ufficiali e LNR per i residui di fitofarmaci nei prodotti alimentari di origine animale e alimenti con alto contenuto di grassi dove trattare problematiche di settore e partecipare a circuiti interlaboratorio.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto è mirato a sostenere le attività e le responsabilità dell'LNR per i residui di fitofarmaci nei prodotti alimentari di origine animale e alimenti con alto contenuto di grassi (art. 33, Reg. (CE) 882/2004).

La messa a punto di metodi multiresiduo validati per l'analisi di fitofarmaci organoclorurati, organofosforati e piretroidi servirà anche a sostenere l'attività di controllo e di monitoraggio degli IZS. I dati dei piani nazionali di monitoraggio vengono raccolti dal Ministero della Salute e trasmessi annualmente all'UE, che li utilizza per la valutazione del rischio per la popolazione.

### **Studio e validazione di metodologie multiresiduo per la determinazione di residui di fitofarmaci in alimenti destinati all'infanzia**

L'UE, al fine di tutelare adeguatamente la salute dei bambini, ha regolamentato l'immissione in commercio degli alimenti destinati all'infanzia e ha stabilito livelli molto bassi dei residui di fitofarmaci, provenienti dal trattamento delle derrate alimentari, con valori degli LMR nel range 0,01-0,003 mg/kg, come indicato nelle direttive di settore (Dir. 2006/141/EC e Dir. 2006/125/EC).

Gli alimenti destinati all'infanzia sono inclusi nei piani di monitoraggio, sia nazionali che europei, allo scopo di verificare la conformità agli LMR fissati e valutare l'esposizione degli infanti, categoria particolarmente suscettibile e vulnerabile.

Il progetto ha lo scopo di sviluppare e validare metodiche analitiche multiresiduo necessarie per il controllo degli LMR negli alimenti e nelle bevande destinati all'infanzia, che sono più bassi dei corrispondenti LMR fissati per gli alimenti destinati alla popolazione in generale, con particolare attenzione alla determinazione degli analiti la cui definizione di residuo è comprendente della somma sei metaboliti, che possiedono proprietà chimico fisiche diverse.

I metodi devono essere validati e accreditati in conformità alle norme e documenti guida di pertinenza (documento SANCO/12495/2011, Decisione della Commissione 2002/657/CE e normativa UNI CEI EN ISO/IEC 17025) che impongono requisiti specifici per i metodi di analisi e per i laboratori che effettuano controlli ufficiali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Nel triennio 2012-2014, si prevede lo studio di metodi multiresiduo per l'analisi di residui di fitofarmaci in alimenti destinati all'infanzia, da usare per l'attuazione dei piani di monitoraggio nazionali ed europei e per l'analisi di conferma di campioni, dove si sia riscontrato il superamento dei limiti massimi di residuo.

Alcune metodiche sono già state sviluppate nel Reparto Antiparassitari, ma nel progetto si propone di migliorare le prestazioni dei metodi già in uso, con lo scopo di soddisfare i requisiti di rapidità, facilità di esecuzione, miniaturizzazione della procedura di analisi a favore di bassi consumi di solventi e materiali con un conseguente minore impatto ambientale.

Inoltre, si prevede di ampliare lo scopo dei metodi interni di reparto con lo studio di ulteriori composti, con particolare attenzione all'analisi dei metaboliti che possiedono proprietà chimico fisiche diverse dal composto *parent*, e pertanto risultano di difficile indagine analitica.

Infine, particolare attenzione verrà posta alla fase di determinazione analitica, utilizzando strumentazione in grado di determinare in modo selettivo i residui dei fitofarmaci in studio.

Le metodiche sviluppate saranno sottoposte a validazione e accreditamento, in ottemperanza alle direttive di settore (documento SANCO/12495/2011, Decisione della Commissione 2002/657/CE e normativa UNI CEI EN ISO/IEC 17025).

#### **Trasferibilità dei risultati**

I metodi analitici sviluppati potranno essere utilizzati nell'ambito dell'attività di controllo e nei piani di monitoraggio sia nazionali che europei, a supporto anche dell'attività dei laboratori ufficiali.

I dati dei piani nazionali di monitoraggio vengono raccolti dal Ministero della Salute e trasmessi annualmente all'UE, che li utilizza per la valutazione del rischio per la popolazione.

### **Supporto tecnico-scientifico per l'avvio dei monitoraggi delle acque della Regione Lazio per le componenti biologiche ai sensi del DL.vo 152/2006 e S.M.I., in attuazione della direttiva quadro acque 2000/60/CE.**

Obiettivo principale dell'attività è la collaborazione con i tecnici dell'Agenzia per la costituzione di un gruppo tecnico omogeneo dedicato alla realizzazione dei monitoraggi biologici ai sensi della Direttiva Quadro Acque 2000/60/CE.

Programma di attività e metodi:

- Diatomee: Realizzazione di incontri tecnici dedicati alla messa a punto dei metodi di campionamento e analisi; collaborazione tra tecnici ARPA Lazio e tecnici ISS per l'analisi delle diatomee campionate nel corso del periodo di durata dell'accordo, presso i laboratori ARPA Lazio e quelli ISS e valutazione degli indici ambientali correlati; collaborazione con l'Agenzia per l'individuazione di possibili siti di riferimento ai sensi della normativa; supporto all'Agenzia per risoluzione di eventuali criticità riscontrate durante le attività di monitoraggio.
- Macrofite: Realizzazione di incontri tecnici dedicati alla messa a punto dei metodi di campionamento e analisi; collaborazione tra tecnici ARPA Lazio e tecnici ISS per l'analisi delle macrofite nel corso del periodo di durata dell'accordo sia presso i siti di monitoraggio che in laboratorio e relativa stima degli indici ambientali correlati; collaborazione con l'Agenzia per l'individuazione di possibili siti di riferimento ai sensi della normativa; supporto all'Agenzia per la risoluzione di eventuali criticità riscontrate durante le attività di monitoraggio.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Messa a punto di metodiche e divulgazione delle attività sperimentali a diversi livelli.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Supporto alle decisioni di programmazione al fine delle attività di prevenzione sulla salute degli ecosistemi e la salute umana.

## **Suscettibilità genetica al danno ossidativo: il ruolo dei polimorfismi in geni della riparazione del DNA**

Difetti nella riparazione del danno ossidativo sono stati correlati a numerose patologie, quali il cancro, le malattie cardiovascolari, neurodegenerative e infiammatorie croniche. Tuttavia, il nesso causale tra lo stress ossidativo e la patogenesi non è ancora chiaro. Nella popolazione generale, la predisposizione genetica alle malattie è determinata dalla combinazione di varianti alleliche ad alto rischio di geni a bassa e media penetranza. L'associazione tra polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) in geni della riparazione del DNA e l'aumento di rischio di malattia è stata valutata nell'ambito di diversi studi epidemiologici con risultati spesso inconsistenti, dovuti al numero troppo esiguo di SNP analizzati e alla mancanza di studi funzionali. Proponiamo di analizzare l'effetto combinato di oltre 384 SNP sull'attività di riparazione del danno ossidativo al DNA in linfociti ottenuti da individui sani. L'analisi funzionale e la scelta di soggetti sani ci permetteranno di analizzare l'interazione tra geni appartenenti a diversi meccanismi di riparazione e di identificare varianti alleliche potenzialmente coinvolte nell'aumento di suscettibilità al danno ossidativo nella popolazione generale. Inoltre, utilizzando linee linfoblastoidi umane ingegnerizzate e genotipizzate potremo determinare la rilevanza biologica delle varianti alleliche e valutare l'impatto degli SNP sulla risposta ad agenti ossidanti utilizzati per il trattamento anti-tumorale (es. methotrexate).

### **Risultati attesi nel triennio**

Verranno identificate combinazioni di polimorfismi che determinino una diminuzione della capacità di riparazione del DNA dei linfociti ottenuti dai pazienti sani, costituendo, quindi, un potenziale fattore di rischio. Attraverso l'applicazione di tradizionali saggi fenotipici *in vitro* e *in vivo*, quali l'elettroforesi su gel a singola cellula, la misurazione di lesioni al DNA specifiche con tecniche cromatografiche, il saggio di riparazione di lesioni specifiche effettuato con estratti proteici di linfociti, tecniche di *real-time* PCR, potremo integrare diversi fattori che sono in grado di influenzare l'espressione genica e l'attività proteica. Utilizzando saggi *in vitro* sviluppati nel nostro laboratorio, potremo identificare quale meccanismo di riparazione e quale passaggio di tale meccanismo è inficiato da un determinato polimorfismo. Inoltre, il sistema modello di cellule linfoblastoidi genotipizzate ci permetterà di rilevare l'effetto combinato di più polimorfismi sulla capacità di riparazione del DNA e sulla sensibilità a specifici agenti danneggianti, tra cui farmaci utilizzati nel trattamento terapeutico di alcune malattie.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati di questa analisi potrebbero essere sfruttati per disegnare ampi studi epidemiologici volti all'individuazione di sotto-popolazioni particolarmente suscettibili al danno ossidativo. L'identificazione precoce di individui suscettibili può contribuire alla prevenzione primaria di diverse patologie. Inoltre, la possibilità di utilizzare basse dosi di agenti danneggianti sulle linee linfoblastoidi permetterebbe di analizzare la risposta cellulare in condizioni molto simili a quelle riscontrate nei reali scenari di esposizione umana. Infine, l'analisi della modulazione della sensibilità ad agenti danneggianti comunemente utilizzati in chemioterapia da parte di specifiche combinazioni alleliche potrebbe avere interessanti risvolti per lo sviluppo della medicina personalizzata.

### **Sviluppo di un sistema di sorveglianza ambientale per patogeni enterici con particolare riferimento alle acque superficiali e al loro uso (enter-env)**

Realizzazione di un sistema pilota di sorveglianza e prevenzione del rischio per la salute umana associato a patogeni e patogeni emergenti provenienti dalle acque superficiali, ENTER-ENV.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Attualmente non esiste un sistema di sorveglianza e allerta connesso al rischio sanitario legato all'ambiente e in particolare alle acque superficiali. Al termine del progetto saranno costituiti:

- Sistema di sorveglianza pilota ENTER-ENV a rete con le Regioni coinvolte.
- Banca dati integrata con ENTER-NET ed ENTER-VET.
- Linea guida per la sorveglianza degli agenti patogeni nelle acque superficiali.
- Mappe della distribuzione degli agenti patogeni nelle acque superficiali e dei fattori di rischio collegati alla contaminazione dei corpi idrici superficiali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Analisi dei sistemi esistenti di sorveglianza e monitoraggio degli indicatori ambientali di rischio per la salute umana e sistemi di lettura degli stessi secondo un'ottica di salute (ID 2), ma è anche collegato alle attività centrali come le attività connesse al Portale Acque e ai sistemi di sorveglianza in essere ENTER-NET e ENTER-VET.

### **Il ruolo del danno ossidativo nella cancerogenesi del colon-retto**

Durante il processo infiammatorio vengono generati alti livelli di specie reattive dell'ossigeno che possono danneggiare il DNA e causare mutazioni. Inoltre infiammazioni croniche sono associate ad aumentato rischio di tumori. Il sistema di BER è il principale sistema di riparazione del danno al DNA di tipo ossidativo. Uno degli enzimi di questo *pathway*, la glicosilasi MUTYH, rimuove l'adenina incorporata in maniera errata di fronte alla più comune base ossidata, la 8-idrossiguanina (8-oxoG). Il ruolo di questo gene nella cancerogenesi colo-rettale costituisce l'argomento di questo progetto.

Mutazioni nel gene MUTYH sono associate ad una sindrome di aumentata suscettibilità ai tumori, la poliposi familiare MAP (*familial adenomatous polyposis*). Non è tuttavia chiaro se l'inattivazione del gene MUTYH è confinata al cancro di tipo familiare. Ci proponiamo di studiare se la perdita di funzione di questo gene è responsabile di una quota di instabilità genomica presente nel cancro del colon-retto di tipo sporadico.

#### **Risultati attesi nel triennio:**

Abbiamo precedentemente dimostrato che il gene MUTYH è coinvolto nella risposta infiammatoria in un modello murino di colite ulcerosa. La suscettibilità ai tumori in una condizione di infiammazione cronica verrà studiato in un modello murino basato su topi difettivi in MUTYH presenti nel nostro laboratorio. Inoltre l'espressione di questo gene verrà studiata nel cancro del colon-retto sporadico umano sia con tecniche di immunistochemical che per real-time PCR. Infine verrà determinato attraverso il sequenziamento dell'esoma di un tumore presente in un paziente MAP se l'inattivazione di MUTYH sia associata a mutazioni in particolari oncogeni e/o geni oncosoppressori rispetto a tumori di tipo sporadico.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questo approccio permetterà di ottenere nuove informazioni sui cambiamenti genetici associati all'inattivazione di MUTYH di rilevanza nella eziopatogenesi di carcinomi del colon-retto.

## **Tossicità di nanoparticelle ingegnerizzate su sistemi *in vitro***

Gli NM hanno proprietà fisico-chimiche e attività biologica molto differenti rispetto ai medesimi materiali in scala micrometrica. In questi ultimi anni l'enorme sviluppo del settore delle nanotecnologie, basato sull'utilizzo di NP ha portato la comunità scientifica e le istituzioni nazionali e internazionali ad affrontare approfonditamente e in maniera coordinata il problema del potenziale rischio per l'uomo e per l'ambiente associato all'esposizione a questo tipo di particelle, tenendo conto delle loro peculiari caratteristiche fisico-chimiche. Sono stati avviati numerosi progetti di ricerca, a livello nazionale e internazionale, volti a implementare le conoscenze e a valutare i rischi per la salute connessi alla diffusione e all'uso di NM.

In particolare, è in corso un ampio dibattito sull'effettiva predittività dei saggi di tossicità comunemente richiesti per la valutazione del rischio chimico nei confronti del possibile rischio da NM, e sull'eventuale sviluppo di nuove strategie e/o metodologie di saggio.

In questo ambito si colloca la presente linea di ricerca che, in collaborazione con altri reparti del Dipartimento AMPP, e all'interno di progetti di ricerca finanziati dal Ministero della Salute, intende acquisire dati utili all'implementazione e alla trasferibilità di saggi validati di citotossicità *in vitro*, utilizzando NP di larga diffusione.

### **Risultati attesi nel triennio**

Nell'ambito del presente progetto particolare rilievo sarà rivolto alla correlazione tra caratteristiche fisico-chimiche delle NP e potenziale tossicologico. A tale scopo verranno utilizzate sia linee cellulari utilizzate nelle linee guida internazionali sia modelli cellulari più specifici e complessi, rappresentativi di potenziali vie di esposizione umana.

La presente linea di ricerca si propone di:

- valutare la citotossicità *in vitro* di NP selezionate (es. ossidi di Zinco e Argento, biossido di Titanio), utilizzando saggi *in vitro* (in particolare il Saggio del Rosso Neutro) secondo i protocolli riportati nelle linee guida internazionali. Verrà valutata criticamente l'adattabilità delle procedure sperimentali alle specifiche caratteristiche degli NM utilizzati;
- mettere a punto protocolli sperimentali adatti alla valutazione degli effetti tossici e dell'assorbimento di NP su modelli *in vitro* di barriere epiteliali (in particolare intestinale e cutanea), rappresentanti alcune delle principali "vie d'ingresso" nell'organismo delle NP;
- identificare possibili correlazioni tra le proprietà fisico-chimiche delle NP e i meccanismi di danno cellulare responsabili dell'eventuale effetto tossico, utilizzando i modelli cellulari summenzionati.

### **Trasferibilità dei risultati**

L'interesse dell'ISS sull'uso responsabile degli NM è evidenziato dalla recente creazione di un gruppo di lavoro inter-dipartimentale su tale problematica e dall'attività sperimentale di gruppi di ricerca ISS con molteplici competenze ed esperienze. La presente linea di ricerca si inserisce a pieno titolo in tale contesto e i risultati prodotti saranno condivisi e integrati con gli altri gruppi coinvolti, nonché discussi a livello europeo nell'ambito di accordi e progetti di ricerca già in essere o in via di attivazione. In particolare, i risultati ottenuti dalla presente linea di ricerca potranno consentire:

- definizione di protocolli sperimentali per lo studio delle NP su sistemi *in vitro* di diversa origine e complessità;
- verifica dell'applicabilità agli NM di alcuni dei saggi tossicologici *in vitro* comunemente utilizzati per la valutazione del rischio chimico;
- contributo alla messa a punto di specifiche linee guida per la valutazione del rischio degli NM.

## Tossicologia predittiva

La concomitanza tra l'aumentare delle richieste di valutazioni di sostanze chimiche (vedi per esempio la legislazione REACH), e d'altra parte la diminuzione di risorse per gli esperimenti e la spinta a restringere l'uso di animali, ha fatto sì che la tossicologia predittiva abbia aumentato drasticamente il suo ruolo in campo regolativo.

Recentemente l'Agenzia europea delle sostanze chimiche (*European Chemicals Agency*, ECHA) ha informato che solo in questi primissimi anni di legislazione REACH l'uso di metodi come la relazione quantitativa struttura-attività (*Quantitative structure-activity relationship*, QSAR), *Read-Across*, e *Regulatory Category* è salito al 20% di tutte le *submission*. Si prevede che tale proporzione continuerà a salire negli anni prossimi, con una marcata diminuzione dell'uso di metodi sperimentali. È quindi fondamentale validare e sviluppare metodi di tossicologia predittiva, che comprendono modelli struttura-attività, metodi *in vitro*, e la loro combinazione all'interno di strategie globali.

### Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi sono:

- Sviluppo di allerte strutturali per la cancerogenesi non genotossica. Questi sono particolarmente importanti, coprendo un'area trascurata dalle legislazioni esistenti. Queste allerte saranno basate sulla ricognizione delle conoscenze meccanicistiche.
- Espansione e aggiornamento delle banche dati tossicologiche chimico-relazionali già rese disponibili sul sito ISSTOX <http://www.iss.it/ampp/dati/cont.php?id=233&lang=1&tipo=7>. Oltre alle attuali (cancerogeni, mutagenesi *in vivo* e *in vitro*), il sito ne includerà una sui biocidi. Tutte includono dati tossicologici rivisti criticamente.
- Elaborazione di ontologie per i principali effetti tossicologici, con la definizione formale di concetti, relazioni e regole, per l'integrazione e il controllo automatici di differenti banche dati. Queste ontologie saranno pubblicate nel linguaggio informatico OWL.
- Sviluppo di QSAR per classi di sostanze di particolare interesse tossicologico, con caratterizzazione di domini di applicabilità dei modelli, e ricerca automatica di sostanze congeneriche ad una data sostanza di cui si vogliono stimare le proprietà tossiche.
- Valutazione delle capacità predittive di test alternativi alla cancerogenesi *in vivo*, con particolare attenzione per il saggio di trasformazione cellulare. Si useranno tecniche di manipolazione al computer di strutture chimiche, con integrazione e analisi su larga scala di banche dati tossicologiche.

### Trasferibilità dei risultati

Tra i risultati ci sono:

- Espansione del sistema esperto *Toxtree* del *Joint Research Centre* (Ispra): <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/qsar/qsar-tools/index.php?c=TOXTREE>;
- Espansione del sistema esperto QSAR *Application Toolbox* dell'Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico (*Organization for Economic Cooperation and Development*, OECD): [http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en\\_2649\\_34379\\_42923638\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html);
- Distribuzione nel dominio pubblico di banche dati chimico relazionali di alta qualità;
- Contributo a linee guida e strategie di valutazione tossicologica in ambito OECD, ECHA, EFSA.

### **Validazione e sviluppo di metodi multiresiduo per residui di prodotti fitosanitari negli oli d'oliva e in matrici ad alto contenuto di grasso di origine vegetale**

Il Regolamento Europeo 396/2005 sui “Livelli massimi di residui di prodotti fitosanitari nei o sui prodotti alimentari e mangimi di origine vegetale e animale”, richiede l'utilizzo di metodi validati per l'analisi dei residui di prodotti fitosanitari negli alimenti di cui fanno parte gli oli di oliva e le matrici grasse di origine vegetale.

Lo sviluppo di metodologie multiresiduo validate secondo il documento SANCO/12495/2011 è essenziale per garantire l'affidabilità dei dati forniti da tutti i laboratori dell'SSN, sia per i controlli ufficiali per la verifica di conformità del Regolamento Europeo sopra citato che per i piani di monitoraggio nazionale ed europeo.

Si propone un piano triennale per lo sviluppo di metodi multiresiduo validati per le differenti classi di fitofarmaci negli oli di oliva: organofosforati, organoclorurati, piretroidi, carbammati e benzoilureici.

Lo sviluppo e la validazione di tali metodi è richiesta anche a supporto dell'LNR istituito presso il Reparto Antiparassitari e per proseguire nell'opera di coordinamento del Gruppo di Lavoro sui residui di prodotti fitosanitari negli oli di oliva del Consiglio Oleicolo Internazionale con la cui collaborazione sono stati organizzati 11 Proficiency Test.

Altro obiettivo è l'applicazione delle suddette metodiche validate ad altre matrici ad alto contenuto di grasso di origine vegetale.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Sono attesi i seguenti risultati:

- Messa a punto di metodi di analisi validati per differenti classi di residui di prodotti fitosanitari negli oli di oliva e in matrici ad alto contenuto di grasso di origine vegetale. Tali metodi richiedono un'ampia ricerca per lo sviluppo di tecniche di estrazione, purificazione e analisi strumentale aggiornate alle odierne conoscenze tecnico-scientifiche.
- Realizzazione di Proficiency Test sui residui di prodotti fitosanitari negli oli di oliva e in matrici ad alto contenuto di grasso di origine vegetale in collaborazione con i laboratori dell'SSN e altri enti nazionali e internazionali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Applicazione delle metodiche sviluppate e validate per i residui di prodotti fitosanitari negli oli di oliva, ad altre matrici grasse di origine vegetale.

### **Valutazione del rischio per la salute umana associato all'esposizione a cianotossine e tossine algali – Attività prevista nel Progetto EU Uptake of Environmental contaminants, Biotoxins and litter and their Impact on Seafood safety (ECOBIOSS)**

Negli ultimi anni in Italia sono aumentate le segnalazioni relative alla presenza nelle acque interne superficiali di fioriture di cianobatteri, produttori di cianotossine (CTX), alle quali l'uomo può essere esposto attraverso le acque potabili, il consumo di alimenti e di integratori alimentari contaminati o durante la balneazione. Recentemente è stata segnalata la fioritura di cianobatteri in acque costiere in concomitanza con fioriture di alghe tossiche marine, produttrici di biotossine. Nonostante le CTX rappresentino un problema sanitario rilevante, le informazioni tossicologiche disponibili e l'identificazione dei livelli espositivi di singole CTX sono limitate, ancor più in riferimento a miscele complesse come quelle che potrebbe essere presenti nei prodotti ittici, parte integrante della dieta mediterranea. Di conseguenza, la valutazione del rischio per l'adozione di eventuali misure di prevenzione

non sempre è possibile ed è affetta da un alto grado di incertezza. Obiettivi del progetto sono colmare alcune delle lacune conoscitive soprattutto relative ai processi di detossificazione/attivazione dell'uomo e migliorare il processo di valutazione dei rischi per la salute associati alla esposizione alle biotossine.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Le attività del progetto si svolgeranno in collaborazione con il Reparto di Qualità degli ambienti acquatici e delle acque di balneazione. I risultati attesi sono:

- sviluppo di metodologie di biologia molecolare per l'identificazione di cianobatteri tossici durante monitoraggi ambientali e biomonitoraggi in matrici biologiche di origine animale;
- identificazione dei fattori metabolici di suscettibilità individuale alle CTX, attraverso la caratterizzazione della loro biotrasformazione nell'uomo seguendo un approccio sperimentale avanzato, per individuare gruppi di popolazione a rischio;
- studio della biodisponibilità nell'uomo delle diverse forme di CTX e tossine algali per una migliore definizione dei livelli espositivi;
- caratterizzazione dei meccanismi di tossicità di CTX e tossine algali in modelli animali e cellulari.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le conoscenze acquisite potranno essere trasferite all'SSN e potranno essere tradotte in:

- miglioramento della valutazione del rischio e definizione delle soglie accettabili di esposizione alle cianotossine e tossine algali dalle varie fonti;
- miglioramento dei piani di monitoraggio, soprattutto in relazione alla valutazione dell'esposizione;
- predisposizione di piani di protezione della salute per gruppi di popolazione più suscettibili;
- trasferimento delle metodologie utilizzate nel corso del progetto alle strutture territoriali preposte al controllo e alla gestione di questa problematica.

### **Valutazione e prevenzione dell'esposizione alimentare a contaminanti di interesse prioritario attraverso la caratterizzazione dell'ambiente agricolo e domestico**

La qualità dell'ambiente rurale e interno costituisce un fattore chiave nella determinazione dell'assunzione per bocca di pesticidi e altri contaminanti di interesse prioritario, quali ritardanti di fiamma bromurati, sostanze perfluoro-organiche, composti ad attività diossino-simile, policlorobifenili, metalli pesanti, micotossine e radionuclidi, specie nei gruppi di popolazione più esposti. Tali gruppi di popolazione sensibili sono fondamentalmente costituiti da: animali da reddito allevati all'aperto, attraverso l'assunzione di acqua, suolo e polvere associate al pascolo e ai foraggi e dai bambini in età di gattonamento, a causa del contatto con la polvere degli appartamenti contaminata da sostanze presenti nei tappeti, nei pavimenti, sulle piante ornamentali, e in genere nei cosiddetti *consumers product*, o originate dagli animali da compagnia. Queste sorgenti di contaminazione possono rappresentare fino al 50% del contributo all'assunzione dei contaminanti ambientali selezionati.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Valori guida di qualità dell'ambiente quale pre-requisito della sicurezza alimentare e indicazioni a carattere pre-normativo riguardo alla gestione più idonea delle risorse ambientali e dei materiali a contatto, nelle produzioni animali.

- Piattaforma tecnica nell'ambito dei rapporti ambiente e salute, capace di interfacciare gli aspetti ambientali a quelli di sicurezza alimentare, nonostante le importanti differenze nelle rispettive legislazioni di settore.
- Piattaforma di conoscenza capace di ridurre le incertezze relative alla valutazione di assunzione di contaminanti da matrici ambientali (suolo, aria, acqua, materiali a contatto, polvere) negli animali da reddito, poichè gli studi di esposizione alimentare oggi che prevedono campionamenti a livello di grande distribuzione riferiti a consumi alimentari della popolazione generale, non sono indirizzati in modo specifico alla valutazione nei gruppi sensibili, quali agricoltori e bambini gattonanti (un anno). Questa piattaforma potrà soddisfare le richieste fatte recentemente da organismi internazionali (CE, Agenzia Europea per l'Ambiente, *European Environmental Agency* – EEA, EFSA, Programma delle Nazioni Unite per l'Ambiente, *United Nations Environmental Programme* – UNEP, WHO), per rafforzare i rapporti tra ambiente e salute.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Collaborazione tecnico scientifica con rete IZS e ARPA, su base georeferenziata, condividendo metodologie di indagine e risultati.

Divulgazione scientifica mediante pubblicazioni internazionali.

Trasferimento all'SSN mediante corsi ECM (Educazione Continua in Medicina).

#### **Valutazione dell'effetto dell'esposizione pre e post natale a metilmercurio in un modello murino di DSA del topo *reeler* eterozigote**

L'evidenza sperimentale suggerisce che l'esposizione ripetuta a basse dosi di mercurio durante le fasi precoci del neurosviluppo costituisce un fattore di rischio per disturbi dello spettro autistico (DSA, o *Autism Spectrum Disorder*, ASD), anche se è improbabile che l'esposizione al mercurio possa da sola causare autismo. È più probabile che la patogenesi dell'autismo richieda l'interazione di tre fattori: i) la predisposizione genetica (come indicato dalla presenza di mutazioni specifiche in una sottopopolazione di pazienti); ii) il sesso, ovvero l'ambiente interno ormonale (l'autismo è quattro volte più frequente nei maschi rispetto alle femmine; un'ipotesi che è stata fatta per spiegare la prevalenza maschile dell'autismo è l'effetto "tossico" del testosterone sul neurosviluppo); iii) fattori ambientali esterni, ad esempio il mercurio. Il peso relativo di ciascuno di questi tre fattori potrebbe essere differente da paziente a paziente, così che vi potrebbero essere forme di DSA di origine prevalentemente genetica, e forme di origine prevalentemente ambientale. Il presente progetto si propone di valutare l'effetto dell'esposizione pre- e post-natale a differenti dosi di metilmercurio in un modello murino di DSA, il topo *reeler* eterozigote, che presenta interessanti analogie neuropatologiche e comportamentali con pazienti affetti da DSA.

#### **Risultati attesi nel triennio:**

Dai risultati ottenuti si potrà valutare: i) se l'esposizione cronica a MeHg ad una dose sub-tossica in altri ceppi di topi riproduce cambiamenti patologici simili a quelli che si trovano nel cervello autistico; ii) se gli effetti patologici sono diversi da quelli che si verificano per il topo *reeler* eterozigote; iii) se gli effetti sono sesso-dipendenti.

**Dipartimento**  
**Ambiente e connessa prevenzione primaria**

---

**Attività di controllo, valutazione, parere**



### **Verifica della conformità dei materiali a contatto con alimenti alle normative nazionali ed europee**

Verifica della conformità dei materiali a contatto con alimenti alle normative nazionali ed europee: quest'attività comprende sia il controllo analitico-strumentale dei materiali a contatto con gli alimenti, secondo le normative vigenti, sia mediante la valutazione e conseguente autorizzazione di sostanze (monomeri, additivi, metalli, ecc.), da impiegare nella produzione di materiali e/o oggetti per uso alimentare.

#### **Attività programmata**

Proseguirà l'attività di verifica con una media di 30-40 controlli/anno.

### **Aggiornamenti di normative (OECD e UE)**

In qualità di membro del gruppo di esperti dell'OECD all'interno del *Test Guidelines Programme* (TGP) per il settore *Health Effects* (aree *Systemic acute toxicity*, *Systemic short-term toxicity* e *Systemic long-term toxicity*), la responsabile prepara i commenti alle bozze delle Linee Guida di nuova introduzione e/o revisionate, relative alle aree di *expertise*. Analogamente, partecipa alla Revisione dei *Technical Guidance Document* in supporto della Direttiva 93/67/EEC e del Regolamento Comunitario 1488/94, in qualità di esperto italiano per la tossicocinetica presso la CE *DG Joint Research Centre* (JRC). La responsabile è inoltre membro per l'Italia del gruppo per il Testing Tossicologico per la stesura del White Paper a livello comunitario.

#### **Attività programmata**

L'attività comporterà l'elaborazione di pareri e partecipazioni a riunioni. Si prevedono, per il triennio in esame, 15 linee guida per l'OECD e tre normative per l'UE.

### **Analisi della presenza di alghe tossiche e delle tossine correlate in campioni di acqua potabile, balneabile o utilizzabile a scopi umani ed elaborazione di misure per la gestione del rischio e il recupero dei corpi d'acqua interessati**

Campioni conferiti da organi regionali, organi di controllo locali, come ASL e ARPA, Comuni e Province vengono esaminati per l'identificazione e quantificazione di specie algali tossiche, in accordo con direttive del Ministero della Salute e leggi sanitarie nazionali. Le tossine presenti vengono rilevate, identificate e stimate con sistemi di biosaggi e sistemi chimici strumentali. Vengono formulati valutazioni e pareri sullo stato dei corpi d'acqua affetti e sul rischio diretto e indiretto derivante per la popolazione umana. Vengono effettuate ispezioni in luoghi interessati dal problema, vengono elaborate strategie per la gestione del rischio e per il recupero dei corpi d'acqua affetti, previo studio delle caratteristiche ecofisiologiche delle specie tossiche presenti; si partecipa a gruppi di lavoro e commissioni create per studiare efficienti gestioni del rischio e soluzioni di recupero.

#### **Attività programmata**

Le attività di studio continueranno a includere:

- valutazione del rischio sanitario associato alla presenza in acque di balneazione di contaminanti chimici, microrganismi patogeni, alghe tossiche marine e cianobatteri;
- studio delle relazioni tra territorio e qualità delle acque di balneazione;
- definizione dei criteri per l'individuazione di aree omogenee ad elevata criticità;
- elaborazione di criteri e linee guida per condurre piani di monitoraggio e per controllare la qualità delle acque interessate ai fenomeni di proliferazione di alghe tossiche marine e/o cianobatteri.

### **Analisi di revisione di prodotti fitosanitari risultati non corrispondenti alle specifiche della registrazione**

Le richieste di analisi di revisione di prodotti fitosanitari risultati non corrispondenti alle specifiche della registrazione vengono inoltrate all'Istituto sulla base del dettato del DPR 1255/1968, art. 17, punto 1, comma a) del DL.vo 194/1995. La gestione di tale attività richiede una continua attività sperimentale preliminare per la messa a punto dei metodi analitici adeguati agli accertamenti richiesti.

#### **Attività programmata**

Si prevede un totale di circa dieci pareri nel triennio 2012-2014.

### **Analisi di revisione di residui di antiparassitari in alimenti derivanti dall'uso improprio di prodotti fitosanitari**

Le richieste di analisi di revisione di residui di antiparassitari in alimenti derivanti dall'uso improprio di prodotti fitosanitari vengono inoltrate all'Istituto sulla base del dettato del DPR 1255/1968; art. 17, punto 1, comma b) del DL.vo 194/95. La gestione di tale attività richiede una continua attività sperimentale preliminare per la messa a punto dei metodi analitici adeguati agli accertamenti richiesti.

#### **Attività programmata**

Proseguirà l'attività di analisi di revisione per i residui di antiparassitari negli alimenti e l'attività consultiva a livello nazionale e internazionale su problematiche correlate all'identificazione e valutazione degli effetti tossici degli antiparassitari.

Si stima, in base alle verifiche annuali, che nel prossimo triennio le analisi di revisione per la ricerca di residui di antiparassitari saranno circa 250-300.

### **Analisi di Revisione per residui di antiparassitari**

L'attività di controllo del rispetto dei Limiti Massimi di Residui di antiparassitari negli alimenti deriva dall'art. 5 lett. h della Legge 30/04/1962, n. 283 e dal DPR 26/3/1980, n. 327, ed è affidato ai Laboratori delle ASL. Nel caso di risultati irregolari l'interessato ha facoltà di chiedere la ripetizione dell'analisi, che sarà effettuata presso l'ISS. L'analisi di revisione ha carattere di indagine processuale e, pertanto, è richiesto che siano garantiti i diritti della difesa. A tale scopo l'Istituto provvede a notificare la data dell'analisi al difensore di fiducia che può assistere, anche coadiuvato da un perito di fiducia, a tutta l'analisi. A questa attività è connesso lo sviluppo, l'aggiornamento e la validazione di metodi analitici e di tecniche strumentali.

#### **Attività programmata**

Nel prossimo triennio proseguiranno le analisi di revisione di analisi per residui di antiparassitari; si prevede un totale di circa 150-200 analisi di revisione.

### **Attività ispettiva e di controllo**

Partecipazione all'attività dei Gruppi ispettivi in relazione al DL.vo 27/1/1992 n. 120 per le Buone Pratiche di Laboratorio. Partecipazione all'attività dei Gruppi ispettivi in relazione alla Direttiva 93/42/CE per il rilascio della marcatura CE. Partecipazione ai lavori dei Gruppi ispettivi in relazione al DL.vo 26/05/1997 n.156, attuazione della Direttiva 93/99/CE relativa al controllo dei prodotti alimentari. Approntamento e gestione di programmi di controllo di qualità nazionali per la determinazione di elementi inorganici in specifiche matrici, rivolti alle strutture dell'SSN preposte al controllo. Determinazioni di contaminanti chimici in

matrici di diversa natura su richiesta del Nucleo Anti Sostituzioni (NAS) dei Carabinieri e/o della Magistratura.

**Attività programmata**

Proseguirà l'attività ispettiva, nell'ambito della marcatura CE (Direttiva 93/42/CE, recepita in Italia mediante DL.vo 46/1997 e successive modifiche). Inoltre proseguirà la valutazione della biocompatibilità dei DM; l'attività ispettiva ORL (norma EN ISO 17025); attività di Commissioni (ORL, Ministero Politiche Agricole); attività connessa con la presenza nel Reparto del Laboratorio Comunitario di Riferimento.

Si prevedono nel prossimo triennio circa 500 verifiche ispettive.

**Autorizzazione a sperimentazione animale in deroga**

L'attività comporta l'elaborazione di pareri relativi alla congruità della richiesta di poter utilizzare animali per sperimentazione in base alle richieste legislative, ai sensi degli articoli 8 e 9 DL.vo 116 del 21/1/1992.

**Attività programmata**

Si prevede per il triennio 2012-2014 un'elaborazione di circa 2-3 pareri/anno.

**Commissione nominata presso il Ministero della Salute per la valutazione dei livelli di policlorobifenili (PCB) riscontrati in campione di pesce d'acqua dolce**

Nell'ambito di questa commissione si è discusso sui livelli di PCB riscontrati in campioni di pesce d'acqua dolce appartenente a specie edibili, sul significato tossicologico di tali livelli e sul confronto tra i livelli nostrani e quelli presenti in altri paesi. In particolare, si è cercato di individuare i fattori di esposizione o biologici che possano aver influenzato i livelli e le differenze specie-specifiche riscontrate. Tra l'altro, è stata prodotta una valutazione qualitativa del potenziale ingresso di questi contaminanti attraverso questo prodotto alimentare nella dieta dell'uomo.

**Attività programmata**

Proseguirà l'attività di tale Commissione per tutelare i diritti della collettività rispetto ai rischi sanitari connessi all'inquinamento ambientale e in particolar modo per la tutela igienico-sanitaria degli allevamenti. A tale scopo, risulta necessario lo studio delle correlazioni tra la qualità dell'acqua e la qualità igienico-sanitaria dell'ittiofauna mediante indagini chimiche, fisiche, batteriologiche, tossicologiche, algali e l'identificazione dell'impatto sull'ambiente da parte degli impianti di piscicoltura mediante analisi comparative della qualità dell'ambiente acquatico a monte e a valle degli impianti.

Sarà sempre verificato l'uso delle sostanze farmacologicamente attive utilizzate in acquacoltura con verifiche quali-quantitative delle stesse per garantire ogni possibilità di intervento terapeutico mirato e indenne di rischi per la salute umana.

**Controlli analitici (matrici con tipologia da tariffario)**

Accertamenti di prima istanza o come revisione d'analisi relativi alla presenza di policlorobifenili, idrocarburi policiclici aromatici, e diossine in matrici alimentari e ambientali, sia di prassi sia a seguito di richiesta d'intervento mirato (es. emergenze). Partecipazione a circuiti nazionali/internazionali d'intercalibrazione tra laboratori. Definizione e/o ottimizzazione di procedure microanalitiche sia per rispondere a esigenze di natura tecnico-scientifica (es. livelli di sensibilità, grado d'affidabilità/specificità) sia in risposta a esigenze normative anche internazionali (ambito UE). Questa attività comprende

anche quella, di settore, relativa all'LNR per la ricerca dei residui negli animali vivi e nei loro prodotti, in relazione all'esecuzione, per quanto di pertinenza, del Piano nazionale per la ricerca dei residui negli animali e in alcuni prodotti d'origine animale (PNR). Quest'ultimo è definito su base annua previa verifica/delibera in ambito comunitario. La copertura finanziaria proviene direttamente dall'Istituto e da convenzioni.

#### **Attività programmata**

Attività analitica, riferibile alla determinazione di elementi chimici in vari substrati, su richiesta di altri Reparti o Dipartimenti dell'ISS, con particolare riferimento a materiali in contatto con alimenti. Si prevedono circa 100 analisi nel triennio.

Proseguiranno i controlli analitici nelle acque destinate al consumo umano; verifica della qualità microbiologica e sicurezza dei prodotti cosmetici.

### **Controllo di presenza di farmaci negli alimenti destinati ad uso zootecnico e dei loro residui nelle derrate di origine animale e nell'ambiente**

Messa a punto, validazione di metodi analitici atti a rilevare, identificare e, ove richiesto, determinare/dosare la presenza di farmaci e di loro residui in matrici vegetali e animali. Tale attività, data la specifica esperienza maturata nello studio del bioaccumulo di antibiotici in organismi vegetali, può essere estesa a organismi vegetali destinati anche al consumo umano. Le competenze specifiche in questo ultimo settore sono riconducibili all'attività di ricerca svolta nel campo della valutazione ecotossicologica dei farmaci veterinari.

#### **Attività programmata**

I residui di farmaci si trovano come inquinanti ambientali, pertanto prosegue l'attività di controllo che prevede un espletamento di 15 campioni circa nel prossimo triennio.

### **Coordinamento nazionale in ambito OECD dello sviluppo/aggiornamento delle linee-guida di saggio per prodotti chimici**

Co-ordinatore nazionale del *Test Guidelines Programme* dell'OECD. Il programma, il cui obiettivo è la definizione o l'aggiornamento rispettivamente di nuove e vecchie linee-guida di saggio per la caratterizzazione dei prodotti chimici (inclusi i pesticidi, biocidi, ecc.), affrisce alle attività del *Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides, and Biotechnology (Health and Safety Division, Environment Directorate, OECD)*. Le riunioni si svolgono a Parigi con frequenza di una o due all'anno, per due o tre giorni ciascuna. Spese a carico dell'ISS.

#### **Attività programmata**

Per l'attività in esame, si prevedono circa tre riunioni nel triennio 2012-2014.

### **Cosmeticosorveglianza**

L'argomento rientra tra i compiti fissati per l'ISS dalla Legge 11 ottobre 1986, n. 713 e aggiornamenti e si inserisce tra gli obiettivi del piano sanitario sulla tutela della salute volto a promuovere l'adozione di comportamenti e stili di vita in grado di favorire la salute e il miglioramento della qualità della vita. In tale contesto può essere considerato il positivo ruolo dei cosmetici le cui finalità d'impiego rientrano nei bisogni, nei comportamenti e negli stili di vita che sono distintivi di una società moderna che pone l'igiene, la cura della persona, la protezione della cute e la prevenzione tra quelle componenti che sono alla base del vivere sano e civile. Un'attenzione particolare dunque agli effetti indesiderati dei cosmetici, che è previsto che devono essere monitorati, ma soprattutto è importante attuare i compiti che la legge prevede per l'ISS per promuovere la prevenzione che trova una sua

prima espressione negli atti del Corso di formazione di base “Cosmeticosorveglianza” tenutosi presso l’ISS il 27-29/9/2000.

#### **Attività programmata**

Considerato il continuo aumento dell’utilizzo di prodotti cosmetici e preparati a base di piante medicinali e officinali, la valutazione sulla sicurezza di tali prodotti proseguirà anche per il triennio in considerazione. Si utilizzeranno ancora metodologie chimiche e metodi *in vitro*, alternativi alla sperimentazione animale, così come richiesto dalle attuali disposizioni normative comunitarie.

### **Elaborazione di monografie di valutazione di principi attivi antiparassitari nuovi o già presenti in commercio**

Su richiesta del Ministero della Salute vengono elaborate monografie di valutazione di principi attivi antiparassitari nuovi o già presenti in commercio, ai fini della stima del rischio tossicologico e ambientale, relativamente alle proprietà chimico-fisiche, ai metodi analitici e al comportamento dei residui negli alimenti (Dir. UE 414/91 recepita con DL.vo 194/95). Tale attività comporta anche la partecipazione a riunioni di valutazione delle monografie elaborate dall’Italia e dagli altri Stati membri dell’UE presso *European Commission Co-ordination for the Evaluation of Active Substances Contained in Plant Protection Products under Council Directive 91/414/EEC* (ECCO).

#### **Attività programmata**

L’attività comporterà la partecipazione alla stesura di monografie europee per l’inclusione in All. 1 alla Dir. UE 91/414 di prodotti fitosanitari per le quali l’Italia è un Paese membro *Rapporteur* relativamente agli aspetti legati agli effetti per la salute dell’uomo; preparazione delle risposte ai commenti degli altri Stati membri e partecipazione alle riunioni tecniche a Parma presso l’EFSA-PRAPeR (Unità di esame tra pari della valutazione del rischio dei pesticidi) per la definitiva approvazione dell’*Assessment Report*. Sulla base delle attività degli ultimi due anni si prevede una attività annuale di: una Monografia (principi attivi); cinque Allegati III (Prodotti). Risposta ai commenti di altri Stati membri su due Monografie presentate in precedenza e una settimana di riunione per la riunione al PRAPeR.

### **Emergenza ambientale fiume Sacco (Assessorato Ambiente Regione Lazio)**

Diversi esperti del Dipartimento partecipano alle attività di Commissioni coordinate dall’Assessorato Ambiente della Regione Lazio e/o dal Vice-Commissario incaricato. L’emergenza è dovuta all’inquinamento del bacino fluviale e della valle del fiume Sacco determinato da un sito industriale a monte, e rappresenta un problema di molti anni.

#### **Attività programmata**

Proseguirà l’attività di analisi di metalli pesanti riferibili alla emergenza ambientale del fiume Sacco.

### **Expert consultation on endocrine disrupters testing in amphibians, OECD**

Nell’ambito della prima riunione, avvenuta a Parigi dal 26 al 27/4 di quest’anno, sono stati discussi numerosi argomenti riguardanti il testing per un saggio di screening, valido anche come surrogato per individuare effetti potenziali sulla tiroide dell’uomo, da utilizzare per la valutazione degli effetti degli EDC. La scelta e la discussione si è incentrata principalmente sul saggio sulla metamorfosi della rana, un modello animale ampiamente diffuso e disponibile. L’obiettivo è quello di definire delle linee-guida per la valutazione

dell'azione tossica degli EDC, nell'ambito dell'*Health and Safety Programme* dell'OECD, per questo e per un altro saggio, di livello II, sullo sviluppo e la riproduzione degli anfibi, di cui però si è appena accennato. Si prevedono, quindi, altre riunioni fino alla definizione di tali linee guida.

**Attività programmata**

Si prevede una riunione nel triennio in esame.

**Identificazione molecolare di virus nell'acqua**

Lavoro istituzionale in ottemperanza alle direttive CE (76/160 dell'8/12/1975) recepite dalla legislazione italiana con DPR 14/5/1988 n. 155 e DPR 236 del 24/5/1988 o particolari situazioni di emergenza (18/12/1997 prot. S. 2992/62 bis, 12/11/1998 prot. 042408 08/9/2001, prot. 3600). Il protocollo messo a punto è di tipo non tradizionale ma abbastanza consolidato. Esso consiste nella concentrazione del campione d'acqua mediante passaggio su membrane elettropositive (*Virosorb, CUNO, Inc., Meriden, Conn. USA*; ultracentrifugazione del particellato a 100.000xg). Estrazione acidi nucleici e ricerca, mediante analisi molecolare (PCR) e filogenetica, dei seguenti agenti virali: enterovirus, reovirus, virus dell'epatite A, rotavirus, adenovirus 40 e 41, citomegalovirus, virus di Norwalk, reovirus, *herpes simplex 1* e 2, influenza A. Le sequenze genomiche riscontrate vengono paragonate a quelle di una banca data aggiornata di enterovirus umani (<https://sat3.iss.it/>) che garantisce, almeno per questi patogeni, delle risposte attendibili. Per l'identificazione di batteri non identificabili con metodi fenotipici viene usato come target molecolare il gene 16S rDNA e l'analisi FAFLP (*fluorescent amplified fragment length polymorphism*). Una banca dati di frammenti di restrizione è stata predisposta a tale proposito ed è esclusiva dell'ISS in quanto costituita con ceppi batterici provenienti dai piani di sorveglianza nazionale.

**Attività programmata**

L'attività continuerà lo studio della diffusione nell'ambiente acquatico di gruppi microbici che possono costituire rischi per la salute umana. Pertanto gli studi saranno orientati, oltre che alla caratterizzazione igienico-sanitaria delle acque, anche alla definizione e messa a punto di specifiche metodologie analitiche per la ricerca di virus e/o batteri indicatori, patogeni, opportunisti e parassiti. Dal punto di vista tecnico operativo verranno applicate metodiche colturali tradizionali, metodi rapidi, tecniche immunologiche e procedure di biologia molecolare.

**Ispezioni per la verifica di conformità ai principi Buona Pratica di Laboratorio (DL.vo 120/92 e successive modifiche)**

Si tratta di attività ispettiva per la verifica di conformità dei Centri di Saggio ai principi di Buona Pratica di Laboratorio, effettuata in qualità di esperto nazionale per i saggi di metabolismo e tossicocinetica e per gli studi tossicologici *in vivo* nella lista del Ministero della Salute (nomina con decreto del Ministro della Sanità 27/2/1997). I principi di Buona Pratica di Laboratorio (BPL) si applicano a tutti gli studi non clinici sulla sicurezza per la salute umana e per l'ambiente resi obbligatori dalla normativa in materia di registrazione e licenze di prodotti farmaceutici, antiparassitari, additivi per mangimi e alimenti, prodotti cosmetici, medicinali ad uso veterinario e prodotti analoghi e da quella sui prodotti chimici.

**Attività programmata**

Per quanto riguarda gli aspetti relativi ai test di mutagenesi, in base all'attività precedente si prevedono circa due-tre ispezioni BPL per il triennio in esame.

L'attività comporta visite ispettive ai centri di saggio che richiedano certificazione in ambito di saggi di tossico cinetica e metabolismo e tossicologia *in vivo/in vitro*, eventualmente precedute da riunioni preparatorie del Gruppo ispettivo e necessarie alla stesura del verbale (totale tre-quattro giorni per ispezione). Sulla base delle attività degli ultimi due anni si prevede una media di sei ispezioni all'anno.

### **Misure di prevenzione e di sicurezza dei sistemi acquedottistici nei confronti di possibili atti terroristici**

Vengono individuati alcuni aspetti critici nella gestione dei sistemi idrici e di distribuzione delle acque destinate a consumo umano rispetto a minacce e attentati, definiti possibili scenari di rischio ed elaborate ipotesi di intervento per fronteggiare i pericoli correlati alla diffusione intenzionale di agenti chimici, radiologici e biologici nelle reti idriche.

#### **Attività programmata**

Si prevede un totale di 12 controlli nel triennio 2009-2011.

### **Monitoraggio al fine di valutare l'impatto dello scarico sullo stato ecologico del corpo idrico recettore**

Nell'ambito dell'accordo di collaborazione con l'Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile (ENEA) il nostro laboratorio sarà impegnato in uno studio degli ecosistemi acquatici strettamente interconnessi con il refluo liquido proveniente da un impianto di trattamento di rifiuti radioattivi. Il refluo dovrà essere immesso nel corpo idrico recettore previo trattamento depurativo e dovrà rispettare i parametri di legge (DL.vo 152/1999 e 258/2000). Le attività di campo saranno supportate da un'indagine preliminare che utilizzerà Sistemi Informativi Geografici (GIS) e Modelli Digitali del Terreno (DEM). Verranno raccolti, con cadenza almeno stagionale, campioni d'acqua e sedimento per le analisi chimiche e microbiologiche, utilizzando le metodologie standard. In particolare il campionamento dei sedimenti e del particolato in sospensione potrà rappresentare l'occasione per la standardizzazione delle metodologie utilizzate. Il campionamento di matrici biologiche (diatomee, *periphyton*, macroinvertebrati) seguirà metodologie già messe a punto. Per la valutazione della struttura complessiva dell'ecosistema verrà usata la metodologia recentemente standardizzata.

#### **Attività programmata**

Proseguiranno i lavori di controllo nel quadro generale della tutela delle acque, con l'obiettivo di prevenire e ridurre l'inquinamento, garantire gli usi sostenibili delle risorse, mantenere la capacità naturale di autodepurazione dei corpi idrici. Le attività di controllo e di ricerca in questo contesto si indirizzeranno principalmente alla conoscenza dei processi di inquinamento e allo sviluppo di metodologie volte a prevenire e a ripristinare la salute degli ambienti acquatici.

### **Opinioni per l'EFSA e per il Comitato Nazionale per la Sicurezza Alimentare (CNSA)**

Diversi esperti del Dipartimento partecipano all'attività dell'EFSA e/o formulano pareri inerenti la sicurezza alimentare a livello nazionale e internazionale.

#### **Attività programmata**

Si continueranno a formulare pareri inerenti la sicurezza alimentare a livello nazionale e internazionale, con una previsione di dieci pareri e 15 riunioni nel triennio.

### **Pareri nel campo della tossicologia genetica**

Viene svolta attività di parere nel campo della tossicologia genetica (mutagenesi e genotossicità), consistente nella valutazione di studi e dossier tossicologici relativi all'argomento, classificazione e valutazione di agenti mutageni, revisione o elaborazione di linee guida. L'attività di cui sopra viene svolta in sedi istituzionali nazionali (ISS, Commissione Consultiva Tossicologica Nazionale, Commissione Consultiva Prodotti Fitosanitari) e internazionali (OECD, CE, Comitati scientifici sull'alimentazione umana e sulle piante), anche nell'ambito della *Scientific COOPeration* (SCOOP).

#### **Attività programmata**

Nel prossimo triennio si svolgerà l'attività di formazione per operatori dell'SSN e per studenti universitari in corsi organizzati presso l'ISS o con contributi a corsi, convegni e seminari presso altre sedi.

Proseguirà la partecipazione a commissioni tecniche in sedi istituzionali nazionali (ISS, Commissione Consultiva Tossicologica Nazionale, Commissione Consultiva Prodotti Fitosanitari) e internazionali (OECD, CE, comitati scientifici sull'alimentazione umana e sulle piante), anche nell'ambito della *Scientific Cooperation* (SCOOP). Sulla base del carico di lavoro nel precedente triennio, si prevede per il periodo 2012-2014 la produzione di circa 12 pareri su richiesta della Direzione del Dipartimento.

### **Partecipazione alla revisione delle *guideline* europee per la cancerogenesi**

Partecipazione alle riunioni della Comunità europea per la stesura delle nuove *guideline* europee per la cancerogenesi delle sostanze chimiche di nuova immissione sul mercato.

#### **Attività programmata**

Il trasferimento delle conoscenze sui meccanismi di cancerogenesi al piano normativo e di controllo avverrà nel prossimo triennio attraverso la partecipazione a commissioni e gruppi di lavoro dedicati all'elaborazione di linee guida. In tale ambito si svolgerà l'attività consultiva nel gruppo *ad hoc* di esperti e nel gruppo di coordinazione sullo Q(SAR) dell'OECD e l'attività consultiva nel gruppo *ad hoc* di esperti sulla tossicogenetica in ambito OECD. Inoltre è stata avviata e continuerà ad essere aggiornata la base dei dati dei cancerogeni chimici, con lo scopo di servire come sistema di supporto alle decisioni degli esperti.

### **Partecipazione come esperto/delegato ad attività OECD nell'ambito dell'*Environment Directorate***

Delegato nazionale del Ministero dell'Ambiente e/o dell'Istituto, con frequente funzione di Capo-delegazione, al *Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides, and Biotechnology (Health and Safety Division, Environment Directorate, OECD)*. Gli argomenti trattati riguardano in senso generale la gestione del rischio chimico in relazione ai saggi di caratterizzazione (*Test Guidelines Programme*), ai prodotti chimici esistenti, a quelli di nuova produzione, ai pesticidi, ai biocidi, all'eliminazione dei rifiuti, alla sicurezza dell'industria chimica ("legge Seveso"), ecc. Incarico rinnovabile di volta in volta; le riunioni si svolgono a Parigi con frequenza di una o due all'anno, per quattro o cinque giorni ciascuna. Spese a carico dell'ISS.

#### **Attività programmata**

Continuerà la collaborazione al *Test Guideline Program* nel prossimo triennio.

### **Procedura Centralizzata EMA (*European Medicines Agency*). Pareri di mutagenesi e cancerogenesi. Mutuo riconoscimento**

Valutazione dei dossier tossicologici di farmaci di nuova istituzione per fornire un parere scientifico sui possibili rischi mutageni o cancerogeni. Rispondere a richieste di pareri provenienti dal Ministero della Salute su possibili rischi mutageni e cancerogeni di farmaci.

#### **Attività programmata**

Nel prossimo triennio proseguirà l'attività consultiva a livello nazionale e internazionale sulle problematiche correlate alla identificazione e valutazione degli effetti genotossici e cancerogeni delle sostanze chimiche e dei prodotti biologici per identificare il pericolo, la valutazione del rischio ed elaborare linee guida per la sperimentazione tossicologica e clinica di fase I. Continuerà l'attività consultiva a livello nazionale sulla valutazione tossicologica di nuovi prodotti e nuovi ingredienti alimentari e attività in ambito internazionale (CE, EFSA, OECD) sulle problematiche correlate all'identificazione degli effetti genotossici e cancerogeni delle sostanze chimiche; proseguirà l'attività di consulenza nella preparazione delle linee guida per la sperimentazione clinica di fase I con prodotti per la terapia genica e cellulare somatica.

### **Supporto tecnico-scientifico all'UE nella classificazione di sostanze pericolose per gli effetti mutageni e cancerogeni (*Commission Group of Specialized Experts on carcinogenicity, Mutagenicity and Reproductive Toxicity*)**

Viene svolta attività consultiva nell'ambito del gruppo di esperti specializzati per quanto riguarda la genotossicità delle sostanze chimiche e la loro relativa classificazione. L'attività indicata non è svolta su base routinaria, in quanto il gruppo di esperti specializzati viene convocato solo a fronte di situazioni controverse o di difficile interpretazione non gestibili dal *Working Group Classification and Labelling dell'European Chemical Bureau*.

#### **Attività programmata**

Non è prevedibile l'eventuale carico di lavoro per il triennio 2009-2011. Si sottolinea come ciascuno dei pareri richiesti, per la sua stessa natura, richieda di visionare una estesa documentazione e un lungo lavoro preparatorio.

### **Valutazione del rischio ambientale connesso con la presenza di metalli pesanti**

L'attività riguarda tutte le situazioni in cui la presenza di metalli pesanti nell'ambiente (suolo, acqua, aria) può rappresentare un rischio tossicologico per l'uomo. In particolare sarà valutato il potenziale trasferimento di metalli pesanti alla catena alimentare in aree interessate da attività minerarie dismesse.

#### **Attività programmata**

Proseguirà l'attività di controllo in tutte quelle situazioni in cui i metalli pesanti rappresentano un pericolo per l'ambiente, poiché tendono a bioaccumularsi. In particolare continuerà la valutazione del potenziale trasferimento di metalli pesanti alla catena alimentare in aree interessate da attività minerarie dismesse e inoltre sarà effettuato un monitoraggio biologico di soggetti esposti.

### **Valutazione del rischio connesso all'uso di giocattoli**

Si effettuano controlli sulla sicurezza dei giocattoli ai fini del DL.vo 313/1991.

**Attività programmata**

Si prevede un totale di 150 controlli nel prossimo triennio.

**Valutazione del rischio connesso all'uso di prodotti di consumo**

Si effettuano verifiche e controlli di rischi connessi all'uso di prodotti di vario consumo, ritenuti pericolosi per la salute dei consumatori, ai fini del DL.vo 206/2005.

**Attività programmata**

Si prevede un totale di 60 controlli nel triennio in esame.

**Valutazione del rischio sanitario associato alla presenza di tossine algali negli ambienti acquatici**

Negli ultimi tempi è stato riscontrato un notevole incremento di segnalazioni di fioriture algali e in molti casi questo Istituto, e in particolare il nostro Dipartimento, sono stati coinvolti con richiesta sia di interventi sul piano analitico sia di pareri di tipo tossicologico.

**Attività programmata**

L'attività comporterà l'elaborazione di pareri e risposte a interrogazioni parlamentari sulla valutazione dei rischi per la salute legati alla esposizione a cianotossine e altre tossine algali e alla partecipazione a vari tavoli tecnici presso le strutture periferiche. Sulla base delle attività dell'ultimo triennio si prevede un'attività annuale di due-quattro pareri.

**Valutazione del rischio sanitario associato all'uso di medicine non convenzionali**

Poiché altri stili di vita comportano l'utilizzo di beni di consumo che possono costituire una fonte di esposizione da valutare, saranno studiate le problematiche tossicologiche derivanti dall'utilizzo di cosmetici (professionali e non) nonché dalla assunzione di preparati di medicine alternative (ayurvediche e cinesi).

**Attività programmata**

L'attività in questo settore si riferisce alla richiesta di valutare la presenza di metalli pesanti, intenzionalmente aggiunti o presenti come contaminanti, in prodotti di medicina ayurvedica e/o prodotti della medicina cinese e proseguirà nel triennio, non potendo tuttavia programmare il numero delle richieste.

**Valutazione del rischio sanitario connesso con l'uso di cosmetici e di bigiotteria**

Poiché altri stili di vita comportano l'utilizzo di beni di consumo che possono costituire una fonte di esposizione da valutare, saranno studiate le problematiche tossicologiche derivanti anche dall'uso di bigiotteria e cosmetici, in particolare metalli tipo nichel.

**Attività programmata**

La presenza di metalli allergizzanti, quali nichel e cromo, costituisce uno dei fattori di rischio più consistenti nell'uso di cosmetici e, in particolare, di bigiotteria realizzata con leghe contenenti nichel. L'attività comporta elaborazione di pareri congiuntamente al FARM relativi all'uso di prodotti cosmetici. Sulla base delle attività del precedente triennio, si prevede l'elaborazione di circa 10-15 pareri.

### **Valutazione della genotossicità di sostanze a contatto con alimenti, aromatizzanti, additivi alimentari e coadiuvanti di processo (EFSA)**

L'attività consultiva per l'UE sulla genotossicità delle sostanze a contatto con gli alimenti, sugli aromatizzanti, gli additivi alimentari e i coadiuvanti di processo, è svolta con continuità a partire dal 1996, prima nell'ambito del Comitato scientifico per l'alimentazione umana (*Working Group Food Packaging Materials*), e poi per l'EFSA (*Scientific Panel AFC*). La valutazione della genotossicità è un elemento indispensabile nella valutazione del rischio per la salute degli alimenti e delle sostanze ad essi correlati, e viene svolta in base a principi stabiliti da linee guida *ad hoc*, alla cui elaborazione ha contribuito il Reparto (*EFSA Guideline documents on Food Additive, Chemically Defined Flavourings, Smoke Flavourings. Enzymes*).

#### **Attività programmata**

Nel triennio precedente sono stati elaborati circa 30 pareri. Un carico di lavoro analogo è ipotizzabile per il triennio 2012-2014.

### **Valutazione dell'esposizione umana a inquinanti ad elevata persistenza e tossicità/definizione di azioni di riduzione dell'esposizione e valutazione del rischio tossicologico**

Tale attività viene svolta nell'ambito delle Convenzioni "United Nations Environment Programme on Persistent Organic Pollutants (UNEP-POP)" e "United Nations Economic Commission for Europe: long range transport air pollution", della cui implementazione è responsabile per l'Italia il Ministero dell'Ambiente. Queste convenzioni hanno il fine di ridurre la presenza nell'ambiente (e la conseguente esposizione umana) di una serie di inquinanti ad elevata persistenza e tossicità tramite la messa a punto di una serie di azioni di tipo regolatorio/normativo concertate a livello internazionale/UE.

#### **Attività programmata**

Si prevede per tale attività, nel triennio 2012 -2014, un espletamento di circa dieci pareri.

### **Valutazione dell'idoneità di materiali a contatto con acque destinate al consumo umano**

Lo studio dei materiali a contatto con acque destinate al consumo umano riveste una notevole rilevanza sanitaria in considerazione della possibile presenza di fattori di rischio nelle acque, riconducibili a cessione da parte degli elementi utilizzati in acquedottistica. In tale contesto è stato pertanto sviluppato il progetto di ricerca "Modelli gestionali innovativi di controllo igienico-sanitario delle reti acquedottistiche con riferimento alla captazione, al trattamento, all'adduzione, alla raccolta, alla distribuzione dell'acqua destinata al consumo umano e al controllo della sua qualità".

#### **Attività programmata**

Proseguirà la valutazione e gestione del rischio per problematiche connesse alla qualità chimica, microbiologica (batterica e virale) delle acque da destinare e destinate al consumo umano, acque reflue, ricreative, sabbie e sedimenti, fanghi da depurazione, biofilm (es. composti ad azione endocrina, residui di farmaci e prodotti per l'igiene personale, pesticidi e loro metaboliti, patogeni emergenti e virus autoctoni e alloctoni). Inoltre continuerà lo studio e controllo del destino ambientale di contaminanti emergenti nelle acque da destinare a consumo umano.

### **Valutazione di metodi di tossicità *in vitro***

Sperimentazione *in vitro* con colture cellulari e altri modelli non animali.

#### **Attività programmata**

L'attività comporterà l'elaborazione di pareri che per il prossimo triennio si stimano essere circa 12.

### **Valutazione di progetti di bonifica di suoli di siti inquinati di interesse nazionale e non**

Viene effettuata attività di supporto ad enti pubblici, quali Ministero Ambiente, Regioni e Province, in merito alla valutazione igienico-sanitaria connessa ai suoli e acque contaminate nelle aree afferenti ai SIN.

#### **Attività programmata**

Si prevede la partecipazione a segreterie tecniche e conferenze di servizi per le istruttorie e approvazioni dei progetti di bonifica dei suoli, sedimenti e acque nell'ambito dei SIN (ai sensi del DL.vo 152/2006 e s.m.i., art. 252) (circa 100 riunioni/anno); inoltre verranno effettuati sopralluoghi e campionamenti di suoli contaminati in sistemi di bonifica di interesse nazionale (su richiesta del Ministero dell'Ambiente, circa dieci interventi/anno) e sopralluoghi su siti di smaltimento rifiuti e prelievo campioni (su richiesta della Magistratura, circa due interventi/anno); proseguirà la formulazione di pareri per la definizione di una concentrazione limite di riferimento da considerare come Concentrazione Soglia di Contaminazione (CSC) per suoli e acque (su richiesta di Regioni, Ministero Ambiente, ARPA, ASL, Comuni, circa 20 richieste l'anno) e la formulazione di pareri per la valutazione del rischio connessa a suoli e acque contaminate (su richiesta del Ministero dell'Ambiente, circa 50 richieste/anno); elaborazione di pareri in merito alla classificazione dei rifiuti pericolosi (su richiesta ARPA, Regioni, Province, Ministero dell'Ambiente, Magistratura, circa dieci pareri/anno); si provvederà anche alla stesura di pareri e partecipazioni a riunioni tecniche per elaborazioni normative tecniche in materia di gestione rifiuti e bonifiche suoli.

### **Valutazione sulla sicurezza igienico-sanitaria delle apparecchiature per il trattamento delle acque potabili**

La qualità dell'acqua potabile, quella che arriva fino al rubinetto delle nostre case, è notevolmente condizionata dalla struttura e dallo stato delle reti idriche utilizzate per la distribuzione. Nei pochi casi in cui per alcuni metalli, come nichel, ferro e piombo, sono stati riscontrati livelli superiori a quelli massimi previsti dalla normativa recentemente introdotta, la causa delle contaminazioni sarebbe da ascrivere alle scarse condizioni di manutenzione delle condutture interne alle abitazioni, oltre che alle caratteristiche proprie di alcuni tipi di acqua.

#### **Attività programmata**

Proseguirà il controllo delle apparecchiature per il trattamento delle acque potabili, garantendo la conformità dell'acqua ai parametri stabiliti dal DL.vo 31/2001, al punto di fornitura dell'acqua prima della sua trasformazione. Non sono prevedibili i controlli che si effettueranno nel prossimo triennio.

### **Valutazione tossicologica e della genotossicità dei prodotti fitosanitari (DL.vo /95)**

Viene svolta attività di parere sulla genotossicità dei principi attivi dei prodotti fitosanitari nuovi per l'Europa o per l'Italia nell'ambito della Commissione Consultiva sui Prodotti Fitosanitari e, per quanto riguarda la revisione europea dei prodotti fitosanitari, dell'attività istituzionale dell'ISS. A tal fine vengono esaminati dossier predisposti dalle ditte produttrici ed effettuate ricerche bibliografiche sulle principali basi di dati online.

#### **Attività programmata**

L'attività su indicata ha carattere di continuità, essendo il Direttore del Reparto membro della Commissione citata, con un carico di lavoro stimabile in base alla esperienza pregressa in circa 12 pareri per il triennio 2012-2014.

### **Valutazioni per lo SCHER della EU DG SANCO**

L'attività di valutazione del rischio per la salute umana viene svolta sia per istituzioni pubbliche nazionali centrali (Ministeri della Salute e dell'Ambiente), che periferiche (Regioni, SSN, agenzie del sistema APAT/ARPA). Vengono esaminate problematiche correlate all'identificazione e alla valutazione degli effetti tossici di sostanze chimiche con varie destinazioni d'uso (pesticidi, biocidi, aromatizzanti) di contaminanti ambientali naturali (cianotossine, alghe tossiche marine) e di sintesi presenti nei vari comparti o nella catena alimentare ai fini della valutazione e caratterizzazione del rischio per la salute umana e dell'elaborazione di linee guida per la identificazione di limiti. Si effettuano valutazioni e pareri per lo *Scientific Committee for Health and Environmental Risks* (SCHER) della EU DG SANCO.

#### **Attività programmata**

Si prevede per il prossimo triennio una attività annuale di: una media di sei-otto riunioni a Bruxelles e preparazione di due-tre *opinion* come *co-rapporteur*; inoltre altre dieci esaminate come membro del Comitato.

### **Valutazioni tossicologiche e pareri**

Sulla base delle competenze specifiche nei settori tossicocinetica, metabolismo e tossicità, si svolge una attività generale di valutazioni tossicologiche e pareri inerenti sostanze chimiche di varia natura.

#### **Attività programmata**

L'attività comporterà l'elaborazione di pareri relativi a valutazioni tossicologiche di sostanze chimiche di varia natura e con diverse destinazioni d'uso, a supporto delle varie attività del Dipartimento. Essendo un'attività molto varia e soggetta a specifiche esigenze contingenti non è possibile fare stime quantitative attendibili.



**Dipartimento**  
**Biologia cellulare e neuroscienze**

---

**Attività di ricerca**



### **Analisi comportamentali di topi 5XFAD iniettati con rAAV- per il rilascio sinaptico e secretorio dell'anticorpo intracellulare anti Abeta 1-42**

Si tratta del WP4 nell'ambito del progetto "Strategie immunoterapiche innovative nella malattia di Alzheimer mediante la tecnica degli anticorpi intracellulari", Programma di collaborazione Italia-USA.

L'accumulo di oligomeri Abeta è un evento sinapto-tossico che precede la formazione delle placche extracellulari ed è correlato con lo sviluppo dei primi deficit cognitivi. Sebbene non ci siano ancora strategie terapeutiche efficaci contro la malattia di Alzheimer, è stato dimostrato che l'immunoterapia può essere un valido strumento per contrastarla. La maggior parte delle strategie terapeutiche è mirata alla neutralizzazione delle fibrille extracellulari di Abeta. Gli anticorpi intracellulari sono stati utilizzati con successo su diverse malattie neurodegenerative, incluse l'Huntington, il Parkinson (*Parkinson Disease*, PD) e malattie prioniche. L'obiettivo principale del progetto è sviluppare nuove strategie immunoterapiche contro le isoforme dell'oligomero beta amiloide 1-42 mediante l'uso di anticorpi intracellulari rilasciati in specifici siti di generazione e aggregazione di Abeta.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Saggiare *in vivo* gli effetti sinapto- e neuroprotettivi di anticorpi intracellulari anti-oligomero Abeta 1-42 in un modello murino di Alzheimer (5XFAD) attraverso analisi biochimiche e comportamentali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questo progetto è finalizzato allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per contrastare malattie da misfolding proteico, una classe di malattie per cui il blocco degli aggregati tossici, dovuto ad anticorpi ricombinanti, sembra essere un approccio promettente. Inoltre, le innovazioni di questi studi si tradurranno in nuovi modelli validati *in vivo* e *in vitro* per lo studio della biologia di Abeta.

### **I mitocondri come bersagli e mediatori degli effetti benefici degli agonisti PPARg nella Sclerosi Multipla**

Disfunzioni delle attività enzimatiche mitocondriali, danno ossidativo e difetti genetici del DNA mitocondriale sono coinvolti nello sviluppo e progressione della Sclerosi Multipla (SM). I mitocondri svolgono un ruolo chiave nella degenerazione assonale, e alterazioni della loro funzione interferiscono con l'attivazione microgliale. I recettori attivati dai proliferatori dei perossisomi di tipo gamma (PPARg) sono coinvolti in diverse funzioni cellulari. Agonisti naturali e sintetici del PPARg possono controllare i processi infiammatori del Sistema Nervoso Centrale (SNC). Abbiamo dimostrato che un agonista sintetico del PPARg, modula l'attivazione microgliale, favorisce la maturazione dei precursori degli oligodendrociti (OL) aumentandone le difese antiossidanti. Agonisti PPARg hanno dato risultati incoraggianti in studi clinici su pazienti affetti da SM. Su tali promesse, intendiamo verificare se questi farmaci svolgono effetti protettivi sia controllando l'infiammazione sia promuovendo la mielinizzazione, con meccanismi che coinvolgono i mitocondri. In particolare, ci focalizzeremo su: i) ruolo della proteina mitocondriale UCP2 nella regolazione delle risposte di OL e microglia a stimoli infiammatori o demielinizzanti e possibile modulazione di UCP2 da parte di agonisti PPARg; ii) regolazione dei parametri mitocondriali da parte di agonisti PPARg; iii) capacità dei mitocondri di controllare le onde oscillatorie di Ca<sup>2+</sup>, cruciali nell'organizzazione della mielina, e modulazione da parte di agonisti PPARg.

### **Risultati attesi nel triennio**

Questo progetto ci aiuterà a comprendere il coinvolgimento dei mitocondri nella regolazione delle risposte di oligodendrociti e microglia a stimoli infiammatori e/o demielinizzanti. In particolare approfondiremo le nostre conoscenze sul ruolo della proteina mitocondriale UCP2 come potenziale bersaglio molecolare al fine di intervenire con un approccio farmacologico per mezzo degli agonisti del PPAR $\gamma$  nella cura della SM.

### **Trasferibilità dei risultati**

Gli agonisti del PPAR $\gamma$  sono stati per lungo tempo proposti come agenti terapeutici nel trattamento della SM sebbene i meccanismi d'azione non siano ancora del tutto chiariti. Gli studi sugli agonisti del PPAR $\gamma$  e le funzioni mitocondriali in OL microglia sono proposti per verificare il loro potenziale effetto nel controbilanciare le alterazioni mitocondriali che si osservano nella SM e che sembrano svolgere un ruolo cruciale nella patogenesi della SM. Lo studio sui meccanismi che mediano gli effetti protettivi del PPAR $\gamma$  possono aiutarci a comprendere l'effettivo valore terapeutico di questi agonisti come adiuvanti nel trattamento della SM.

### **$\alpha$ -Sinucleina: un possibile marcatore predittivo e prognostico per la Malattia di Parkinson (PD).**

La PD è una malattia neurodegenerativa con decorso cronico progressivo caratterizzata dalla perdita selettiva di neuroni dopaminergici e dalla presenza di inclusioni proteiche intraneuronali nei corpi di Lewy. La sua patogenesi molecolare è sconosciuta e non esistono test precoci validati per la sua diagnosi per l'esistenza di differenti sottogruppi di soggetti che mostrano una sintomatologia molto simile. La certezza di diagnosi potrebbe consentire una migliore selezione dei pazienti parkinsoniani per la fruizione di nuovi approcci terapeutici come l'impianto dello stimolatore nel *nucleus* subtalamico cerebrale. L' $\alpha$ -sinucleina ( $\alpha$ SN), il maggiore componente dei corpi di Lewy, è implicata nell'eziologia sia del PD di tipo familiare che sporadico. Attualmente non è chiaro il significato dell'interazione tra la sua normale funzione e la sua aggregazione patologica. Questo progetto cercherà di valutarne il suo impiego come biomarcatore per monitorare il rischio di PD e di verificare: i) la possibilità di discriminare tra i casi di PD dai controlli normali; ii) l'associazione tra  $\alpha$ SN plasmatica e i differenti fenotipi clinici di PD; iii) il possibile cambiamento della concentrazione di  $\alpha$ SN durante la progressione della malattia; iv) la possibile correlazione tra alcuni miRNA che regolano i livelli d'espressione dell' $\alpha$ SN nei fluidi biologici; v) la possibile correlazione dei livelli di autofagia e l'espressione dell' $\alpha$ SN in linfociti periferici tra PD e controlli.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- creazione di una banca biologica di campioni da pazienti con PD e differenti sottogruppi clinici di parkinsonismo (MSA, PSP, CBD, ET);
- identificazione di mutazioni note e non in pazienti PD;
- validazione dell' $\alpha$ -sinucleina come possibile marcatore biochimico nel plasma di pazienti PD;
- individuazione della possibile correlazione tra i profili di espressione di microRNA in popolazioni linfocitarie di pazienti con PD;
- definizione di *pattern* diagnostici della PD e *pattern* predittivi dell'evoluzione della malattia derivanti dall'integrazione di dati genetici, biochimici, e clinici;
- miglioramento della diagnosi preclinica e precoce di demenza neurodegenerativa di Parkinson e della sua diagnosi differenziale.

### **Trasferibilità dei risultati**

Nell'ambito delle malattie neurodegenerative il PD è la seconda patologia che affligge l'1% della popolazione al di sopra dei 65 anni. Attualmente, la diagnosi in vita di un paziente, è effettuata sulla base del suo fenotipo clinico con la possibilità di confonderlo con altre forme di parkinsonismo, soprattutto negli stadi precoci di malattia. Vi è dunque l'estrema necessità di individuare un valido marcatore diagnostico. Questo progetto propone un approccio integrato per valutare la validità del ruolo dell' $\alpha$ SN come possibile biomarcatore impiegabile anche in valutazioni di tipo longitudinale tra pazienti e controlli e come marcatore di progressione di malattia con lo scopo di preservare il possibile deterioramento cognitivo nei soggetti PD. Il progetto ha quindi il fine di elaborare uno strumento diagnostico che abbia una sua validità a livello dell'SSN; in questo contesto sia i pazienti che le loro famiglie potrebbero beneficiare direttamente degli outcomes del progetto stesso.

### **Basi molecolari e variabilità clinica nella Malattia di Alzheimer (MA) di tipo familiare**

La ricerca genetica nella MA negli ultimi trent'anni ha contribuito all'individuazione di una serie di mutazioni rare che sono la causa dell'insorgenza di questa malattia nella sua forma genetica. Esse sono identificate su tre geni: la proteina precursore dell'amiloide (APP), la presenilina 1 (PSEN1) e la presenilina 2 (PSEN2). Ad oggi sono state descritte più di 200 mutazioni, ma in molti casi il gene responsabile della malattia rimane sconosciuto. La maggior parte di questa "ereditarietà mancante" potrebbe essere dovuta a varianti rare su differenti geni che grazie alle recenti tecnologie di sequenziamento ora potrebbero essere rilevate. In questo contesto lo scopo del nostro lavoro sarà quello di caratterizzare una coorte di pazienti con MA di tipo familiare (FAD) a livello clinico e genetico mediante uno screening su geni causali della malattia (PSEN1, PSEN2, APP) e su ulteriori geni associati a patologie correlate (MAPT e PGRN). Questa analisi ci permetterà di selezionare due gruppi di pazienti: mutati e non mutati. Nei casi mutati procederemo con lo studio della variabilità clinica intra- e inter-familiare associata allo stessa mutazione investigando il profilo di espressione di microRNA dell'intero genoma e lo stato di metilazione dei promotori di geni potenzialmente coinvolti nella demenza. Famiglie senza mutazione saranno invece selezionate per un'analisi dell'intero esoma attraverso tecniche di sequenziamento di ultima generazione.

### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio ci permetterà di identificare nuovi geni di malattia mediante la scelta di una metodica ad alta capacità come il sequenziamento di ultima generazione (*Next-generation sequencing*) in grado di individuare varianti geniche anche su piccoli pedigree familiari. Inoltre, questo studio permetterà l'individuazione di diversi profili di espressione dei miRNA dell'intero genoma e profili di metilazione di promotori di geni associati alla MA in pazienti mutati che presentano una variabilità fenotipica intra-individuale. Infatti, questa variabilità suggerirebbe l'esistenza di un background genetico (es. fattori di rischio genetici) oltre a fattori epigenetici, in grado di influire sul fenotipo clinico e sulla sua progressione. Una migliore comprensione di questi fattori sarebbe di chiaro valore prognostico. Infine, i risultati acquisiti potrebbero essere traslati a modelli di MA di tipo sporadico, ipotizzando possibili meccanismi patofisiologici comuni.

### **Trasferibilità dei risultati**

L'identificazione di nuovi geni causali e di fattori di modulazione della malattia potrebbero contribuire alla conoscenza delle vie molecolari della MA e all'identificazione di

nuove strategie terapeutiche. Inoltre la caratterizzazione molecolare dei pazienti con MA di tipo genetico permetterà un appropriato *counselling* degli individui affetti e dei loro familiari. Infine le correlazioni genotipo-fenotipo permetteranno di delineare più facilmente i vari fenotipi clinici con implicazioni quindi nella pratica clinica e sull'SSN.

### **Controllo epigenetico della progressione del cancro della mammella: studi clinici e su modelli animali**

Tanto fattori genetici che ambientali possono influenzare gli stadi precoci e tardivi della carcinogenesi: lo stress, in particolare, è in grado di provocare una cascata di eventi con effetti multipli sia a livello centrale che periferico, che possono portare al cancro. Infatti, cambiamenti critici nel genoma cellulare, come il silenziamento di geni oncosoppressori, l'attivazione di oncogeni o difetti nel processo di riparazione del DNA, possono derivare anche da meccanismi epigenetici, suscettibili a stimoli ambientali. Studi epidemiologici condotti sull'uomo indicano che la mancanza di supporto sociale può aumentare la suscettibilità a diversi tipi di malattie croniche. Nonostante ci siano evidenze chiare di un potenziale collegamento fisiologico tra ambiente sociale, risposte neuroendocrine allo stress, espressione genica e fenotipo tumorale, gli specifici meccanismi molecolari in grado di tradurre l'esposizione a un ambiente stressante in un' aumentata suscettibilità tumorale non sono stati ancora sufficientemente chiariti. Modelli preclinici robusti e riproducibili sono necessari al fine di chiarire il ruolo delle interazioni geni-ambiente nel contesto della progressione tumorale.

Obiettivo principale del progetto è quello di elucidare i meccanismi molecolari coinvolti negli effetti dello stress sulla progressione del cancro della mammella, indagando il suo ruolo sul comparto normale e trasformato.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Complessivamente, questo progetto combinerà know-how su modelli animali di stress, biologia dei tumori, neuroendocrinologia, immunologia, oncologia clinica e psicologico-oncologia in un approccio interdisciplinare per lo studio degli effetti dello stress sulla progressione del cancro della mammella. Questo progetto ha la potenzialità di fornire nuovi marcatori molecolari per la prognosi e strategie terapeutiche innovative da tradurre nella pratica clinica per identificare soggetti "a rischio", in quanto altamente suscettibili allo stress. Inoltre, i dati raccolti potrebbero svelare l'utilità di approcci innovativi, già praticati in alcune realtà, quali la consulenza psicologica, che potrebbero essere estesi, in combinazione con le terapie standard, a un maggior numero di pazienti con carcinoma mammario.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I dati ottenuti hanno anche la potenzialità di promuovere interventi terapeutici non solo innovativi, ma anche facilmente disponibili per la gestione del cancro al seno, come gli antidepressivi o farmaci in grado di modulare l'umore, che potrebbero essere utilizzati in combinazione con il sostegno sociale per la gestione del cancro della mammella in pazienti che non hanno alternative terapeutiche attuali, permettendo una rapida traduzione del dato sperimentale in nuovi approcci per l'assistenza clinica.

### **Friuli Occidentale - Validazione di attività innovative in ambito agricolo finalizzate all'inserimento sociale, riabilitativo o lavorativo di persone diversamente abili.**

Si tratta di un Accordo di collaborazione con l'Azienda per i Servizi Sanitari del Friuli occidentale. La ricerca si inserisce all'interno della sperimentazione regionale delle fattorie sociali LR 17/2008, art. 10c 83 promossa, tra le altre, dall'ASS6 n. 6 "Friuli occidentale".

Dalla sperimentazione precedentemente effettuata emerge che le reti delle fattorie sociali rappresentano parte importante del capitale sociale di un distretto sanitario, per molti versi ancora inesplorato. Esse si configurano come infrastrutture relazionali attraverso le quali offrire maggiore opportunità per gli individui diversamente abili coinvolti, favorire tangibili risparmi economici per l'ente pubblico, aumentare i vantaggi per le organizzazioni partecipanti e per tutta la comunità. Soprattutto sembrano rafforzare un senso di responsabilità condivisa e comunitaria rispetto alla presa in carico dei soggetti più deboli. È necessaria a questo punto un'analisi specificamente volta alla valutazione dei legami o connessioni (di diversa natura, incluse quelle relazionali comunicative ecc) attivate dai singoli soggetti coinvolti per la prima volta in fattorie sociali per attività finalizzate (direttamente o indirettamente) all'inserimento sociale, riabilitativo, lavorativo di persone diversamente abili.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Nei primi mesi del progetto verrà adattato uno strumento, precedentemente utilizzato per l'analisi delle reti delle fattorie sociali presenti sul territorio della ASS6, per l'analisi delle reti individuali (t-0) alla quale seguirà il percorso di sperimentazione in fattoria sociale. Dopo 12 mesi avverrà una seconda rilevazione (t-1) per saggiare eventuali modifiche delle reti sociali create da ciascun soggetto, anche alla luce degli interventi progettuali. Gli strumenti tecnici impiegati nella raccolta e nell'analisi dei dati fanno riferimento alla *network analysis*.

È prevista la validazione dell'uso di interventi terapeutici innovativi sviluppati in ambito agricolo. Il Progetto permetterà di acquisire dati scientifici rigorosi riguardo la potenziale efficacia dell'agricoltura sociale, validandone l'uso come uno strumento innovativo all'interno dell'SSN.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tali informazioni potranno essere utilizzate per accreditare alcune tipologie di attività svolte in ambito agricolo come ausilio in soggetti con disabilità fisica e/o mentale.

La partecipazione dell'ISS al progetto favorirà il trasferimento di know-how acquisito dall'ISS in materia di relazione uomo-animale e relazione uomo-ambiente per lo sviluppo e la diffusione di attività innovative, quali l'agricoltura sociale, per l'inserimento sociale, riabilitativo, lavorativo di persone diversamente abili.

### **Ippogrifo - Studio multicentrico per l'applicazione della riabilitazione equestre nella schizofrenia in fase di esordio e nelle forme non cronicizzate**

Tra le patologie psichiatriche, la schizofrenia è al primo posto in termini di frequenza, gravità e costo sociale, essendo caratterizzata da un decorso superiore ai sei mesi (tendenzialmente cronico o recidivante), dalla persistenza di sintomi di alterazione del pensiero, del comportamento e dell'affettività, con una gravità tale da limitare le normali attività della persona. Al momento attuale, l'introduzione di programmi che possano ridurre il carico sociale, particolarmente percorsi innovativi interventi precoci, intensivi e esterni ai luoghi tradizionali della psichiatria è un'esigenza sentita tanto dalla classe medica che dagli utenti e dalle loro famiglie.

In particolare, negli ultimi anni si è notevolmente accresciuto l'interesse verso interventi riabilitativi che prevedono l'utilizzo di soggetti animali finalizzato al trattamento di specifiche patologie. Tra questi, la Riabilitazione Equestre (RE) si pone come un interessante approccio innovativo di supporto alla riabilitazione psichiatrica. Essa, facendo uso del cavallo, mira alla costruzione di una relazione tra animale e paziente che nelle sue componenti emotiva, cognitiva e motoria può creare percorsi specifici di intervento relativi alle diverse aree del disfunzionamento del paziente.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il Progetto Pindaro-Federazione Italiana Sport Equestri (FISE) è allo stato attuale in fase avanzata, con l'inserimento di circa 35-40 pazienti tra i vari Centri di RE della FISE del territorio nazionale aderenti. Già alla luce di una prima valutazione i dati appaiono in linea con quanto registrato nello studio precedente, sia in termini di miglioramento clinico generale che di ricaduta positiva sui costi assistenziali.

Il progetto IPPOGRIFO si propone come un ampliamento del Progetto Pindaro-FISE. Esso sarà della durata di un anno e ha come scopo principale la valutazione dell'efficacia della riabilitazione equestre in pazienti schizofrenici (esordi e psicosi non cronicizzate).

Sono attesi i seguenti risultati:

- riduzione delle giornate di ricovero e costi assistenziali;
- miglioramento delle capacità relazionali;
- riconoscimento delle emozioni;
- miglioramento delle capacità motorie;
- riduzione/controllo degli episodi di aggressività;
- miglioramento degli indicatori metabolici.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto si propone di costituire un modello di intervento integrato da utilizzare in futuro con altre patologie di riferimento. La presenza dei centri FISE ne garantisce la professionalità e l'omogeneità delle metodologie di RE impiegate.

### **Modelli murini di stress pre- e post-natale, complicanze al parto e cure materne: effetti sul comportamento e su modifiche epigenetiche in età adulta**

Si tratta di uno studio nell'ambito del Progetto Poseidon "Stress pre-, peri- e post-natale nella prole umana e non umana: un approccio traslazionale per lo studio dell'impatto epigenetico sulla depressione".

È ampiamente riconosciuto che l'esposizione a eventi avversi in età precoce contribuisce ai processi patofisiologici che si traducono in malattia nel corso della vita. Eventi avversi durante l'infanzia sono stati associati ad una maggiore prevalenza di ansia, disturbi affettivi e dipendenza da sostanze d'abuso nel corso della vita. Studi condotti su roditori forniscono un quadro più dettagliato sull'impatto che il tipo di stress durante specifiche finestre temporali perinatali possono avere sul metiloma. Saranno utilizzate diverse procedure come lo stress prenatale cronico, l'asfissia perinatale, il parto cesareo, alterazioni delle cure materne, ambiente arricchito e svezzamento precoce.

Diversi modelli animali saranno utilizzati in parallelo a studi clinici al fine di stabilire i cambiamenti che possono presentarsi in specifiche regioni cerebrali (topo) o in periferia (clinica) in seguito a manipolazioni durante lo sviluppo e la loro rilevanza per il fenotipo patologico.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Verranno effettuate manipolazioni pre-natali e post-natali in roditori (ratti) al fine di riprodurre una condizione di stress perinatale nell'uomo.

In particolare, nel modello ratto verranno effettuate: i) analisi degli effetti dello stress prenatale sul comportamento madre-prole, vulnerabilità allo stress psicosociale e risposta neuroendocrina allo stress in età adulta mediante fenotipizzazione comportamentale; ii) studio dell'interazione tra comportamento madre-prole e riduzione dei livelli cerebrali di recettori dei glucocorticoidi (GR) nel modificare la vulnerabilità allo stress psico-sociale e la risposta neuroendocrina allo stress in età adulta; iii) Analisi anatomica e temporale (espressione genica e proteica) dei recettori GR e del fattore neurotrofico BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) in seguito all'esposizione a eventi stressanti in età precoce.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Lo studio preclinico sarà volto all'identificazione di alterazioni funzionali in geni implicati nella psicopatologia come risultato dello stress perinatale. Tali indicazioni verranno utilizzate per individuare soggetti a rischio nella popolazione clinica.

### **Stile di vita come fattore di rischio nella progressione del tumore al seno: indagine sui biomarcatori neuroendocrini e molecolari dello stress**

Il carcinoma della mammella è la seconda causa di morte per cancro e la più comune forma di tumore tra le donne. L'insorgenza e la progressione della malattia sono influenzate da fattori genetici e ambientali: tra questi lo stress è in grado di innescare una cascata di eventi che possono portare alla depressione e al cancro. Nonostante vi siano evidenze di un'associazione tra mancanza di sostegno sociale, stress e cancro al seno, i meccanismi di base non sono stati completamente chiariti. Tale studio valuterà fattori psicosociali in interazione con altri elementi predittivi di sviluppo del tumore, tra cui fattori genetici, fattori di rischio comportamentali e ambientali.

Obiettivi: chiarire i meccanismi molecolari ed evidenziare i biomarcatori coinvolti negli effetti dello stress sulla progressione del carcinoma mammario.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto prevede una forte integrazione tra studi preclinici sui modelli murini di carcinoma mammario e studio clinico su pazienti ad alto rischio di recidiva. L'unità ISS coordinerà il progetto e valuterà gli effetti dello stress sui modelli animali di tumore alla mammella e analizzerà anche i livelli salivari di cortisolo e quelli serici di citochine e BDNF nelle pazienti reclutate dall'Istituto Regina Elena (IRE) di Roma.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Secondo il Piano Sanitario Nazionale (PSN), devono essere potenziati quegli interventi mirati a implementare stili di vita sani. La dieta e l'esercizio fisico hanno un ruolo importante nell'eziologia del cancro al seno e lo stress psicologico potrebbe favorire cattive abitudini alimentari o incentivare il fumo. Alterazioni neuroendocrine potrebbero indebolire il sistema immunitario con implicazioni per altre malattie, tra cui cancro e disturbi cardiovascolari. Esiste inoltre una co-morbilità tra le malattie conseguenti allo stress, che potrebbero interagire, amplificandone gli effetti, con conseguenze sulla progressione del tumore o sulle recidive.

### **Studio di fattori ontogenetici alla base dell'invecchiamento: il ruolo dell'obesità materna (DORIAN)**

Progetto finanziato dalla Comunità Europea nell'ambito del 7<sup>th</sup> *Framework Program* il cui obiettivo principale è lo studio dei meccanismi alla base dell'invecchiamento con un particolare riferimento agli effetti dell'obesità materna sui processi metabolici e sul danno al DNA, fattori rilevanti sia nelle fasi dello sviluppo che nell'individuo adulto.

### **Risultati attesi nel triennio**

Questo progetto multidisciplinare permetterà di comprendere meglio i meccanismi alla base dello sviluppo precoce e dell'invecchiamento, portando così a un miglioramento della qualità della vita. Gli studi saranno condotti sia sull'uomo che su modelli animali, esaminando le interazioni tra ambiente/stile di vita, fattori genetici/epigenetici, stress e suscettibilità genere-specifica, al fine di identificare i meccanismi che portano allo sviluppo di disturbi associati all'età, individuando marcatori biologici predittivi per specifiche patologie e per lo sviluppo di strategie terapeutiche (tanto ambientali che farmacologiche).

### **Trasferibilità dei risultati**

Tale progetto promuoverà stili di vita sani, strumenti diagnostici e target farmacologici, aumentando il coinvolgimento dell'industria e riducendo i costi per la società facendo guadagnare "salute" alla popolazione.

## **Analisi dell'efficacia terapeutica della Riabilitazione Equestre e dell'Onoterapia in soggetti con disabilità fisica e mentale**

Accordo quadro siglato dall'ISS con l'IRCCS San Raffaele Pisana, il Centro di Riabilitazione "Villa Buon Respiro" di Viterbo e l'Università Telematica San Raffaele.

È previsto lo svolgimento di attività di ricerca, di indagine, di studio e di divulgazione dei risultati e formazione di personale riabilitatore, finalizzati alla validazione e standardizzazione delle metodologie concernenti le terapie e attività assistenziali attraverso l'impiego integrato degli animali nell'ambito della disabilità fisica e mentale, particolarmente per quanto riguarda le attività di ippoterapia e onoterapia.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati scientifici previsti sono la standardizzazione metodologica e la validazione dell'uso di interventi terapeutici innovativi sviluppati in ambito sanitario mediante l'utilizzo delle attività di riabilitazione equestre e onoterapia. Il progetto permetterà di acquisire dati scientifici rigorosi riguardo la potenziale efficacia di terapie svolte con l'ausilio di animali, validandone l'uso come uno strumento innovativo all'interno dell'SSN.

### **Trasferibilità dei risultati**

Tali informazioni potranno essere utilizzate per accreditare alcune tipologie di terapie assistite con gli animali come ausilio in soggetti con disabilità fisica e mentale.

## **Alterazioni psico-neuro-immunoendocrine in ambienti estremi**

Nel corso degli ultimi cinquant'anni l'ambiente antartico è stato oggetto di esplorazioni sistematiche: lo studio della risposta fisiologica umana in tali condizioni estreme rappresenta un'opportunità per la comprensione dei fenomeni alla base della tolleranza e dell'adattamento ai cambiamenti ambientali, oggi intimamente connessa ai progressi della biomedicina.

L'Antartide rappresenta dunque un laboratorio naturale per lo studio di processi psicofisiologici e sociali. In particolare, l'esposizione a tale contesto ambientale induce cambiamenti omeostatici nei sistemi neuroendocrini che modulano la risposta adattativa dell'organismo che vanno dall'alterazione dell'umore, dei ritmi circadiani, a fenomeni di stress ossidativo, alterazioni nel comportamento alimentare e nel metabolismo, disfunzioni delle gonadi e deficit immunitario.

Nell'ambito del presente progetto si intendono definire, mediante approccio multidisciplinare, i possibili cambiamenti e relativi *biomarker*, in soggetti umani volontari confinati nella stazione antartica di Concordia, con particolare riguardo agli aspetti relativi la

risposta psico-neuro-immunoendocrinologica e sindrome metabolica, che sono sempre più frequenti nelle società occidentali contestualmente all'allungamento della durata della vita e dove hanno notevoli implicazioni socio economiche.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Si valuteranno parametri quali adiponectina, ormoni dello stress e livelli di citochine infiammatorie, grasso addominale, resistenza all'insulina, androgenizzazione, metaboliti degli acidi grassi, cambiamenti morfofunzionali nelle cellule dendritiche e dati psicometrici, prima durante e dopo il periodo di confinamento in Antartide. I dati verranno confrontati con quelli ottenuti da esperimenti di isolamento condotti in contesti differenti (Mars 108 e 520) al fine di valutare anche il ruolo di parametri quali ritmi circadiani, luce solare e temperatura e verificare se periodi protratti di confinamento possano avere un ruolo per se nell'aumento del rischio cardiocircolatorio.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La possibilità di studiare la risposta allo stress in tali contesti ambientali di alto valore adattativo, così come i meccanismi che sottostanno la capacità di adattamento e recupero, sono importanti non solo per la comprensione delle modalità patofisiologiche coinvolte ma anche per la salvaguardia delle persone esposte a condizioni di isolamento e confinamento sulla terra, incluso la popolazione anziana, e per assicurare la riuscita delle future missioni umane in ambienti estremi.

### **Amminoacidi a catena ramificata (ACR) come modulatori della risposta neuroinfiammatoria e fattori di rischio di patologie neurodegenerative**

Numerose evidenze indicano in coinvolgimento delle cellule gliali, quali astrociti e microglia, nell'insorgenza e a progressione di diverse malattie neurodegenerative. In particolare nella Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA, una patologia che colpisce in età adulta caratterizzata dalla perdita dei motoneuroni corticali, bulbari e spinali), è stato ipotizzato che tale contributo si realizzi attraverso il malfunzionamento di meccanismi astrocitari di neuroprotezione e l'alterata attivazione microgliale. Studi epidemiologici hanno evidenziato un elevato rischio di SLA per i calciatori professionisti italiani; tutti i casi riportati si sono rivelati della forma sporadica, suggerendo l'ipotesi del possibile contributo di fattori ambientali in soggetti geneticamente suscettibili. Recenti evidenze scientifiche che mettono in relazione l'abuso di integratori alimentari con i danni sia a carico del tessuto muscolare che di quello nervoso, suggeriscono che l'assunzione di Amminoacidi a Catena Ramificata (ACR) leucina, isoleucina e valina e/o di creatina, presenti negli integratori di largo consumo negli sportivi, potrebbe favorire la manifestazione clinica della SLA.

L'obiettivo del progetto è di analizzare gli effetti di livelli elevati di ACR sulla funzionalità delle cellule microgliali, i macrofagi del sistema nervoso centrale, utilizzando sistemi sperimentali di diversa complessità, e di valutare la ricaduta di tali effetti sulla risposta neuroinfiammatoria.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Dai nostri dati è emerso che cellule microgliali, ottenute da colture gliali miste esposte a livelli elevati di ACR, presentano un profilo funzionale alterato, caratterizzato da minore espressione di geni pro-infiammatori, maggiore attività fagocitica e metabolica, e carenza di alcune delle funzioni neuroprotettive e anti-infiammatorie. Queste osservazioni suggeriscono che l'abuso di ACR possa influire sulla risposta immunitaria innata dell'SNC. Intendiamo proseguire con studi *in vitro* utilizzando sistemi più complessi, come le colture organotipiche ippocampali, in cui le interazioni tra i vari tipi cellulari e la citoarchitettura

dell'ippocampo sono mantenute, e studi *in vivo*, analizzando tessuti cerebrali ottenuti da topi alimentati con dieta arricchita in ACR.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati dello studio contribuiranno a verificare l'ipotesi che gli ACR, comunemente assunti in dosi massicce dagli sportivi, e in particolare dai calciatori come integratori alimentari, possano contribuire ad aumentare il rischio di SLA. La comprensione dei meccanismi con cui gli ACR possono interferire con la neuroinfiammazione potrà avere ricadute che vanno oltre l'ambito della SLA, essendo gli ACR spesso utilizzati per il recupero della massa muscolare in molte condizioni patologiche, ad esempio in pazienti oncologici o in soggetti anziani debilitati.

### **Attività pro-rimielinizzante di farmaci registrati analizzata su progenitori endogeni neurali *in vitro*, modelli animali e sistema nervoso umano**

Lo scopo del progetto è di identificare nuove strategie terapeutiche in grado di stimolare la rimielinizzazione endogena che possano essere rapidamente trasferite a pazienti affetti da malattie demielinizzanti/dismielinizzanti. La parte iniziale del progetto ha riguardato lo screening *in vitro* di una libreria di circa 2.000 composti, già approvati per uso umano, al fine di identificare sostanze che possono promuovere sopravvivenza, proliferazione e migrazione di progenitori degli oligodendrociti murini. Nel corso del 2011 sono stati identificati 15 composti con attività stimolante sulla proliferazione e/o il differenziamento di precursori degli oligodendrociti in diversi sistemi *in vitro*. L'efficacia di questi composti verrà poi valutata in modelli *ex vivo* di mielinizzazione e di demielinizzazione/rimielinizzazione. I farmaci più promettenti verranno sottoposti a una valutazione preliminare di efficacia direttamente sui pazienti, senza dovere attendere i lunghi e costosi test preclinici che costituiscono spesso il collo di bottiglia che ostacola lo sviluppo di nuove cure in queste (e altre) malattie.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Identificare nuovi farmaci in grado di riparare il danno legato alla sclerosi multipla nonché ad altre malattie della mielina.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La strategia proposta in questo progetto consiste nell'identificazione di farmaci già registrati per uso terapeutico che abbiano effetti diversi da quelli per cui sono stati approvati ("riposizionamento" del farmaco), consentendo di aumentarne la sicurezza, risparmiare tempo e costi richiesti per la registrazione e di trasferire immediatamente il risultato alla sperimentazione clinica.

### **Autoanticorpi come biomarcatori sierologici di malattie autoimmuni, tumori e malattie neurodegenerative con componenti immunomediate**

Autoanticorpi specifici per molecole *self* sono presenti nel siero di pazienti con malattie autoimmuni, ma anche nel siero di pazienti con tumori e malattie neurodegenerative con componenti autoimmuni.

Tali autoanticorpi possono avere un ruolo patogenetico interferendo con le funzioni fisiologiche delle molecole bersaglio e possono avere funzione predittiva, prognostica e/o diagnostica.

Scopo di questo progetto è l'identificazione e caratterizzazione di autoantigeni riconosciuti da autoanticorpi per la messa a punto di metodi prognostici e diagnostici e per comprendere meglio i meccanismi patogenetici di tali patologia.

### **Risultati attesi nel triennio**

Identificazione di autoantigeni. Studio del ruolo degli autoanticorpi specifici *in vivo* in modelli murini e *in vitro* su cellule umane. Messa a punto di tecniche prognostiche e diagnostiche.

### **Trasferibilità dei risultati**

Brevetti. Pubblicazioni.

## **Autoanticorpi specifici per l'adenosina trifosfato (*adenosine triphosphate*, ATP) sintasi nella patogenesi della malattia di Alzheimer (MA)**

La genetica della MA non spiega pienamente l'eziopatogenesi della malattia. Pertanto è probabile che fattori ambientali e/o fenomeni epigenetici possano contribuire all'insorgenza della patologia. Attualmente si ritiene che anche il sistema immunitario possa essere coinvolto nella patogenesi della MA (Weiner & Selkoe, 2002; D'Andrea, 2005). Anticorpi anti-neuronali sono stati riscontrati nei sieri di pazienti affetti da MA, ma l'ipotesi del loro coinvolgimento nella patologia è stata scartata poiché presenti anche nel siero di pazienti non affetti (D'Andrea, 2003). Nonostante ciò, la presenza di anticorpi anti-neuronali associata a disfunzioni della barriera emato-encefalica può costituire un fattore importante per la neuropatologia dell'Alzheimer. Recentemente abbiamo identificato IgG dirette alla subunità beta dell'ATP sintasi (anti-ATP sintasi Abs) nel siero di pazienti affetti da Alzheimer (vedi sotto). Ipotizziamo che la presenza dell'anticorpo anti-ATP sintasi, associata a disfunzione della barriera emato-encefalica, possa avere un ruolo nella neuropatologia dell'Alzheimer.

### **Risultati attesi nel triennio**

Le informazioni fornite dal progetto proposto permetterebbero di affrontare alcuni problemi clinici rilevanti, come il possibile valore di Abs anti-ATP sintasi come indicatore prognostico e il potenziale terapeutico di immunomodulazione o il blocco della risposta immunitaria dell'anti-ATP sintasi (es. attraverso il blocco dei peptidi). L'obiettivo principale di questo progetto è traslare i risultati della ricerca di base all'applicazione clinica. I risultati attesi sono volti a chiarire: i) il ruolo dell'anti-ATP sintasi Abs nelle disfunzioni mitocondriali e nell'induzione di apoptosis/autofagia nelle cellule neuronali; ii) il ruolo dell'anti-ATP sintasi Abs nelle disfunzioni comportamentali in un modello animale di Alzheimer; iii) l'associazione/correlazione dell'anti-ATP sintasi Abs del siero e dei polimorfismi genetici di APOE e APP al grado di demenza dei pazienti di Alzheimer.

### **Trasferibilità dei risultati**

Strategie di prevenzione volte allo sviluppo di cure mediche e supporto sociale che vadano incontro alle necessità della popolazione affetta da demenza, e a quelle del personale che presta loro assistenza nel corso della malattia.

## **Basi biologiche dell'auto-controllo e potenziali implicazioni diagnostiche**

Il presente progetto si propone di fornire dati sperimentali e suggerimenti pratici utili a misurare livelli individuali di auto-controllo, utilizzando una metodologia comparativa. A questo proposito saranno impiegati roditori (un *taxon* evolutivamente distante dall'essere umano, ma comunemente utilizzato e validato come modelli in ricerca pre-clinica), e differenti specie di primati non-umani (dai nostri antenati più distanti, quali i lemuri, fino ai nostri parenti più prossimi, cioè gli scimpanzé), per investigare quanto alcuni aspetti dell'auto-controllo siano radicati nella nostra storia evolutiva, e per meglio comprendere il ruolo della cultura e altri aspetti ambientali come influenzanti tali comportamenti nella nostra specie. Per raggiungere questi scopi, è necessario tracciare la possibile storia evolutiva

di comportamenti socialmente indesiderabili nella nostra e nelle altre specie animali. Un prerequisito fondamentale per comprendere le conseguenze dell'impulsività, e le sue differenti dimensioni, sulla vita sociale è identificare criteri universali di misurazione di tale comportamento. Ciò può quindi portare a identificare le necessarie e appropriate misure per prevenire e/o contenere comportamenti socialmente poco desiderabili. Il presente progetto si propone di fornire a psicologi e psichiatri degli strumenti metodologici utili per diagnosticare una mancanza di auto-controllo in bambini in età precoce.

### **Risultati attesi nel triennio**

Ipotizziamo di osservare una correlazione tra competenza sociale individuale e abilità di auto-controllo (inibizione temporale, motoria e sociale, e propensione al rischio). In particolare:

- livelli bassi di inibizione temporale dovrebbero associarsi a reiterazioni di comportamenti sociali, e a diminuita capacità ad aspettare per ottenere una risorsa desiderata;
- alta propensione al rischio dovrebbero portare a livelli elevati di aggressività, e si impulsività in situazioni sociali potenzialmente rischiose. Pertanto, soggetti propensi a comportamenti rischiosi, dovrebbero provocare maggiori conflitti all'interno del gruppo sociale;
- livelli bassi di inibizione motoria dovrebbero associarsi a elevata aggressività, e a un ridotto autocontrollo in eventi di gioco sociale. Quindi, gli individui caratterizzati da ridotta inibizione motoria, dovrebbero trasformare eventi sociali positivi in negativi (es. possono trasformare un gioco di lotta in una lotta vera e propria);
- il grado di inibizione in un contesto sociale dovrebbe essere inversamente proporzionale al grado di impulsività osservato in situazioni di affollamento, e in presenza di conspecifici che possono esercitare un certo grado di controllo (es. madri, individui dominanti), con la possibile conseguenza di un aumento del grado di emarginazione sociale. Quindi, gli individui con valori più bassi del grado di inibizione in contesto sociale, dovrebbe essere quelli più isolati rispetto al gruppo.

### **Trasferibilità dei risultati**

Lo scopo principale del presente progetto, è quello di identificare una serie di test per misurare la capacità di auto-controllo, e utilizzare tali test per identificare precocemente comportamenti sociali indesiderati (es. atti violenti, propensione al rischio, dipendenza da sostanze di abuso, molestie). Tale metodologia rappresenterà uno strumento importante per psicologi e psichiatri per predire tali comportamenti, e/o prevenire la loro messa in atto. Mediante la batteria di test qui proposta nel progetto, le figure professionali citate saranno in grado di implementare uno strumento diagnostico, e delineare differenti profili di personalità, associati a diverse abilità di auto-controllo. Psicologi e psichiatri potrebbero utilizzare i risultati del presente progetto per produrre delle specifiche linee guida, sotto forma di manuale, di facile e pratica consultazione.

### **Basi strutturali e aspetti funzionali della distrobrevina, una proteina del complesso associato alla distrofina, nel sistema nervoso**

Le distrofie muscolari sono malattie complesse che in alcuni casi possono associare disturbi cognitivi e neuropsichiatrici. Diverse forme di distrofia muscolare sono causate da mutazioni in proteine del complesso associato alla distrofina (DPC), espresso nel cervello oltre che nel muscolo. Sebbene i meccanismi molecolari alla base dei deficit cognitivi nei pazienti distrofici siano tuttora poco conosciuti, sono stati fatti considerevoli progressi nell'identificare le proteine e i *pathway* biochimici che possono contribuire a queste

anomalie. In particolare, oltre alla distrofina, nel cervello sono espressi altri componenti del DPC, di cui sono stati identificati nuovi interattori con un possibile ruolo nel sistema nervoso, anche indipendente dal DPC. Il nostro laboratorio ha contribuito in maniera significativa a questi progressi, dimostrando che alcune componenti del DPC, le distrobrevine alfa e beta, sono coinvolte nel trasporto intracellulare e nella trasduzione del segnale (interazioni con la chinesina e con la *Protein kinase A* – PKA, rispettivamente). Abbiamo inoltre descritto l'associazione specifica tra distrobrevina beta e una glicoproteina coinvolta nella neurogenesi, la pancortina, e con iBRAF e BRAF35, proteine HMG con un ruolo nei meccanismi epigenetici che regolano il differenziamento neuronale. Il progetto vuole contribuire a chiarire le interazioni e il ruolo del complesso DPC, e della distrobrevina, nel sistema nervoso in situazioni fisiologiche e patologiche.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I dati ottenuti nel nostro laboratorio sui meccanismi di interazione della distrobrevina con la chinesina e con la PKA suggeriscono che la fosforilazione abbia un ruolo nella regolazione del trasporto intracellulare mediato dalla chinesina di componenti del DPC e di proteine ad essi associate. In questo contesto, la distrobrevina sembra comportarsi come un'AKAP (*A Kinase Anchoring Protein*) pur non possedendo interamente le caratteristiche per essere classificata come tale. Un primo obiettivo del nostro progetto è identificare i siti specifici che regolano l'interazione tra distrobrevina e chinesina, e stabilire se la distrobrevina sia effettivamente un'AKAP, se cioè funzioni come una piattaforma molecolare per chinasi e fosfatasi, allo scopo di contribuire ad una comprensione migliore dei meccanismi di trasduzione del segnale.

Il secondo obiettivo è quello di caratterizzare l'interazione della beta-distrobrevina con iBRAF e BRAF35 dal punto di vista funzionale, per chiarire se la distrobrevina abbia effettivamente un ruolo nella neurogenesi e nello sviluppo cerebrale. A questo scopo stiamo anche analizzando l'effetto dell'ipossia sull'espressione della distrobrevina beta, e la possibilità di una sua regolazione tramite microRNA specifici. Il nostro progetto si propone di studiare l'eventuale regolazione del gene della distrobrevina beta da parte dei microRNA, e di valutare l'impatto dell'ipossia su tale regolazione durante il differenziamento neuronale.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questo studio consiste essenzialmente in un progetto di ricerca di base, per cui le sue applicazioni non saranno immediatamente trasferibili alla pratica clinica. I risultati ottenuti potrebbero però contribuire in maniera rilevante a chiarire il ruolo del DPC, e in particolare della distrobrevina, nel trasporto intracellulare, nella trasduzione del segnale e nel differenziamento neuronale. I nostri dati, che saranno inviati per la pubblicazione a riviste internazionali, aiuteranno a chiarire i meccanismi patogenetici alla base dei disordini muscolari e neurologici nei pazienti distrofici, e potrebbero aprire nuove prospettive per lo sviluppo di strategie terapeutiche appropriate. Considerando che le malattie neuromuscolari sono spesso devastanti e generalmente non trattabili, la ricerca di nuovi approcci terapeutici a queste patologie è da considerare particolarmente importante per la salute pubblica.

### **Biodiversità ed evoluzione di funghi meristemati delle rocce in ambienti polari: possibili bioindicatori dei cambiamenti climatici e dell'impatto antropogenico**

L'aumento della temperatura media del nostro pianeta ha causato la riduzione, la scomparsa o lo spostamento verso i poli, o più alte latitudini, di alcuni habitat causando una conseguente estinzione di ecosistemi marginali e delle specie a essi associate. I funghi costituiscono uno dei regni più vasti e diversificati, sono distribuiti in tutto il globo,

includono sia specie cosmopolite che adattate ad ambienti tanto ostili da essere preclusi ad altre forme di vita; pertanto essi possono permettere di monitorare praticamente qualunque tipo di ambiente. Ciò nonostante la conoscenza della micodiversità nelle regioni polari, che sono tra le più minacciate dai cambiamenti climatici, rimane frammentaria.

Inoltre la diffusa contaminazione da POP in Antartide comporta la necessità di indagini volte ad una migliore comprensione della loro distribuzione quali-quantitativa nel biota. Scopo del progetto è quindi anche la realizzazione di un modello ecosistemico *ex situ* semplificato che possa essere utile per lo studio di altri contaminanti ambientali sia in ambienti estremi che in altri ecosistemi europei e non.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Si propone di verificare eventuali cambiamenti in atto nel limite biogeografico di questi organismi nel deserto antartico; a tal fine viene proposto di campionare anche in località già studiate, per disporre di dati di possibile valore bioclimatico.

Ci si propone pertanto di approfondire tali studi al fine di chiarire i processi evolutivi, l'ecologia e le strategie adattative che hanno consentito a questi organismi di vivere al limite del loro potenziale biologico; conoscere la loro biodiversità attuale e il loro range di tolleranza fornirebbe utili strumenti per monitorare i cambiamenti climatici in aree marginali e prevedere la soglia oltre la quale essi rischierebbero di essere sostituiti da comunità fungine cosmopolite a rapida crescita. Inoltre, si intende identificare e quantificare degli inquinanti nei campioni biologici e allestire di una catena alimentare sperimentale *ex situ* per la valutazione del bioaccumulo e della biomagnificazione dei contaminanti.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Rilevante è il ruolo che specie, che vivono al limite estremo di tolleranza, possono svolgere quali indicatori degli effetti dell'impatto antropogenico su ecosistemi naturali. Ci si propone di definire la vulnerabilità specie-specifica e la rilevanza del bioaccumulo e della biomagnificazione nelle catene alimentari polari.

### **Biotecnologie per l'esplorazione umana dello spazio (CRUSOE-CRUising in Space with Out-of-body Experiences)**

Il progetto CRUSOE svilupperà una nuova biotecnologia volta a migliorare le condizioni e il benessere dell'equipaggio durante le esplorazioni umane nello spazio. In particolare servirà a: ricreare l'ambiente del pianeta da esplorare sulla terra per definire le modalità di addestramento più efficaci; accelerare l'adattamento degli astronauti alle nuove condizioni gravitazionali durante la missione; simulare l'ambiente sociale terrestre e creare un ambiente amichevole nel periodo di viaggio.

Il progetto intende svolgersi mediante l'integrazione di tecnologie di robotica, *computer graphics*, sistemi di telecomunicazioni, sensori bioispirati con le acquisizioni di neuroscienze per la valutazione delle interazioni del controllo motorio e aspetti cognitivi e neurologici in contesto di isolamento quale l'esplorazione spaziale.

Il progetto prevede una collaborazione con la Scuola Sant'Anna di Pisa, la Fondazione Santa Lucia di Roma, la Facoltà di Psicologia e di Chirurgia dell'Università Sapienza di Roma, il Dipartimento di Scienze Fisiologiche dell'Università di Pisa, il Dipartimento di Neuroscienze, dell'Università di Parma, il Dipartimento di Ingegneria Elettronica dell'Università di Tor Vergata di Roma. L'UO ISS si concentrerà principalmente su aspetti relativi alla comunicazione sociale, empatia e valutazione di parametri neurochimici in modelli animali di riferimento e in soggetti umani.

### **Risultati attesi nel triennio**

Approfondimento delle conoscenze sugli effetti correlati all'esposizione prolungata all'ambiente spaziale da un punto vista neurocognitivo e neurocomportamentale e sviluppo di contromisure approfondendo delle conoscenze di base delle capacità di adattamento e dei fenomeni plastici a livello del sistema nervoso centrale che le sottendono.

Possibilità di sfruttare e ampliare le recenti acquisizioni in ambito neuroscientifico e tecnologico relativamente all'internalizzazione della gravità negli schemi neurali, la presenza dei neuroni mirror per l'interpretazione delle azioni, empatia e comportamento pro-sociale e integrazioni bayesiane di sensazioni multisensoriali all'interno del cervello.

### **Trasferibilità dei risultati**

La partecipazione dell'ISS è strumentale all'apporto di competenze specifiche nell'ambito del progetto per lo studio del comportamento sociale e lo stress psicosociale in modelli animali e nell'uomo. Le competenze delle istituzioni altre partecipanti al progetto e la sua qualità altamente interdisciplinare finalizzata alla verifica di fattibilità per la realizzazione di ambienti immersivi multisensoriali hanno evidenti potenziali ricadute per l'innovazione e il trasferimento tecnologico in ambito socio-sanitario.

## **Biomarcatori nelle patologie cronic-degenerative**

Il termine di biomarcatore comprende una serie di molecole in grado di rivelare l'insorgenza di una malattia e/o la sua progressione. L'assenza di segni clinici nella fase iniziale di malattia, l'eterogeneità fenotipica, la variabilità interindividuale della risposta al trattamento farmacologico o della durata di remissione, rappresentano alcune delle criticità nella gestione clinica di un ampio spettro di patologie cronic-degenerative (dalla malattie autoimmuni ai tumori) che giustificano il forte impegno della ricerca nella identificazione di nuovi marcatori che consentano un costante monitoraggio dello stato di malattia. I progetti relativi al triennio 2011-2014 avranno come obiettivo principale quello di studiare i meccanismi patogenetici coinvolti nelle alterazioni dell'omeostasi linfocitaria in patologie cronic-degenerative quali malattie autoimmuni e disordini linfoproliferativi. In particolare il nostro lavoro sarà indirizzato verso l'individuazione di biomarcatori correlati all'apoptosi e/o all'autofagia di possibile utilizzo nella pratica clinica. In questo contesto, verrà approfondito lo studio sulle differenze di genere nell'insorgenza e nel decorso delle suddette patologie. A tal fine metodiche di biologia cellulare e molecolare verranno applicate in studi *ex vivo* e *in vitro* su cellule del sistema immune isolate da pazienti e donatori sani e *in vivo* su modelli murini di malattia.

### **Risultati attesi nel triennio**

Gli studi effettuati potranno consentire di individuare nuovi marcatori cellulari e/o sierici da utilizzare a scopo diagnostico, prognostico e/o predittivo di risposta alla terapia nelle patologie autoimmuni e nei disordini linfoproliferativi. In particolare gli studi *ex vivo* e *in vitro*, effettuati su popolazioni di pazienti studiate longitudinalmente, potrebbero consentire di: i) evidenziare eventuali correlazioni tra fattori coinvolti nell'alterata omeostasi linfocitaria e parametri clinici di malattia così da valutare il loro potenziale utilizzo come biomarcatori di malattia; ii) individuare nuovi meccanismi patogenetici correlati al *gender* coinvolti nelle patologie suddette; iii) validare, come biomarcatori di malattia, alcune molecole "candidate", precedentemente selezionate. Gli studi effettuati *in vivo* su modelli murini di malattia consentiranno di definire l'effettivo ruolo di molecole, individuate negli studi *ex vivo* e *in vitro*, nello sviluppo e nella progressione di malattia e di confermare il loro utilizzo come biomarcatori di malattia. Infine i risultati ottenuti consentiranno di valutare il possibile impiego di alcune molecole selezionate come possibili bersagli terapeutici.

### **Trasferibilità dei risultati**

Una diagnosi precoce e un monitoraggio efficace sono fondamentali nella gestione clinica delle patologie cronico-degenerative considerata la loro natura progressiva, cronica e multisistemica. La scarsità di biomarcatori da utilizzare nella pratica clinica in grado di indicare l'attività di malattia e la risposta alla terapia sono ad oggi i maggiori problemi nella gestione delle suddette patologie. L'insieme dei risultati ottenuti consentiranno una migliore comprensione dei meccanismi patogenetici delle malattie oggetto di studio, l'identificazione di nuovi biomarcatori di malattia da utilizzare nella pratica clinica, lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche basate sulle differenze di genere. In conclusione, le informazioni generate da questi studi potrebbero avere un forte impatto clinico in termini di monitoraggio della malattia e trattamenti terapeutici precoci e individualizzati così da migliorare la qualità di vita dei pazienti.

### **Caratterizzazione funzionale della proteina MLC1 implicata nella leucoencefalopatia megalencefalica con cisti subcorticali**

Mutazioni nel gene codificante per MLC1 sono state associate ad una rara forma ereditaria di leucodistrofia spongiforme ad esordio infantile, denominata leucoencefalopatia megalencefalica con cisti subcorticali. Questa malattia è caratterizzata da alterazioni della mielina ed estesa neurodegenerazione con un progressivo deterioramento delle funzioni motorie, atassia, spasticità, crisi epilettiche e declino delle facoltà mentali. Ad oggi, il ruolo di MLC1 non è noto e non esiste una cura per la leucoencefalopatia megalencefalica. La strategia che verrà adottata per studiare la funzione di MLC1 consiste in un approccio combinato, in modelli sperimentali *in vitro*, che si avvale di tecniche di biologia molecolare, biochimica, elettrofisiologia e proteomica. Attraverso questo approccio, cercheremo di comprendere la specifica funzione di MLC1 e di studiarne le interazioni con altre proteine cellulari. Una volta chiarito il ruolo fisiologico di MLC1 e identificato un saggio per valutarne l'attività funzionale, cercheremo di capire in che modo mutazioni nel gene MLC1, riscontrabili in pazienti affetti da leucoencefalopatia megalencefalica, influenzino la funzione della proteina da esso codificata.

### **Risultati attesi nel triennio**

Questo progetto ha come obiettivo ultimo l'acquisizione di conoscenze sulla funzione della proteina MLC1, espressa nel sistema nervoso centrale, e sul suo coinvolgimento nelle alterazioni neuropatologiche e funzionali associate con la leucoencefalopatia megalencefalica. I risultati attesi sono:

- caratterizzazione biochimica e funzionale della proteina MLC1;
- identificazione di proteine che interagiscono con MLC1;
- analisi biochimica e funzionale della proteina MLC1 mutata.

### **Trasferibilità dei risultati**

Una migliore comprensione della funzione della proteina MLC1 nella fisiologia cerebrale e del suo ruolo nella patogenesi della leucoencefalopatia megalencefalica potrebbe fornire informazioni importanti per lo sviluppo di una terapia più efficace per i bambini affetti da MLC. In questa prospettiva, l'identificazione di molecole che interagiscono con la proteina MLC1 potrebbe rivelare nuovi biomarcatori e bersagli terapeutici per questa rara malattia genetica.

### **Controllo del ciclo cellulare**

Verrà investigata la natura dell'ostacolo, identificato dal gruppo operante all'interno del Dipartimento, che le cellule terminalmente differenziate (TD) incontrano a replicare in modo completo il proprio DNA, anche quando spinte al reingresso nel ciclo cellulare.

Verranno intrapresi almeno tre indirizzi. Mediante *Comparative Genomic Hybridization* (CGH), saranno identificati gli specifici *loci* genomici la cui replicazione è assente o incompleta in cellule TD. La natura dell'ostacolo alla replicazione verrà inoltre investigata riattivando la sintesi di DNA in nuclei di miotubi TD mediante estratti replicativi di uova di *Xenopus laevis*. Infine sarà utilizzato un sistema di *lineage-tracing* per valutare l'efficacia di una serie di interventi potenzialmente capaci di determinare proliferazione prolungata di cellule derivate dallo sdifferenziamento di miotubi TD. Tali interventi comprenderanno l'esposizione a composti chimici ritenuti in grado di indurre sdifferenziamento, l'espressione di fattori di trascrizione capaci di riprogrammare la cellula e di geni inibitori dell'apoptosi e interferenza a RNA per geni regolatori del differenziamento muscolare.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Pubblicazioni scientifiche.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'obiettivo a lungo termine di questa linea di ricerca è l'utilizzazione terapeutica, in medicina rigenerativa, delle conoscenze acquisite. Gli studi prevedibili per il prossimo triennio sono però di base e la loro trasferibilità avrà verosimilmente tempi medi o lunghi.

### **Contromisure nutrizionali e psicologiche nello stress indotto da isolamento e confinamento di lungo termine**

Il presente progetto si propone di studiare, mediante un approccio collaborativo e multidisciplinare, i meccanismi molecolari, cellulari e psico-neuro-fisiologici alla base della risposta all'esposizione ad ambienti estremi quali, in questo caso, l'isolamento protratto per 500 giorni nell'ambito dell'esperimento condotto in Russia sotto l'egida dell'Agenzia Spaziale Europea (ESA) per la preparazione a un viaggio su Marte.

La convivenza protratta in ambienti confinati induce stress cronico e può determinare cambiamenti omeostatici neuroendocrini a carico dell'ipotalamo e di organi periferici (surrene e tessuto adiposo). Tale adattamento è in grado di scatenare un'inflammatione cronica di basso grado, alterazioni metaboliche e danno cardiovascolare tipici delle patologie più frequenti in corso di invecchiamento nei paesi industrializzati.

Scopo dello studio è verificare se tale fenomeno si realizzi nell'esperimento di isolamento condotto in Russia per la preparazione al volo su Marte (MARS 500) e in quale misura sia reversibile, per derivarne indicazioni utili a combattere le tipiche malattie croniche invalidanti dell'età geriatrica.

Il progetto si svolgerà in collaborazione con l'Istituto Nazionale Riposo e Cura Anziani (INRCA) di Roma, l'Università di Firenze (ASA campus, Dipartimento di Fisiopatologia Clinica), l'Università di Genova (Dipartimento di Biologia) e l'Università di Milano (Istituto di Endocrinologia).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Programma di attività e metodi e risultati scientifici previsti:

- analisi di campioni di sangue, urine e saliva raccolti a intervalli regolari;
- utilizzo di metodiche avanzate basate su tecniche immunochimiche, citochimiche, enzimatiche e di auto-fluorescenza;
- somministrazione di questionari di valutazione di stress e qualità di vita;

- analisi statistica delle modificazioni dei vari parametri e delle correlazione fra queste ultime.

Per quanto riguarda i meccanismi di adattamento e risposta allo stress, parte del progetto verterà sull'indagine delle interazioni funzionali tra comportamento e SNC, immunitario ed endocrino, con particolare riguardo al ruolo svolto da fattori di crescita, quali NGF e BDNF, nei meccanismi di plasticità neuronale e risposta comportamentale

#### **Trasferibilità dei risultati**

Indicazioni utili a prevenire e combattere le tipiche malattie croniche invalidanti dell'età geriatrica, fra le quali tipicamente: diabete mellito, patologie degenerative cardiovascolari, atrofia muscolare, osteoporosi, patologie neurodegenerative.

### **Danno neurogliale nella retinopatia diabetica: modelli sperimentali per lo studio dei meccanismi patogenetici**

La retinopatia diabetica (RD) è una delle più temibili complicanze del diabete e rappresenta la principale causa di cecità in età lavorativa. Studi recenti hanno dimostrato in corso di RD, oltre alle lesioni vascolari, la presenza di alterazioni strutturali e funzionali del comparto neurogliale, come gliosi o apoptosi neuronale, pur in assenza di danno evidente dei vasi retinici. Tra i meccanismi patogenetici delle complicanze diabetiche che possono avere impatto su tale comparto, assumono particolare rilievo il meccanismo della glicazione non enzimatica e l'alterazione di citochine e mediatori ad essa correlati, tra cui sistema Renina Angiotensina (RAS), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) e *Toll-like receptor*.

Questa attività di ricerca si propone di identificare meccanismi patogenetici operanti nel danno diabetico neurogliale retinico, mediante modelli sperimentali *ex vivo* e *in vivo*, allo scopo di esaminare le interazioni tra milieu diabetico e comparto neurogliale, nella sua interezza e sulle singole tipologie cellulari.

In dettaglio, in collaborazione intra- e interdipartimentale, sono in corso studi in modelli sperimentali di espianti retinici di ratto o esposti *in vitro* al milieu diabetico oppure provenienti da ratti Sprague-Dawley resi sperimentalmente diabetici, in cui viene esaminato il ruolo della glicazione non enzimatica e di RAS nelle alterazioni del *signalling* intracellulare correlato all'attivazione di mediatori attivi sul comparto neuro gliale.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Risultati pubblicati dal nostro gruppo di lavoro evidenziano precoce attivazione gliale e induzione di segnali di sopravvivenza neuronale e attivazione di molecole legate al *signalling* di RAS, in espianti retinici di ratto esposti ad alto glucosio.

Questi risultati dimostrano che l'utilizzo di modelli sperimentali per lo studio della disfunzione neurogliale retinica può consentire di esaminare modalità e tempi di insorgenza di tali alterazioni, permettendo di chiarire se meccanismi patogenetici coinvolti nel danno vascolare possano essere responsabili direttamente anche del danno neurogliale.

Gli studi in corso consentiranno di valutare il ruolo delle diverse alterazioni indotte dal diabete, sia in termini metabolici che di mediatori, sui singoli tipi cellulari retinici e sul tessuto in toto, considerando, così, le reciproche interazioni vascolari, neuronali e gliali.

Lo studio dei mediatori si concentra su RAS, in considerazione dell'uso molto frequente di farmaci modulatori di tale sistema nei pazienti diabetici, e sul VEGF, vista l'applicazione di farmaci anti-VEGF per via intraoculare nei casi di danno maculare retinico, piuttosto frequente nella popolazione diabetica. In conclusione, i risultati di questa linea di ricerca potrebbero:

- contribuire alla comprensione dei meccanismi che sono alla base della retinopatia diabetica e del ruolo dell'eccesso di glucosio in tali eventi;
- indicare potenziali interventi basati sulla manipolazione di queste vie.

### **Trasferibilità dei risultati**

La conoscenza dei meccanismi responsabili delle complicanze del diabete risulta di particolare rilevanza socio-sanitaria in base all'osservazione del notevole incremento del numero dei soggetti diabetici attuale e previsto. Si ipotizzano, infatti, 300 milioni di malati nel 2025 con il conseguente impatto su incidenza e prevalenza delle sue invalidanti complicanze croniche. Al momento non sono disponibili trattamenti specifici, tanto che finora l'unico intervento che ha dimostrato di modificarne sviluppo e progressione in maniera statisticamente significativa è il controllo metabolico. Gli studi dedicati alla comprensione dei meccanismi patogenetici delle complicanze del diabete hanno, quindi, lo scopo di aprire nuove strade per la prevenzione e il trattamento di complicanze, che costituiscono una delle principali cause di mortalità e morbilità nei paesi industrializzati.

### **Definizione di *biomarker* per lo stato di benessere e di adattamento comportamentale in soggetti umani durante la permanenza nella base di Concordia**

Il presente progetto si propone di studiare i meccanismi molecolari, cellulari e psico-neuro-fisiologici alla base della risposta all'esposizione ad ambiente antartico. La proposta ha carattere di interdisciplinarietà: essa coniuga aspetti di misurazione di parametri psicologici con la valutazione dei livelli salivari ed ematici quali neurotrofine (NGF e BDNF), citochine, ormoni sessuali, cortisolo, peptidi coinvolti nel *coping* allo stress sociale e metabolico quali ossitocina leptina e melatonina e la determinazione dell'espressione genica. Mediante un approccio metodologico che ha caratteristiche di non invasività, economicità e alta praticabilità si intende fornire indicazioni importanti per la definizione di *biomarker* dello stato di salute, anche comportamentale, in funzione di una lettura integrata dei dati ottenuti ai vari livelli di analisi. La proposta prevede delle attività da svolgere prima, durante e dopo il soggiorno in Antartide e consiste nel prelievo di campioni di sangue, saliva e urina e nella somministrazione di test cognitivi e questionari per la valutazione dello stato di ansia e stress in soggetti volontari confinati nella stazione di Concordia.

### **Risultati attesi nel triennio**

La possibilità di indagare la risposta allo stress in tale contesto di alta valenza adattativa così come lo studio dei meccanismi che sottostanno alle capacità di adattamento e recupero, rivestono particolare interesse non solo per l'acquisizione di conoscenze di base dei meccanismi fisiopatologici coinvolti, ma rappresentano un prerequisito fondamentale per la possibilità di sviluppare contromisure adeguate che garantiscano la salvaguardia delle popolazioni esposte e il successo delle future missioni umane in ambienti estremi.

### **Trasferibilità dei risultati**

I dati, peraltro assai limitati, che emergono dalle ricerche condotte in ambienti estremi, evidenziano chiare alterazioni in alcuni parametri fisiologici a seguito dell'esposizione al confinamento e stress individuale e psicosociale, con caduta della performance, disturbi neurocomportamentali, inadeguatezza nelle capacità cognitive, problemi nel ritmo circadiano e sintomi depressivi più in generale, sono stati identificati come problemi prioritari, rivestendo particolare importanza anche per implicazioni socio-sanitarie di lungo termine.

### **Determinanti microbiologici dei tumori umani**

Saranno ricercati microrganismi, virus o batteri, eziologicamente o patogeneticamente associati a tumori umani di cui non sia attualmente riconosciuta un'eziopatogenesi microbiologica. In una collaborazione che coinvolge gruppi appartenenti all'ISS ed esterni ad esso, sarà intrapreso un approccio metagenomico mediante *deep sequencing*. Saranno

analizzati tumori insorti in pazienti portatori di trapianti d'organo, immunosoppressi farmacologicamente, e perciò maggiormente suscettibili ad infezioni e ad eventuali evoluzioni neoplastiche delle stesse. Saranno sequenziati tanto il genoma quanto il trascrittoma dei suddetti tumori. Utilizzando tecniche bioinformatiche avanzate, le sequenze umane saranno escluse e la ricerca si concentrerà sulle sequenze esogene, potenzialmente appartenenti ad agenti infettivi oncogeni.

Gli eventuali microrganismi così identificati saranno sottoposti ad appropriate validazioni epidemiologiche e biologiche per verificarne la rilevanza eziopatogenetica.

**Risultati attesi nel triennio**

Conoscenze scientifiche sull'eziopatogenesi dei tumori; pubblicazioni scientifiche.

**Trasferibilità dei risultati**

L'identificazione di microrganismi patogeni potrà produrre importanti conoscenze utilizzabili a fini diagnostici, prognostici, preventivi e terapeutici che saranno trasferite all'SSN.

**ECS-EMOTION: *resilience*.**

**Il sistema endocannabinoide nelle regolazioni emozionali:  
identificazione di fattori di protezione in fasi precoci dello sviluppo**

Evidenze cliniche e sperimentali dimostrano come l'ambiente di crescita influenzi non solo lo sviluppo delle emozioni ma anche la risposta alla somministrazione e al consumo di sostanze psicoattive. In particolare, si ritiene che un ambiente di sviluppo sfavorevole (es. abuso o abbandono infantile, appartenenza a gruppi sociali particolarmente svantaggiati e ad alta incidenza di problemi legati alle tossicodipendenze) possa favorire l'insorgenza di disturbi della sfera emotiva e aumentare il rischio di sviluppare patologie legate alle droghe d'abuso. Studi epidemiologiche dimostrano anche come ambienti ricchi di stimoli possano limitare l'insorgenza di patologie legate all'abuso di sostanze e ridurre la gravità dei sintomi. Oltre ai fattori ambientali, anche fattori individuali (tra questi, il sistema endocannabinoide, ECS, coinvolto nella risposta alla cannabis e ai suoi derivati) contribuiscono alla regolazione delle emozioni. Sulla base di queste premesse teoriche analizzeremo, tramite l'utilizzo di modelli sperimentali animali, il possibile ruolo protettivo esercitato da un ambiente di crescita stimolante sulla risposta ad agenti cannabinici e sulla conseguente regolazione delle risposte emozionali individuali. Il progetto ha lo scopo di dimostrare quanto la somministrazione di agenti cannabinici interferisca con il "normale" sviluppo individuale, e di evidenziare il ruolo protettivo di condizioni ambientali favorevoli.

**Risultati attesi nel triennio**

In linea con osservazioni condotte in esperimenti precedenti, prevediamo di osservare variazioni a breve e a lungo termine nel fenotipo endocrino e neurocomportamentale – dei topi di laboratorio – in funzione delle diverse manipolazioni sperimentali in fasi sensibili dello sviluppo, inclusa l'esposizione ad agenti cannabinici. Inoltre, l'esposizione ad ambienti ritenuti a valenza positiva in fase precoce è suscettibile di modulare gli effetti acuti e contrastare le conseguenze a lungo termine dell'esposizione a tali sostanze. Ipotizziamo che questi studi possano avere un ampio rilievo a livello della comunità scientifica in quanto suscettibili di apportare nuove conoscenze nell'ambito dei meccanismi biologici alla base della regolazione delle emozioni; gli esperimenti proposti permetteranno anche di analizzare come l'ambiente di crescita individuale sia in grado di modulare tali meccanismi. Inoltre, i risultati ottenuti potranno avere importanti ricadute a livello sociale in quanto potranno dimostrare come un ambiente precoce positivo e stimolante sia in grado di ridurre la vulnerabilità alle conseguenze avverse delle sostanze d'abuso anche in un organismo

“semplice” come il topo. In particolare, la possibilità di descrivere le determinanti biologiche dell’interazione tra sostanze psicoattive e ambiente, in un’ottica di prevenzione e promozione della salute, può avere implicazioni rilevanti in ambito di politiche giovanili.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le conoscenze precliniche apportate da questo progetto possiedono un potenziale valore traslazionale in grado di informare la ricerca clinica in ambito di terapia, diagnosi e prevenzione. In particolare, la dimostrazione che un ambiente precoce favorevole, durante fasi critiche dello sviluppo (come gravidanza, infanzia e adolescenza), si associ all’esibizione di risposte emozionali positive può consentire lo sviluppo di approcci di intervento basati su un monitoraggio accurato delle prime fasi dell’esistenza; inoltre, l’acquisizione di maggiori conoscenze sui meccanismi e processi neurochimici e neuroormonali coinvolti è suscettibile di promuovere lo sviluppo di bersagli diagnostici innovativi per l’identificazione di popolazioni di soggetti particolarmente sensibili alle regolazioni dell’ECS. Il raggiungimento degli obiettivi della ricerca può permettere lo sviluppo di approcci integrati di prevenzione e cura basati su strumenti psicodiagnostici, pedagogici e farmacologici.

#### **Esosomi come marker diagnostico nelle patologie prioniche e neurodegenerative**

Gli esosomi corrispondono ai corpi multivescicolari contenuti negli endosomi e rilasciati dalle cellule nei fluidi biologici. Il loro contenuto, che include anche microRNA, è prezioso per gli approcci diagnostici in quanto riflette lo stato cellulare. Gli esosomi sono già utilizzati come biomarker nella diagnosi di diversi tipi di tumori ed è stato recentemente dimostrato sia *in vivo*, che *in vitro* come trasportino anche la proteina prionica cellulare.

La proteina prionica patologica associata con le patologie prioniche è stata caratterizzata e isolata dagli esosomi rilasciati da diverse colture cellulari.

In collaborazione con il FARM dell’ISS è stata avviata una linea di ricerca per lo studio degli esosomi come strumento di diagnosi per le patologie prioniche.

Lo studio, appena cominciato con una serie di promettenti esperimenti preliminari, ha già fornito risultati importanti circa la presenza e lo stato della proteina prionica cellulare nel plasma. Lo stato di aggregazione sembra infatti diverso dalla proteina prionica cellulare presente nel tessuto nervoso.

In aggiunta, durante il 2010, è stato introdotto nel Reparto lo *Scrapie Cell Assay* (SCA), ad oggi l’unico *assay* cellulare disponibile per la quantificazione dei prioni murini. Lo SCA non solo rappresenta un’alternativa etica agli *assay* biologici, ma rappresenta anche una *platform* per la quantificazione dei prioni umani non appena cellule suscettibili saranno disponibili.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi dal prossimo sviluppo del progetto sono i seguenti:

- Validazione dei risultati preliminari ottenuti circa la presenza e lo stato di aggregazione della proteina prionica plasmatica associata agli esosomi. Ottimizzazione tecnica.
- Analisi della proteina prionica esosomale nel plasma di animali infetti e confronto con animali sani.
- Implementazione di un *assay* ad alto rendimento basato su un approccio esosomale già brevettato dal gruppo del FARM per la diagnostica tumorale.
- Verifica *in blind* di eventuali differenze per una validazione diagnostica appropriata e analisi di plasmidi umani di pazienti affetti da patologie prioniche.

- Analisi del contenuto proteico, nucleotidico e lipidico degli esosomi derivati da liquidi biologici e colture cellulari infette. Eventuale identificazioni di nuovi potenziali *marker* associati con la patologia.
- Analisi del contenuto esosomale plasmatico associato ad altre patologie neurodegenerative come DA e SLA.
- *Subcloning* delle linee cellulari di neuroblastoma per le ricerca di cloni suscettibili a prioni umani.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Dai risultati attesi si otterrà una chiarificazione circa la presenza e lo stato della proteina prionica nel plasma.

Diverse pubblicazioni hanno dimostrato che la quantificazione della proteina prionica nel sangue è difficoltosa e controversa e ad oggi non è stato ancora validata una metodologia adeguata per l'identificazione precoce di queste patologie.

I nostri risultati preliminari indicano che le controversie circa la diagnostica prionica potrebbero essere dovuta ad un grado di aggregazione della proteina prionica inaspettato nel plasma. Questi dati avrebbero una trasferibilità immediata. Potrebbero, infatti, dare una spiegazione definita alla difficoltà di quantificazione dei prioni plasmatici e quindi indirizzare verso soluzioni diagnostiche di successo.

Lo sviluppo di colture cellulari suscettibili a prioni umani potrebbe inoltre fornire uno strumento prezioso per la diagnosi e per approcci terapeutici.

#### **Fattori nutrizionali nei disturbi dello spettro autistico e nella sindrome di Rett: valutazione preclinica degli effetti di una supplementazione con colina durante fasi precoci dello sviluppo postnatale**

La colina, un'ammina quaternaria satura, è un nutriente essenziale necessario per l'integrità strutturale e il metabolismo lipidico delle membrane cellulari; inoltre costituisce la principale fonte alimentare di gruppi metilici e rappresenta il precursore di uno dei maggiori neurotrasmettitori cerebrali, l'acetilcolina. La colina ha un ruolo particolarmente rilevante durante lo sviluppo pre- e post-natale e variazioni nei suoi livelli di biodisponibilità in queste fasi hanno un impatto sullo sviluppo cerebrale. In roditori di laboratorio la supplementazione con colina durante lo sviluppo aumenta la funzionalità delle sinapsi colinergiche, ha un effetto protettivo sui processi neurodegenerativi e migliora le prestazioni in diversi test comportamentali di tipo cognitivo e non cognitivo. Inoltre, di particolare rilevanza ai fini del progetto, la supplementazione con colina durante lo sviluppo aumenta l'espressione di diversi fattori di crescita quali BDNF, NGF e *Insulin-like Growth Factor-1*. Scopo del progetto sarà valutare gli effetti di una supplementazione perinatale di colina in due modelli murini di disturbi del neurosviluppo. I fenotipi comportamentali di entrambi i modelli sperimentali sono stati estesamente studiati nel nostro laboratorio e tale conoscenza sarà utile per la selezione di indicatori comportamentali su cui valutare l'effetto del trattamento.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Scopo del progetto sarà valutare gli effetti di una supplementazione perinatale di colina in un modello murino di sindrome di Rett e in un modello murino di disturbi dello spettro autistico. I fenotipi comportamentali di entrambi i modelli sperimentali sono stati estesamente studiati nel nostro laboratorio e tale conoscenza sarà utile per la selezione di indicatori comportamentali su cui valutare l'effetto del trattamento.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Per Rett e disturbi dello spettro autistico (due disturbi genetici del neurosviluppo con elevati carichi familiari e economici) non esistono attualmente trattamenti mirati. Sebbene

gli studi proposti di certo non suggeriscono un'immediata ricaduta terapeutica, i risultati ottenuti potrebbero fornire parte delle basi scientifiche per i futuri approcci nutrizionale per questi disturbi del neurosviluppo. La supplementazione con colina può, infatti, rappresentare una supplementazione nutrizionale di elevato valore traslazionale.

### **GAMBLING – Fattori psicobiologici alla base di comportamenti di ricerca del rischio, disturbi degli impulsi e gioco d'azzardo patologico**

L'obiettivo è quello di accrescere la comprensione del ruolo di fattori psicobiologici nello sviluppo di comportamenti di ricerca del rischio, legati a disturbi nel controllo degli impulsi e al gioco d'azzardo patologico. Verranno analizzati i meccanismi neurobiologici coinvolti nel comportamento di *gambling* in modelli sperimentali animali, mediante procedure validate di comportamento operante.

Primo studio: ruolo di alterazioni precoci durante la fase sensibile dello sviluppo ontogenetico. Applicheremo una manipolazione neonatale in grado di indurre una riduzione della disponibilità di serotonina cerebrale in una fase precoce dello sviluppo, equiparabile alla prima infanzia. La successiva caratterizzazione comportamentale e neurochimica, nella prole divenuta adolescente permetterà di verificare la comparsa di sintomi della patologia.

Secondo studio: differenze individuali. I soggetti verranno sottoposti a un paradigma comportamentale che permette di quantificare la propensione al *gambling*. In questo modo isoleremo due sottopopolazioni (*gambler vs non gambler*) che verranno successivamente caratterizzate da un punto di vista neurobiologico. Verrà quindi valutata la capacità modulatoria di alcuni dei farmaci (indirizzati verso il sistema oppioide o serotoninergico) più utilizzati, nella attuale pratica clinica, per il trattamento del gioco d'azzardo patologico. Si valuteranno inoltre eventuali effetti neurobiologici prodotti dal trattamento farmacologico in specifiche aree cerebrali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Abbiamo recentemente evidenziato che:

- un'alterazione precoce, quale la riduzione della disponibilità di serotonina cerebrale durante una fase sensibile dello sviluppo, dà luogo ad alterazioni del fenotipo neurocomportamentale nell'individuo divenuto adulto, riferibili a stati d'ansia e a stati depressivi;
- alterazioni a carico delle funzioni cerebrali serotoninergiche e dopaminergiche (ottenute mediante una riduzione del triptofano nella dieta) determinano una compromissione nella capacità di *decision-making*, un aumento della propensione al rischio (*gambling*) e una dissociazione tra questi due processi comportamentali.

Per quanto riguarda il primo studio, possiamo quindi ipotizzare che la riduzione della disponibilità di serotonina cerebrale in fase precoce dello sviluppo possa determinare un disturbo nel controllo degli impulsi e una predisposizione nei confronti della patologia oggetto di studio. Inoltre, l'esperimento proposto permetterà di analizzare come l'ambiente di crescita individuale (in particolare il rapporto madre-prole), sia in grado di modulare tale predisposizione.

Per quanto riguarda il secondo studio, prevediamo di isolare una sottopopolazione di soggetti predisposti al comportamento di *gambling* e di mettere in luce, grazie alle tecniche di risonanza magnetica e alle indagini neurochimiche e neurobiologiche, quali meccanismi cerebrali sostengono queste differenze individuali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Comprendere il ruolo dei fattori predisponenti e dei meccanismi neurochimici che sostengono questo tipo di comportamenti è fondamentale per la prevenzione e il trattamento

della dipendenza da gioco d'azzardo. Un contributo fondamentale in tal senso può essere fornito dalla disponibilità di modelli preclinici di disturbo nel controllo degli impulsi e comportamenti devianti tipo *gambling*.

Ipotizziamo che questi studi possano avere un ampio rilievo a livello della comunità scientifica in quanto suscettibili di apportare nuove conoscenze nell'ambito dei meccanismi neurobiologici di base. Inoltre, i risultati ottenuti potranno avere importanti ricadute a livello sociale, in quanto potranno contribuire a chiarire il ruolo di vari fattori biologici e ambientali nella vulnerabilità alla patologia. In particolare, la possibilità di descrivere le determinanti psicobiologiche riveste una notevole importanza in un'ottica di prevenzione e promozione della salute, soprattutto tra i giovani.

### **Italian Advanced Translational Research Infrastructure (IATRIS) neuroscienze: un'infrastruttura dedicata alla ricerca traslazionale nel campo delle malattie neurologiche**

La traduzione dei risultati della ricerca di base in nuovi approcci terapeutici rappresenta la sfida più importante che le scienze biomediche si trovano ad affrontare. Nel campo della neurologia, nonostante i risultati entusiasmanti ottenuti nella ricerca di base, i progressi raggiunti nella terapia delle malattie nervose e mentali sono stati estremamente lenti e un numero incredibilmente basso di nuovi farmaci è stato introdotto nella clinica negli ultimi decenni. Questa osservazione apparentemente paradossale è stata oggetto di una diffusa preoccupazione nell'ambiente biomedico negli ultimi anni. Tra i fattori ritenuti responsabili della scarsa traducibilità nella clinica dei risultati della ricerca, c'è la metodologia utilizzata nella conduzione degli studi preclinici, considerata non sempre in grado di predire l'efficacia di un farmaco. In particolare, si auspica che le procedure *in vitro* e *in vivo* che sono attualmente applicate nell'esame preclinico dei farmaci siano condotte più scrupolosamente, in modo che permettano di predire con maggiore affidabilità la risposta ai farmaci nei pazienti. Questo progetto è finalizzato a:

- creare un network tra i neuroscienziati italiani che si occupano degli studi preclinici *in vitro* e *in vivo*, per discutere possibili difetti nelle procedure e trovare le soluzioni opportune;
- elaborare un protocollo innovativo per la conduzione degli studi preclinici, in grado di garantire una maggiore efficacia nella selezione dei farmaci.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Saranno oggetto di revisione critica sia gli studi *in vitro*, sia gli studi *in vivo*. Negli studi *in vitro*, sarà posta particolare attenzione all'identificazione di sistemi cellulari in grado rappresentare modelli più vicini alla condizione patologica contro la quale il farmaco in via di sperimentazione è diretto. Sarà preso in considerazione l'uso di colture primarie e di colture organotipiche. Si cercherà di identificare nuovi *end-point* dei passaggi chiave nella patogenesi della malattia. Saranno analizzate strategie innovative per studiare il profilo dell'espressione genica indotta dai differenti farmaci. Riguardo agli studi *in vivo*, sono stati messi in luce diversi punti su cui si dovrebbe procedere ad una riconsiderazione critica, come la necessità di effettuare studi in cieco multicentrici, di esplicitare i criteri di inclusione o di esclusione, di effettuare procedure di randomizzazione, di disegnare studi sperimentali più accurate, con analisi statistiche più precise. Verrà posta attenzione al fenomeno del *publication bias* e alle conseguenze della mancata disseminazione nella comunità scientifica dei risultati negativi. Gli studi *in vivo* dovrebbero avvantaggiarsi dell'uso di procedure diagnostiche all'avanguardia, come l'*imaging* molecolare, per garantire un migliore follow-

up degli animali. Infine, laddove disponibili, il monitoraggio di *biomarker* della malattia rappresenterebbe un significativo miglioramento.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le malattie neurologiche rappresentano un'emergenza della sanità pubblica, per il considerevole peso che tali condizioni hanno dal punto di vista sociale ed economico sulla società. La ricerca di base nel campo delle neuroscienze ha progredito straordinariamente negli ultimi decenni; purtroppo un parallelo avanzamento non è stato ottenuto nel campo della clinica. Il progetto qui descritto potrebbe contribuire a colmare la distanza tra la ricerca di base e quella clinica nel campo delle neuroscienze, contribuendo a fornire una metodologia più efficace nel predire l'efficacia di un farmaco, riducendo il numero dei *trial* clinici destinati al fallimento e liberando in tal modo risorse preziose per la ricerca e per la salute pubblica.

#### **Identificazione di bersagli molecolari coinvolti nei meccanismi di *signalling* associati ad eccitotossicità e a stress ossidativo nelle malattie cronico-degenerative dell'SNC**

L'esposizione prolungata dei neuroni agli amminoacidi eccitatori (EAA), dovuto ad aumentato rilascio e/o una ridotta rimozione extracellulare, induce eccitotossicità e morte cellulare. Numerosi studi identificano nelle specie reattive dell'azoto (*Reactive Nitrogen Species*, RNS) e dell'ossigeno (ROS), generate da una sostenuta stimolazione dei recettori per gli EAA, uno dei fattori in grado di innescare fenomeni degenerativi. Il coinvolgimento di ROS e di RNS nell'insorgenza dei fenomeni neurodegenerativi è stato dimostrato sia nelle sindromi neuropatologiche acute (ischemia, trauma, ipossia) che croniche, come la MA, di Huntington, il PD e la SLA. Nei neuroni la simultanea produzione del radicale  $O_2^{\bullet-}$  e del radicale  $\bullet NO$  comporta la formazione di perossinitrito (PN), un potente ossidante in grado di nitrare residui in tirosina (NO<sub>2</sub>Y) presenti nelle proteine. In particolare, le NO<sub>2</sub>Y sono considerate marcatori del danno ossidativo e sono riscontrabili nelle lesioni tissutali delle principali patologie neurodegenerative. Le NO<sub>2</sub>Y possono interferire nella corretta trasduzione dei segnali tirosina-dipendenti e, soprattutto intervenire nei processi di amplificazione o di spegnimento del segnale redox. L'identificazione di bersagli molecolari ossidati nelle vie di *signalling* indotte da eccitotossicità e stress ossidativo potrebbe essere di supporto per una conoscenza più dettagliata dei meccanismi che sottendono al danno neuronale.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Questo progetto intende portare un contributo alla comprensione del ruolo fisiopatologico dello stress ossidativo nei meccanismi di *signalling* indotti da eccitotossicità nel sistema nervoso centrale. L'identificazione di bersagli molecolari selettivamente modificati sarà particolarmente rilevante per stabilire quali distretti cellulari e tissutali sono più vulnerabili al danno eccitotossico e/o ossidativo. Per i nostri studi *in vivo* saranno utilizzate preparazioni di sinaptosomi ottenute da ippocampo, striato, corteccia di topi SOD1-G93A (modello transgenico per la SLA), topi R6/2 (modello transgenico per la malattia di Huntington). Per gli studi *in vitro* saranno preparate colture primarie di neuroni embrionali di ippocampo e neuroni postnatali di cervelletto di ratto. Si analizzeranno la formazione di NO<sub>2</sub>Y, la formazione di gruppi carbonilici, l'attività della NADPH ossidasi, le attività di specifiche fosfotirosina fosfatasi e tirosin chinasi della famiglia di src coinvolte nella funzionalità recettoriale glutammatergica. Si valuterà se tali modifiche possano intervenire nella regolazione delle interazioni tra proteine associate ai recettori per gli EAA. Saranno identificati eventuali cambiamenti nelle interazioni dei complessi proteici (SNARE-

complex) essenziali nel processo di docking e fusione delle vescicole alla membrana sinaptica.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il danno ossidativo è un meccanismo patogenetico comune a molte malattie neurodegenerative acute (ischemia, trauma, ipossia) e croniche, come la malattia di Alzheimer, di Huntington, il morbo di Parkinson e la SLA. I dati ottenuti dall'analisi delle vie di *signalling* selettivamente modificate e correlabili al danno ossidativo ed eccitotossico e l'identificazione di bersagli molecolari coinvolti in tali processi, è di primaria importanza nello sviluppo di strategie e/o interventi farmacologici mirati alla prevenzione o al ritardo dei processi degenerativi coinvolti nelle patologie del sistema nervoso centrale.

I risultati ottenuti saranno resi noti alla comunità scientifica attraverso i consueti canali (congressi e pubblicazioni internazionali) e anche attraverso incontri annuali di progress report.

#### **Identificazione di biomarcatori e di meccanismi di *signalling* dipendenti da stress ossidativo nelle patologie su base infiammatoria**

Una elevata produzione di ROS e di RNS e un aumento di stress ossidativo (*Oxidative Stress*, OS) sono coinvolti nella eziologia, cronicizzazione ed evoluzione di un crescente numero di patologie infiammatorie e tumorali. Obiettivo del progetto è studiare e caratterizzare i ROS, i *pathway* intracellulari coinvolti, il danno a componenti cellulari (biomarcatori noti e innovativi) con particolare riferimento a:

- ruolo di ROS e OS nell'induzione del danno vascolare nelle patologie degenerative su base infiammatoria (Lupus eritematoso e sindrome di Kawasaki)
- meccanismi di tossicità con cui i gas monossido di carbonio e solfuro di idrogeno modulano i livelli di ROS, OS, stato redox e *signalling* nell'eritrocita umano
- meccanismi di induzione di ROS e OS in sistemi modello da parte degli inquinanti ambientali nanoparticelle (diametro <100nm), composti noti per la loro capacità di indurre stati infiammatori cronici, patologie polmonari e cardiovascolari e tumori nell'uomo
- ruolo di ROS e OS nella ipersensibilità alle radiazioni ionizzanti di fibroblasti di pazienti con patologie correlate con il danno da riparazione del DNA (sindrome di Cockayne, *Xeroderma pigmentosum*)
- ruolo di ROS nei meccanismi con cui alcuni farmaci inibiscono la crescita di popolazioni replicanti e non replicanti di *Mycobacterium tuberculosis* presenti durante la tubercolosi (TB) latente e attiva

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- identificazione dei meccanismi con cui ROS e OS partecipano al danno tissutale nelle patologie riportate sopra e costruzione di una "radicalomica" dei tessuti esposti a OS;
- identificazione di biomarcatori innovativi di danno tissutale indotto da ROS e OS nelle patologie riportate sopra;
- ruolo degli antiossidanti (endogeni e della dieta) e dell'efficacia delle terapie cliniche nel contrastare il danno ossidativo nelle patologie riportate sopra.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Grazie a questi studi, effettuati in collaborazione con i Dipartimenti FARM, AMPP, MIPI dell'ISS e con gli Ospedali Bambino Gesù e Policlinico Umberto I di Roma, i risultati della ricerca potranno essere trasferiti a livello clinico.

## Identificazione di nuovi target molecolari nei tumori femminili mediante tecniche di *imaging* molecolare e genomica funzionale

La caratterizzazione mediante spettroscopia risonanza magnetica (*Magnetic Resonance Spectroscopy*, MRS) in diversi tipi di cancro ha recentemente portato alla proposta di nuovi biomarcatori di progressione tumorale e di risposta al trattamento, promovendo l'attivazione di prove cliniche pilota sull'utilizzo di approcci diagnostici non-invasivi basati su rivelazione e monitoraggio di composti contenenti colina. Mediante MRS è stato evidenziato che la progressione tumorale è accompagnata da un aumento della concentrazione totale di diversi metaboliti contenenti colina (tCho), dovuto soprattutto ad un accumulo di fosfocolina (PCho). Studi condotti su estratti cellulari e tissutali hanno mostrato che l'incremento della tCho è dovuto principalmente a un aumento della PCho intracellulare, metabolita intermedio della sintesi e degradazione della fosfatidilcolina (PC). È stato di recente dimostrato che la fosfolipasi C specifica per fosfatidilcolina (PC-plc), enzima responsabile della idrolisi di PC in PCho e diacilglicerolo è fortemente attivata, insieme alla colina chinasi (ChoK), in cellule di tumore ovarico (Iorio *et al.*, 2005; Spadaro *et al.*, 2008) e mammario (Glunde *et al.*, 2004; Glunde *et al.*, 2008).

Questo progetto si propone la valutazione preclinica e clinica del ruolo diagnostico/prognostico del profilo spettrali della colina totale (tCho) nel carcinoma ovarico e mammario, in relazione a profili di espressione genica e a parametri clinico-biologici.

### **Risultati attesi nel triennio**

Si attende di valutare del ruolo dell'enzima PC-plc e ChoK come possibile target di terapie mirate contro il carcinoma mammario e il carcinoma ovarico.

In particolare, si aspetta di:

- caratterizzare il profilo metabolico mediante MRS di cellule di carcinoma ovarico e mammario esposte a farmaci anti *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* (HER2);
- caratterizzare gli effetti indotti da inibitori specifici di enzimi del ciclo della PC, come tali o in combinazione con altri farmaci (es. Trastuzumab o inibitori di tirosin chinasi), in cellule di carcinoma mammario e ovarico umano, sulle vie di trasduzione che mediano segnali di proliferazione e sopravvivenza cellulari e controllano la capacità metastatica (MAPK/ERK, Akt, PI3K, PTEN), in relazione alla stimolazione del recettore HER2 nella sua associazione con altri membri della famiglia *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR);
- caratterizzare la risposta *in vivo* a questi trattamenti terapeutici, in modelli preclinici di xenotrapianti di cellule di carcinoma mammario e ovarico (SKOV3), in topi immunodeficienti;
- valutare l'espressione di HER2 in tessuti prelevati da xenotrapianti dopo trattamento con D609 come tale e in combinazione con farmaci anti-HER2;
- caratterizzare il profilo metabolico di cellule staminali tumorali di carcinoma ovarico e mammario.

### **Trasferibilità dei risultati**

Le ricerche proposte rappresenteranno la base sperimentale per individuare, mediante tecniche di *imaging* funzionale, nuovi biomarcatori molecolari quali livello intracellulare di PCho, espressione di PC-plc e over-espressione di HER2, per potenziare gli attuali approcci di diagnostica oncologica mediante MRS e valutare il ruolo di questi parametri biologico-funzionali come possibili *fingerprint* di progressione tumorale ed *end-point* farmacologici di risposta a terapie mirate.

### **Identificazione di parametri MR per la diagnosi e il monitoraggio della risposta a trattamenti convenzionali e innovativi in modelli tumorali *in vivo* e *in vitro***

La possibilità di caratterizzare *in vivo*, in modo non invasivo, alterazioni associate a processi di trasformazione neoplastica, progressione tumorale e risposta alla terapia, rappresenta un obiettivo avanzato alla ricerca oncologica.

La nostra ricerca intende in particolare valutare la possibilità di correlare il *grading* di malignità di tumori e differenti oncotipi ad alterazioni specifiche di parametri MRS e *Magnetic Resonance Imaging* (MRI), di modelli sperimentali e identificare gli effetti metabolici e morfologici indotti da farmaci convenzionali e innovativi. Tuttora studi MRI e MRS su modelli tumorali, volti ad evidenziare i parametri di risonanza che meglio possono monitorare le risposte a trattamenti mirati restano di fondamentale importanza.

L'esperienza consolidata, ci permetterà di seguire differenti trattamenti, sia nei modelli già noti di tumori cerebrali sia in ulteriori patologie tumorali.

Sono in sviluppo studi su:

- Il recettore CXCR4 per chemochina CXCL12 come marcatore biologico e molecolare di risposta clinica e target terapeutico in modelli di tumori cerebrali.
- Analisi metaboliche mediante risonanza magnetica nei gliomi con mutazione IDH1.
- Identificazione di parametri MRI degli effetti precoci in risposta a trattamenti nel modello di carcinoma corticosurrenalico in topi immunodeficienti.
- Studi di MRI per applicazioni di nanoparticelle con guscio proteico per diagnosi e terapia nel melanoma.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Ci si propone di valutare quanto l'applicazione delle tecniche di risonanza nei modelli sopra citati siano in grado di monitorare la diagnosi, prognosi e la risposta ai trattamenti.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La possibile applicazione clinica per la diagnosi e monitoraggio del trattamento con tecniche non invasive quali la MR.

### **Identificazione e misurazione di parametri biochimici come potenziali indicatori precoci di rischio d'insorgenza di demenza**

Numerosi studi evidenziano che fattori vascolari (inclusa l'ipertensione), infiammazione, stress ossidativo e fattori genetici (come il polimorfismo dell'APOE) siano associati con il rischio di sviluppare demenza in età avanzata. Diverse forme di demenza, quali la MA e MCI, sono state associate ad uno status di stress ossidativo, ossia ad una condizione nella quale l'aumento di radicali dell'ossigeno non è controbilanciato dalle difese antiossidanti. A causa della composizione prevalentemente lipidica, il contenuto relativamente basso in specie antiossidanti e la presenza di metalli (che catalizzano la formazione di radicali liberi), il cervello è un bersaglio privilegiato del danno radicalico.

Nonostante i numerosi studi effettuati nell'ultimo decennio, è ancora dibattuto su quale sia l'indicatore d'elezione da utilizzare negli studi clinici, in quanto i marcatori ad oggi studiati si sono rivelati non sufficientemente sensibili, specifici o di facile misura nelle matrici biologiche di agevole accesso quali sangue e urine. Pertanto, obiettivo primario della ricerca clinica è l'identificazione di indicatori precoci in grado di individuare soggetti asintomatici o con disturbi cognitivi moderati che sono a rischio di declino cognitivo o demenza. Lo scopo della ricerca sarà di misurare una serie di indicatori biochimici in campioni di plasma di soggetti per i quali sia formulata una classificazione di "capacità cognitive normali", MCI o demenza.

### **Risultati attesi nel triennio**

Verranno analizzati una serie di indicatori biologici nel plasma dei soggetti arruolati. In particolare valuteremo i livelli plasmatici di: i) interleuchina 1alfa e 1beta; ii) due citochine proposte come indici biologici dei processi infiammatori associati all'insorgenza della malattia di Alzheimer; iii) la capacità antiossidante totale (CAT), un indice della capacità individuale di contrastare un evento ossidativo che è ridotta nei soggetti con MA (Minghetti *et al. J Neuroinflam* 2006;3:4); iv) acido urico (AU), il principale componente anti-ossidante nel sangue umano, paradossalmente associato a ipertensione e malattie cardiovascolari (Lippi *et al. Clin Chim Acta* 2008;392:1-7).

Saranno quindi valutate le possibili associazioni della serie di indicatori biologici analizzati con dati clinici ed epidemiologici dei soggetti al fine di verificare il potere diagnostico e prognostico dei suddetti indicatori sulla progressione del declino cognitivo e la conversione in demenza accertata.

### **Trasferibilità dei risultati**

Il presente progetto di ricerca si propone di individuare in una logica di sanità pubblica indici di rischio predittivi di insorgenza di demenza che potrebbero essere utili sia in una prospettiva di prevenzione primaria che secondaria. In particolare, l'identificazione di una serie di marcatori biochimici tali da identificare sottogruppi a più alto rischio di sviluppare demenze corticali potrebbe consentire l'inizio precoce di interventi mirati a prevenire il deterioramento età-correlato dello stato cognitivo.

## **Identificazione precoce delle alterazioni cognitive correlate con la schizofrenia in bambini con la sindrome da delezione del cromosoma 22q11.2**

La sindrome da delezione del cromosoma 22q11.2 (22qDS) è causata dalla delezione emizigote a livello del *locus* q11.2 del cromosoma 22. I bambini con 22qDS hanno anomalie fisiche, deficit intellettivi, e sono a rischio di sviluppare la schizofrenia: la metà degli adolescenti colpiti dalla 22qDS segnala esperienze psicotiche transitorie e fino al 32% dei giovani adulti presenta una diagnosi di schizofrenia. Pertanto, la 22qDS è considerata uno dei fattori di rischio per la schizofrenia e rappresenta un modello ideale per esplorare tutte le problematiche legate alla diagnosi precoce e di intervento per anomalie cognitive legate alla schizofrenia. Il gene COMT è situato all'interno della regione deleta 22q11.2 e viene indicato come un gene di suscettibilità per la schizofrenia. Non è ancora chiaro come l'espressione ridotta di COMT possa provocare e/o modulare le anomalie cognitive e i sintomi schizofrenici correlati a questa sindrome. In questo progetto combineremo studi clinici con quelli su topi geneticamente modificati e analizzeremo, attraverso studi di *linkage* e di associazione, le sequenze genetiche di COMT per rivelare variazioni di sequenza rilevanti per lo sviluppo di sintomi cognitivi/schizofrenia-correlati in pazienti con 22qDS e/o schizofrenia. Inoltre, controlleremo l'estensione della delezione 22q11.2 con l'obiettivo finale di utilizzare COMT, i suoi polimorfismi o altri *loci* genetici individuati in questo progetto come biomarcatori anche in fasi prodromiche.

### **Risultati attesi nel triennio**

I principali risultati attesi di questo progetto sono:

- identificazione di biomarcatori COMT-dipendenti attraverso la caratterizzazione neuro-comportamentale e neuro-anatomica di topi COMT;
- individuazione di biomarcatori precoci per l'identificazione dei bambini ad alto rischio di sviluppare schizofrenia o disabilità cognitive.

### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto di ricerca affronterà due aspetti critici rilevanti per l'SSN:

- identificazione precoce dei bambini/adolescenti a rischio di sviluppare la schizofrenia ed eventuali biomarcatori genetici con cui progettare interventi precoci;
- validazione di un modello animale di schizofrenia su cui effettuare studi preclinici di terapie/ interventi comportamentali.

### **Imaging farmacologico a risonanza magnetica (phMRI) e studi di comportamento in modelli sperimentali di depressione/ADHD: effetti del trattamento**

Unità operativa nell'ambito del progetto era-net priomedchild: validazione di tecniche non invasive di *imaging* a risonanza magnetica (MRI) dei sistemi serotoninergico e dopaminergico e del fenomeno della neurogenesi in età adulta al fine di accrescere la comprensione dei meccanismi neurobiologici alla base dei disturbi psichiatrici nella popolazione pediatrica. Il neurotrasmettitore dopamina (DA) è implicato in patologie quali il Disturbo da Deficit Attentivo con Iperattività (*Attention Deficit Hyperactivity Disorder*, ADHD), psicosi e abuso di droghe; il neurotrasmettitore serotonina (5-HT) è invece coinvolto in vari disturbi neuropsichiatrici tra cui depressione, ansia e disturbi nel controllo degli impulsi. Queste patologie non sono esclusive di pazienti adulti o anziani ma si presentano anche nella popolazione pediatrica. Alterazioni della DA e della 5-HT vengono generalmente visualizzate ricorrendo alla tomografia ad emissione di positroni (*Positron Emission Tomography*, PET) e alla tomografia ad emissione di singolo fotone (*Single Photon Emission Computerized Tomography*, SPECT). Tuttavia, queste tecniche non sono appropriate in età pediatrica a causa dell'uso di radiazioni ionizzanti. Per questo motivo, mentre nei pazienti adulti si è potuta ottenere una valutazione diretta delle anomalie nella funzionalità dei sistemi della DA e della 5-HT, i tentativi di dimostrare analoghe anomalie nei pazienti pediatrici sono fortemente limitati dalla necessità di ricorrere a delle misure indirette. Studi recenti suggeriscono che la funzionalità dei sistemi della DA e della 5-HT possa essere valutata in modo non invasivo usando tecniche di *imaging* farmacologico a risonanza magnetica (phMRI). L'phMRI differisce dall'*imaging* funzionale a risonanza magnetica (fMRI) poiché i sistemi neuronali non sono attivati da compiti di tipo motorio o cognitivo bensì farmacologicamente. Tuttavia, queste tecniche non sono state ancora sottoposte a una completa validazione. Scopo di questo progetto è la valutazione di tali tecniche in modelli animali di depressione e di ADHD.

#### **Risultati attesi nel triennio**

L'obiettivo di questo progetto è la validazione, in modelli animali di depressione e ADHD, dell'*imaging* farmacologico a risonanza magnetica (phMRI) come tecnica non invasiva per lo studio delle alterazioni dei sistemi serotoninergico e dopaminergico e degli effetti dei farmaci utilizzati per il trattamento di questi disturbi.

La prima parte del progetto consiste: i) nella preparazione dei modelli preclinici di depressione e ADHD (rispettivamente il modello CSI e il modello LENTI-DAT); ii) nella loro caratterizzazione sia a livello comportamentale sia mediante phMRI e iii) nella valutazione degli effetti dei farmaci attualmente utilizzati per trattare questi disturbi (rispettivamente fluoxetina e metilfenidato). Il LENTI-DAT è un modello innovativo che sfrutta dei vettori lentivirali per aumentare o sopprimere *in vivo* l'espressione del gene che codifica per il trasportatore della dopamina (DAT).

Si prevede la costruzione dei vettori lentivirali, la loro inoculazione nel ratto in aree cerebrali. Poi, si valuterà quali sintomi neuropsichiatrici siano riproducibili misurando: iperattività, impulsività, compromissione dell'attenzione, ansia, sintomi depressivi.

La seconda parte del progetto prevede una analoga caratterizzazione degli effetti a lungo termine (in età adulta) di un trattamento subcronico (ricevuto in adolescenza) con farmaci utilizzabili per il trattamento di depressione e ADHD (rispettivamente fluoxetina e metilfenidato) nei modelli animali suddetti.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questo progetto fornirà degli avanzamenti diagnostici rilevanti per l'SSN. Si stima infatti che i disturbi psichiatrici pediatrici che necessitano di un trattamento farmacologico interessino tra il 7% e il 10% della popolazione pediatrica. I quattro disturbi psichiatrici più comuni nell'infanzia sono l'ansia, la depressione, il disturbo oppositivo-provocatorio e l'ADHD. In tutti questi disturbi la DA e la serotonina (5-HT) hanno un ruolo cruciale. Per questo motivo, ai fini della determinazione di alterazioni a carico dei sistemi dopaminergico e serotoninergico, lo sviluppo di tecniche non invasive che non comportino l'esposizione a radiazioni ionizzanti è di fondamentale importanza e aprirà un nuovo orizzonte nella ricerca preclinica e clinica in ambito pediatrico. Infine, questo progetto contribuirà a proteggere la salute mentale di bambini e adolescenti accrescendo le conoscenze sui meccanismi neurobiologici alla base dei disturbi neuropsichiatrici in età pediatrica.

#### **Implementazione di una rete nazionale di biobanche regionali per la conservazione protratta del materiale residuo dello screening neonatale**

In Italia dopo l'esecuzione dei test di screening neonatale il materiale biologico residuo è generalmente rappresentato da uno-due spot di sangue per neonato. La conservazione protratta di tale materiale consente di: i) effettuare test di approfondimento biochimico per la conferma diagnostica delle patologie oggetto di screening, ii) effettuare test analitici in risposta a richieste specifiche di carattere medico-legale, iii) utilizzare il materiale residuo per il miglioramento dei test di screening già esistenti e per la messa a punto di nuove strategie analitiche finalizzate allo screening, iv) realizzare studi finalizzati alla ricerca di nuovi marcatori di patologia.

La progettualità che si intende realizzare prevede la costituzione di una Rete Nazionale di Biobanche Neonatali Regionali rappresentate dai singoli Centri di Screening, che in molti casi già attuano la conservazione protratta del materiale residuo in assenza di regole definite e di omogeneità operativa. L'ISS rappresenterà la struttura centrale di coordinamento della Rete rendendosi disponibile, laddove necessario, a conservare il materiale biologico (in forma anonima) proveniente da quei Centri che risulteranno non idonei alla conservazione protratta del materiale residuo dello screening neonatale, o per quei Centri che opteranno per una centralizzazione volontaria. Il progetto verrà realizzato in collaborazione con l'Unità di Bioetica di questo Istituto.

#### **Risultati attesi nel triennio**

La progettualità sopra esposta prevede di ottenere, nei primi tre anni di attività, i seguenti risultati:

- definizione di appositi protocolli operativi, modalità e procedure da seguire per la conservazione protratta dei materiali residui dello screening;
- identificazione dei requisiti organizzativi e gestionali minimi necessari al fine di garantire la tutela della privacy per il neonato e per la sua famiglia, ma anche per utilizzare le informazioni neonatali raccolte presso il Centro di screening coinvolto;
- raggiungimento di una adeguata interfaccia operativa tra strutture di laboratorio, reparti di nascita coinvolti e struttura centrale, per una gestione agile e sicura dei campioni reclutati.

- costituzione di un Gruppo di coordinamento scientifico interdisciplinare della Rete nazionale che stabilisca le priorità di utilizzo dei cartoncini e i piani di ricerca prioritari sulla base di criteri prestabiliti.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'istituzione di una Rete nazionale di biobanche neonatali regionali, in grado di conservare un elevato numero di campioni residui dello screening in modo standardizzato, produrrà risultati di sicura trasferibilità per l'SSN e sicuri vantaggi per la tutela della salute pubblica. In particolare essa consentirà di:

- portare vantaggi per il nato e la sua famiglia. Infatti, la non distruzione, dopo i test di screening, e l'adeguata conservazione del materiale residuo dello screening neonatale renderà possibile l'integrazione con nuovi test il profilo analitico iniziale, o la sua utilizzazione a fini medico-legali;
- disporre di una risorsa insostituibile per la realizzazione di studi finalizzati alla ricerca di nuovi marcatori di patologia per le patologie rare oggetto dello screening, per altre patologie rare per le quali ancora non è disponibile un test di screening, ma anche per le patologie più comuni che affliggono la popolazione (sia in età infantile che in età adulta).

#### **Interazione cellule staminali neurali-microglia: ruolo dell'attivazione microgliale nel controllo della neurogenesi**

Il processo di attivazione microgliale, lungi dall'essere un fenomeno univoco, può dare origine a molteplici fenotipi funzionali compresi tra il classico fenotipo pro-infiammatorio (cosiddetto M1) e quello alternativo anti-infiammatorio (M2). Questo concetto, di recente acquisizione, rivoluziona la visione comune dell'attivazione microgliale come necessario sinonimo di neurotossicità e di ostacolo alla neurogenesi, in patologie neurodegenerative e neurologiche. Rimangono aperti numerosi quesiti riguardo all'evoluzione temporale del processo di attivazione, alla reversibilità dei fenotipi e alla capacità di preservare memoria di stimoli attivatori precedenti, nonché riguardo alle conseguenze funzionali dei differenti fenotipi microgliali per i processi neurogenici embrionali e dell'adulto. I principali obiettivi del nostro progetto sono:

- caratterizzazione molecolare e funzionale dei programmi alternativi di attivazione microgliale in diversi paradigmi sperimentali di stimolazione, in colture primarie corticali e organotipiche ippocampali;
- comprensione di come i differenti fenotipi funzionali microgliali possano influire sulle proprietà di cellule staminali neurali (NSC) di derivazione embrionale e adulta e della loro progenie. Intendiamo inoltre proseguire l'identificazione dei fattori molecolari responsabili degli effetti pro- o anti-neurogenici della microglia.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Avvalendoci di colture primarie di microglia e di linee epigeneticamente immortalizzate di NSC embrionali e adulte, già impiegate in nostri studi precedenti, e di colture organotipiche ippocampali, intendiamo sviluppare ulteriormente modelli sperimentali e paradigmi di stimolazione che permettano di far luce su alcuni degli aspetti di plasticità funzionale e memoria cellulare della microglia e sulla loro rilevanza per i processi rigenerativi cerebrali.

Particolare attenzione sarà rivolta all'espressione di mediatori solubili prodotti nelle diverse condizioni di stimolazione e al loro ruolo nella modulazione delle NSC. In collaborazione con il Dipartimento BBCD, Università Sapienza di Roma, intendiamo inoltre esplorare espressione e ruolo di un'ampia famiglia di enzimi proteolitici, le metalloproteasi

di matrice, e dei loro inibitori tissutali (TIMP) potenzialmente in grado di influenzare molti aspetti del programma neurogenico e delle funzioni microgliali stesse, come anche suggerito da studi condotti nel corso del precedente triennio.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'efficienza dei processi rigenerativi cerebrali endogeni in risposta a degenerazione acuta o cronica è significativamente limitata dalla scarsa sopravvivenza dei neuroni neoformati. Similmente, sopravvivenza, differenziamento e integrazione funzionale di NSC trapiantate in modelli animali di patologie neurodegenerative possono essere ostacolate dal microambiente sfavorevole che si instaura in conseguenza della patologia o delle procedure sperimentali adottate.

I nostri studi mirano ad implementare la conoscenza dei meccanismi di segnalazione cellulare che presiedono al controllo delle proprietà funzionali delle NSC e a comprendere il ruolo svolto dalle cellule microgliali in tali processi. In particolare l'identificazione del ruolo di specifici fattori rilasciati dalla microglia potrebbe suggerire nuovi bersagli molecolari per lo sviluppo di strategie terapeutiche mirate al potenziamento dei meccanismi riparativi cerebrali.

### **La neurobiologia del comportamento sociale: processi fisiologici e patologici nel topo e nell'uomo**

Il progetto si propone due obiettivi, lavorando in parallelo sul topo e sull'uomo:

- Individuare le aree cerebrali e i circuiti neuronali alla base della fisiologia del comportamento sociale in soggetti sani, mediante l'applicazione di tecniche opto- e farmaco-genetica in topi di controllo durante l'adolescenza e l'età adulta. Le aree cerebrali coinvolte nel controllo dell'interazione sociale verranno quindi marcate per valutare gli effetti di breve- e lungo-termine dell'attivazione/inibizione di specifiche popolazioni di neuroni presenti in tali aree. In parallelo, verranno condotti studi di *imaging* del cervello e di neuropsicologia in soggetti umani (adolescenti e adulti) per valutare il ruolo di specifiche aree cerebrali nel controllo del comportamento sociale nell'uomo.
- Stabilire il ruolo di queste specifiche aree cerebrali (e dei circuiti neuronali) nello sviluppo patologico di anomalie sociali comportamentali. Particolare attenzione verrà posta sulla sindrome *X-Fragile* (SXF), e le tecniche opto- e farmaco-genetica saranno applicate in topi FMR1-KO per valutare se i deficit sociali descritti in questi animali transgenici siano ascrivibili all'attivazione/inibizione di specifici circuiti cerebrali. In parallelo, studi di *imaging* del cervello e di neuropsicologia saranno condotti in pazienti SXF adolescenti e adulti, per valutare il ruolo di specifiche aree cerebrali nell'espressione e nello sviluppo delle anomalie sociali osservate in questi pazienti.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Ci si aspetta che le manipolazioni opto- e farmaco-genetiche influenzino profondamente il comportamento sociale dei topi di controllo, soprattutto quando tale manipolazione viene applicata durante la fase adolescenziale, nota per essere un periodo critico dello sviluppo neurocomportamentale. L'approccio comparativo chiarirà il grado di corrispondenza (tra il topo e la specie umana) delle aree cerebrali che presiedono al controllo del comportamento sociale. I risultati forniranno inoltre indicazioni riguardanti le aree cerebrali e i circuiti neuronali eventualmente alterati in SXF, contribuendo così a chiarire la fisiopatologia delle anomalie comportamentali sociali.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti in questo progetto contribuiranno a chiarire i meccanismi cerebrali alla base di specifici comportamenti sociali, con importanti ricadute per la messa a punto di trattamenti di una varietà di psicopatologie associate a disturbi del comportamento sociale. Inoltre, il progetto avrà dirette implicazioni cliniche nel campo della ricerca di SXF. Tale sindrome è la forma più comune di ritardo mentale ereditario e la sua sintomatologia in gran parte si sovrappone con DSA. Informazioni sull'eziopatologia di SXF è dunque importante sia per sé sia in relazione a DSA. Infine, la caratterizzazione dei deficit sociali dei pazienti SXF (e delle aree cerebrali coinvolte) potrebbe avere un enorme impatto clinico, contribuendo alla messa a punto di strategie di diagnosi e trattamento di questa sindrome.

### **La regolazione della proliferazione e del differenziamento in cellule staminali e precursori umani primari**

Le ricerche saranno focalizzate su cellule staminali e differenziamento, privilegiando i seguenti temi: i) meccanismi di proliferazione e differenziamento nelle cellule staminali; ii) meccanismi di controllo mediati da fattori nucleari come GATA-1, e ruolo dei recettori nucleari nel differenziamento eritroide; iii) stabilità genomica delle cellule staminali *in vitro*.

In particolare, gli obiettivi strategici in oggetto si sono focalizzati sul controllo della proliferazione dei precursori eritroidi umani primari dai proeritroblasti fino alla maturazione terminale ed enucleazione con la formazione di eritrociti maturi. Il ruolo dei glucocorticoidi e degli estrogeni nel controllo di questi fenomeni è stato rivalutato grazie ai precedenti studi e alla realizzazione che il sistema murino non è rappresentativo della complessità del recettore dei glucocorticoidi nell'uomo.

I nostri sviluppi delle tecniche di coltura *in vitro* ha permesso di identificare un nuovo *pathway* di regolazione che lega i recettori dello SCF e dell'eritropoietina a quello citoplasmatico dell'idrocortisone. Inoltre, la tecnologia senza siero messa a punto permette di analizzare il ruolo dei cofattori che regolano il processo maturativo terminale degli eritroblasti. Intendiamo proseguire questi studi sia sui precursori normali che in quelli da soggetti con alterazione della eritropoiesi come policitemia vera e Diamond-Blackfan anemia per chiarire un possibile ruolo degli steroidi in queste patologie.

### **Risultati attesi nel triennio**

Ci aspettiamo di:

- identificare nuovi target per terapie nei soggetti con alterazione della eritropoiesi;
- sviluppare tecniche di coltura che rendano economicamente fattibile la produzione di eritroblasti ed emazie a scopo trasfusionale *in vitro*.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati sono trasferibili sia come target per la identificazione di nuove molecole con funzioni terapeutiche che come *biomarker* diagnostici.

### **L'interazione tra geni e ambiente alla base della risposta agli antidepressivi**

La depressione maggiore colpisce fino al 10% della popolazione mondiale ed è uno delle dieci principali cause di mortalità. In Europa, 120 miliardi di euro l'anno vengono spesi a causa di questa malattia. La scarsa efficacia degli attuali trattamenti antidepressivi potrebbe essere migliorata attraverso una prospettiva farmacogenetica che tenga conto dell'interazione tra geni e ambiente.

Obiettivi dello studio sono:

- studiare il ruolo della interazione tra geni che favoriscono la sopravvivenza neuronale e i fattori regolatori del sistema glutamatergico nel determinare l'efficacia del Citalopram in un modello animale;
- replicare il risultato in un campione umano di pazienti depressi trattati con antidepressivi.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Si prevede di dimostrare come diversi geni candidati siano in grado di modulare la risposta al trattamento antidepressivo a seconda della combinazione con specifici eventi ambientali, sia nel modello animale sia nella nostra specie.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati finali del progetto, rilevanti ai fini dell'SSN, sono: il miglioramento degli approcci terapeutici alla luce della medicina personalizzata: sviluppo di nuovi trattamenti farmacologici in grado di modulare i fattori che favoriscono la sopravvivenza neuronale e i fattori regolatori del sistema glutamatergico, disegnati in base alle caratteristiche genetiche ed esperienziali dell'individuo. Ciò permetterà di trattare il paziente con la strategia terapeutica più efficace. I risultati del presente progetto permetteranno: i) di esplorare ulteriormente il ruolo dell'interazione gene-ambiente nel modulare la probabilità di diventare depressi e ii) di identificare diversi sottotipi di vulnerabilità alla depressione.

### **Lo stress perinatale nella prole umana e non-umana: un approccio traslazionale per lo studio dell'impatto epigenetico sulla depressione**

Nell'uomo, così come nei modelli animali (roditori), esperienze stressanti in età precoce sono associate all'aumentata metilazione dell'esone 1f nel promotore del gene GR nell'ippocampo. Oltre ai sistemi di risposta allo stress, l'espressione dei geni di plasticità, come quelli che codificano per fattori neurotrofici, potrebbe essere regolata epigeneticamente nel contesto degli stress precoci che possono contribuire ai disturbi mentali in età adulta.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Relativamente alla componente clinica, il progetto si focalizzerà sull'analisi della metilazione di geni target, mentre nel modello animale sarà volto a identificare modifiche epigenetiche dell'intero metiloma. Studi di correlazione permetteranno di associare il profilo di metilazione al fenotipo comportamentale in età adulta. Nel roditore, lo studio sarà a carattere longitudinale e consentirà di saggiare la comparsa di differenze nell'espressione genica a tempi diversi e nella metilazione del DNA tra i vari gruppi sperimentali, e la stabilità nel tempo di queste differenze.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questo progetto permetterà di incrementare le conoscenze relative alle basi molecolari della depressione, una delle principali cause di disabilità nel mondo, e apportare dei benefici alla salute e alla qualità della vita nell'uomo. I risultati permetteranno lo sviluppo di misure di prevenzione nelle popolazioni a rischio sulla base di nuovi criteri diagnostici e, potenzialmente, nuovi approcci terapeutici.

### **Metodi non invasivi per la diagnosi precoce dei Disturbi dello Spettro Autistico**

Lo studio precoce dello sviluppo dei fratelli di bambini con DSA sembra poter fornire informazioni preziose sulle caratteristiche di base di questo disturbo. I bambini cosiddetti ad alto rischio possono condividere alcune caratteristiche dei bambini con DSA anche se non

manifesteranno, in epoche successive, alcuna patologia. Nel corso dei primi mesi di vita esistono numerosi indici del benessere del bambino, e tra questi la motricità spontanea e le caratteristiche del pianto. Questo progetto si propone di studiare in un ampio campione di neonati a termine e in neonati ad alto rischio (10-15/2 anni) questi due indici attraverso registrazioni video della motricità spontanea e registrazioni audio del pianto a dieci giorni dalla nascita, a 6-12-18 e 24 settimane di vita. Focalizzeremo la nostra indagine su repertori motori e vocali in quanto sono risultati essere alterati in bambini con disturbi dello spettro autistico. Inoltre, lo studio dei movimenti spontanei e il pianto e la loro associazione risulta essere di grande rilevanza scientifica in quanto entrambe sono una misura dell'integrità e dello sviluppo del sistema nervoso centrale e possono essere studiati facilmente e in maniera completamente non invasiva. All'età di 6, 12 e 24 mesi le famiglie verranno invitate presso un ambulatorio degli IRCCS Stella Maris e Bambino Gesù per la valutazione dello sviluppo neuromotorio.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Dal confronto tra i dati raccolti nella popolazione di controllo e il gruppo alto rischio nei diversi parametri motori e vocali ipotizziamo di ottenere informazioni relative a marcatori precoci di disturbi dello spettro autistico.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto garantirà: i) l'identificazione precoce di bambini a rischio di sviluppare un DSA o un altro disturbo evolutivo delle competenze interattive e comunicative. La diagnosi precoce, come conferma l'esperienza degli ultimi anni, permette un intervento precoce che aiuta il bambino a sviluppare al meglio le proprie potenzialità rendendolo indipendente e quindi garantendogli un miglioramento della qualità della vita. Questo consentirà una riduzione significativa del carico familiare e del costo sanitario per l'SSN; ii) l'analisi del pianto neonatale e dei movimenti spontanei, in quanto condotta con metodi d'indagine non invasivi, potrà essere utile nell'identificazione precoce di bambini a rischio di sviluppare disturbi dello sviluppo e altre gravi malattie neuropsichiche e la loro valutazione potrà essere facilmente effettuata nelle terapie intensive neonatali e nelle neonatologie.

### **Modifiche post-traduzionali indotte dal perossinitrito (PN) nella *dinaminal* (DIN) e nella sinaptofisina (SIN), due proteine coinvolte nel processo di eso-endocitosi delle vescicole sinaptiche**

Lo studio delle modifiche indotte da un insulto ossidativo a carico delle proteine che regolano le fasi fondamentali del ciclo delle vescicole sinaptiche e del rilascio dei neurotrasmettitori può contribuire a chiarire il ruolo dello stress ossidativo nell'insorgenza del danno da eccitotossicità nelle malattie neurodegenerative. Il danno eccitotossico mediato dalla eccessiva stimolazione del recettore *N-Methyl-D-aspartate* (NMDA) è stato correlato alla formazione di PN, una specie altamente citotossica, e alle sue proprietà ossidanti e nitranti a carico dei residui di tirosina e triptofano delle proteine. La trasmissione sinaptica richiede un equilibrio finemente regolato del processo di eso-endocitosi delle vescicole sinaptiche, mediato da specifiche interazioni proteina-proteina, tra cui l'associazione tra SIN e DIN riveste un ruolo chiave. La DIN è una GTPasi che si assembla a formare una struttura ad anello che circonda le vescicole consentendo il completamento del processo di endocitosi. La DIN interagisce con il dominio C-terminale della SIN, una proteina integrale delle vescicole sinaptiche, e con la chinasi c-src, attraverso il dominio PRD, dalla quale è fosforilata in tirosina. Lo scopo del progetto è quello di identificare e caratterizzare le modifiche (fosforilazione e nitratura) indotte dal PN a carico di specifiche tirosine della

SIN e della DIN e verificare se tali modifiche possano influenzarne la reciproca associazione e con altri partner, tra cui c-src e Sinaptobrevina.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Studi precedenti hanno dimostrato che il trattamento di terminali sinaptici isolati (sinaptosomi) di ratto con PN induce un aumento del rilascio del glutammato dalle vescicole sinaptiche e la formazione di fosfotirosine e 3-nitrotirosine a carico di specifiche proteine delle vescicole, tra cui la SIN. L'analisi di spettrometria di massa (*Mass Spectroscopy*, MS/MS) ha permesso di identificare le tirosine modificate nella regione C-terminale della SIN. Tale regione è responsabile delle interazioni con le proteine coinvolte nel processo di eso-endocitosi, come la Sinaptobrevina e la DIN. In questo studio si propone di:

- identificare il residuo di tirosina fosforilato del dominio C-terminale della SIN responsabile del legame e dell'attivazione di due tirosina chinasi, c-src e lyn;
- valutare se lo stato di fosforilazione e nitratura della SIN possa modificarne la capacità di interazione con la Sinaptobrevina e con la DIN;
- valutare lo stato di fosforilazione della DIN in seguito a trattamento dei sinaptosomi con PN;
- verificare se l'attività GTPasica della DIN è influenzata dal trattamento dei sinaptosomi con PN, utilizzando un saggio *in vitro* di attività;
- individuare la presenza di eventuali siti nitrati nella DIN, tramite l'analisi MS/MS. Sarà, inoltre, effettuato un saggio *in vitro* per valutare la capacità di assemblaggio della DIN, proprietà strettamente influenzata sia dalla fosforilazione sia dall'attività GTPasica della DIN.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'identificazione e la caratterizzazione delle modifiche indotte da uno stress ossidativo in specifici bersagli a livello della terminazione sinaptica e le conseguenze funzionali di tali modifiche possono contribuire a chiarire il ruolo fisiopatologico dei radicali liberi e in particolare del perossinitrito nella regolazione dell'attività sinaptica. L'identificazione di vie di trasduzione del segnale selettivamente modificate e correlabili al danno ossidativo ed eccitotossico è di primaria importanza nello sviluppo di strategie e/o interventi farmacologici mirati alla prevenzione o al ritardo dei processi degenerativi che insorgono in particolare nelle patologie del sistema nervoso centrale per cui il coinvolgimento di un danno ossidativo è ampiamente descritto in letteratura. I risultati ottenuti saranno resi noti alla comunità scientifica attraverso i consueti canali (congressi e pubblicazioni internazionali) e anche attraverso incontri annuali di progress report.

#### **Monitoraggio non invasivo mediante *imaging* funzionale *in vivo* di nuovi farmaci utilizzati nelle malattie del comportamento**

Il metabolismo del cervello in modelli di malattie neurocomportamentali in ratti e topi è studiato da diversi anni nel Reparto di *Imaging* molecolare e cellulare (ICM) in collaborazione con il Reparto di Neuroscienze comportamentali con tecniche di MRS. Questi studi hanno consentito di identificare anomalie metaboliche in modelli di ADHD, sindrome di Rett e autismo. Questo progetto si propone di valutare il significato di alterazioni nelle MRI e nei segnali MRS come indicatori di diagnosi delle suddette malattie e risposta a terapie innovative. In particolare, con MRS *in vivo* saranno studiate le alterazioni delle risonanze di metaboliti presenti negli spettri di protoni e le loro alterazioni a seguito di trattamenti convenzionali e innovativi a lungo termine. Le caratteristiche anatomico-morfologiche del cervello saranno studiate con MRI ad alta risoluzione spaziale. Misure di parametri funzionali (quali il T2 e il coefficiente di diffusione apparente) saranno ottenute

mediante MRI quantitativa. Su alcuni modelli sarà inoltre valutata la connettività anatomica (mediante la misura del tensore di diffusione) e la connettività funzionale (attraverso l'acquisizione di immagini veloci di cervelli a riposo). Infine saranno studiate le attivazioni cerebrali nel cervello di ratti a seguito di differenti stimoli farmacologici per mezzo della misura dell'effetto BOLD.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- caratterizzazione mediante MRS *in vivo* dei profili metabolici cerebrali di modelli di ADHD (ottenuti mediante inoculo di lentivirus nel cervello di ratti), di sindrome di Rett (topi MeCP2-308), di autismo (topi Reeler) e di stress precoce. Saranno analizzate le aree di maggiore interesse per ciascun modello;
- valutazione degli effetti di trattamenti innovativi nei modelli con le tecniche MRI e MRS.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questo progetto di ricerca a carattere traslazionale può avere importanti ricadute nella diagnostica radiologica e nel campo delle neuroscienze, in relazione a:

- individuazione di nuovi indicatori MR di diagnosi e risposta a terapia, finalizzata al possibile trasferimento di conoscenze, metodi e protocolli dal livello preclinico a quello clinico;
- progettazione e validazione, su modelli preclinici *in vivo*, di nuove terapie mirate;
- sviluppo di metodi di *imaging* funzionale non invasivo per il monitoraggio *in vivo* di nuovi *end-point* farmacologici.

### **Monitoraggio non invasivo mediante *imaging* funzionale *in vivo* della risposta di tumori sperimentali a terapie innovative: valutazione di nuovi *end-point* farmacologici**

Gli studi sulle anomalie nel metabolismo glicolitico e fosfolipidico in tumori umani, studiate da alcuni anni nel Reparto ICM con tecniche di MRS hanno consentito di identificare nuovi indicatori di progressione tumorale e di risposta al trattamento e di progettare strategie terapeutiche mirate. Questo progetto si propone di valutare il significato di alterazioni nelle MRI e nei segnali MRS come indicatori di diagnosi e risposta a terapie. In particolare, con MRS *in vivo* saranno studiate le alterazioni delle risonanze di metaboliti presenti negli spettri di protone e di fosforo. Inoltre saranno effettuate misure di pH extracellulare e intracellulare in tumori spontanei di topi transgenici e le loro alterazioni indotte da inibitori delle pompe protoniche al fine di evidenziare il ruolo del pH nella risposta a terapie. Le caratteristiche anatomico-morfologiche dei tumori saranno studiate con MRI ad alta risoluzione spaziale. Misure di parametri funzionali (quali il T2, il coefficiente di diffusione apparente (ADC) e coefficienti di perfusione) saranno ottenute mediante MRI quantitativo.

Gli studi saranno condotti su modelli sperimentali di tumori umani altamente invasivi quali il carcinoma ovarico e mammario. Le misure *in vivo* saranno integrate da analisi MRS *in vitro* in alta risoluzione su colture cellulari, prelievi tissutali intatti e loro estratti.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- caratterizzazione mediante MRS *in vivo* dei profili metabolici di modelli sottocutanei e ortotopici di carcinoma ovarico in topi immunodeficienti, e tumori mammari spontanei in topi transgenici durante la crescita tumorale e nella risposta a terapie;

- valutazione degli effetti della inibizione o silenziamento genico di enzimi coinvolti nel ciclo della fosfatidilcolina, come possibili target di terapie antimetaboliche in modelli di carcinoma ovarico in topi immunodeficienti;
- valutazione del ruolo del coefficiente di diffusione apparente (ottenuto da misure quantitative di *imaging* MR pesato in diffusione) nella risposta precoce al trattamento in modelli di carcinoma ovarico in topi immunodeficienti e in carcinomi mammari spontanei in topi transgenici;
- valutazione mediante MRS *in vivo* del ruolo di modulazioni del pH extracellulare nella risposta di tumori sperimentali a terapie convenzionali e innovative.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questo progetto di ricerca a carattere traslazionale può avere importanti ricadute nella diagnostica radiologica e nella oncologia clinica, in relazione a:

- individuazione in tumori sperimentali di nuovi indicatori MR di diagnosi e risposta a terapia, finalizzata al possibile trasferimento di conoscenze, metodi e protocolli dal livello preclinico a quello clinico;
- progettazione e validazione, su modelli preclinici *in vivo*, di nuove terapie mirate contro enzimi attivati in cellule tumorali di origine epiteliale ad alto grado di invasività;
- sviluppo di metodi di *imaging* molecolare non invasivo per monitoraggio *in vivo* di nuovi end-point farmacologici;
- protocolli di modulazione del pH tumorale per ottimizzare l'*uptake* di farmaci e la risposta al trattamento.

#### **Patogenesi, diagnosi e terapia della sclerosi multipla (SM) alla luce di ipotesi emergenti sul ruolo di alterate interazioni tra geni e ambiente nello sviluppo della malattia**

Si tratta di un programma strategico nell'ambito della ricerca finalizzata 2007. Il progetto riunisce 12 gruppi di ricerca italiani con l'obiettivo di creare un network integrato di ricerca clinica sulla SM. Il programma è strutturato in quattro progetti che interagiscono sulla traccia di modelli patogenetici emergenti. Il progetto capofila "Eziologia e immunopatogenesi" esplora il coinvolgimento nella SM del virus di Epstein-Barr (EBV) e di elementi retrovirali, e i processi di attivazione immunitaria cronica. Nel progetto "Genetica ed epidemiologia" viene studiata l'associazione tra rischio di sviluppare la SM e geni che regolano la risposta immunitaria, e vengono effettuate indagini epidemiologiche su possibili associazioni tra SM, infezioni e malattie allergiche. Il progetto "Marcatori biologici e diagnosi" si avvale di piattaforme tecnologiche avanzate per individuare nel sangue e nel liquor dei pazienti con SM indicatori molecolari e funzionali di fasi precoci e avanzate della malattia. Il progetto "Terapia" si propone di identificare i trattamenti a migliore rapporto beneficio/rischio e beneficio/costo tra quelli in uso nell'SSN, di valutare l'efficacia e la tossicità di nuovi trattamenti per le forme maligne e progressive di SM, e di possibili terapie anti-herpesvirus.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- miglior comprensione del ruolo eziopatogenetico di agenti infettivi (in particolare dell'EBV) e dei meccanismi che sottendono alla persistente attivazione immunitaria nella SM;
- identificazione di varianti genetiche associate alla SM e del loro impatto sulla risposta immunitaria in pazienti e controlli della Sardegna e dell'Italia continentale;

- eventuale associazione tra allergie atopiche e SM in ampie coorti di soggetti ed effetto dell'esposizione precoce ad agenti infettivi sullo sviluppo di SM e allergie;
- identificazione di biomarcatori diagnostici e prognostici in relazione all'andamento clinico della SM e ai trattamenti terapeutici;
- identificazione di trattamenti a migliore rapporto beneficio/rischio e beneficio/costo tra le diverse opzioni terapeutiche attualmente utilizzate nell'SSN;
- valutazione dell'effetto clinico degli anticorpi anti-IFN $\alpha$  e del loro impatto economico sull'SSN;
- acquisizione di informazioni sulla tossicità e sulla persistenza dell'efficacia del trapianto autologo effettuato con identico schema terapeutico su tutti i casi con SM trattati in Italia, e identificazione della tipologia dei pazienti che meglio rispondono alla terapia;
- valutazione dell'efficacia dell'idrossiurea nelle forme di SM progressiva primaria;
- definizione, mediante una revisione sistematica, della rilevanza, riproducibilità, responsività interna ed esterna degli *outcome* clinici di efficacia utilizzati negli RCT per la SM.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti avranno un impatto sullo sviluppo di nuove strategie di prevenzione, diagnosi e cura della SM. La trasferibilità è individuabile in più direzioni:

- clinici, pazienti, associazioni e laici interessati a informazioni indipendenti sui trattamenti a migliore rapporto beneficio/rischio tra quelli in uso, e su nuove terapie efficaci per i pazienti non responsivi ai trattamenti attuali;
- SSN interessato a integrare il rapporto beneficio/rischio con una valutazione delle risorse e dei costi;
- ricercatori clinici interessati a identificare le aree di incertezza sui reali benefici di terapie a confronto per pianificare RCT futuri;
- ricerca sugli *outcome* di efficacia, inclusi quelli orientati al paziente, a fronte di una estrema variabilità di misure attualmente in uso per la SM;
- ricerca di base sulle relazioni causali tra fattori ambientali (virus, allergeni), geni, alterata risposta immunitaria e terapie.

#### **Programmazione precoce e alterazioni dello sviluppo neurocomportamentale: l'autismo come caso paradigmatico**

Obiettivo del progetto è quello di chiarire come l'ambiente precoce, modificando lo sviluppo dell'SNC, induca cambiamenti di lungo termine del comportamento e delle vie neurochimiche rilevanti per i DSA, in due diversi modelli animali (primati non umani e roditori). In particolare, si intende caratterizzare la neurochimica della serotonina, analizzando i correlati comportamentali: i) dei naturali polimorfismi del gene trasportatore della serotonina (5-HTT) nelle scimmie rhesus e ii) delle delezioni parziali o complete dello stesso gene nei topi. In particolare, si valuterà il ruolo di due fattori di rischio ambientale, ovvero la manipolazione del legame sociale/emotivo precoce e l'esposizione a un neurotossico, che, singolarmente o in combinazione con fattori di rischio genetici, possono interferire con la maturazione del sistema serotoninergico e dei meccanismi neurotrofici coinvolti nella plasticità cerebrale e nella modulazione dei comportamenti emotivi e sociali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Come primo obiettivo, verrà usato un modello di primate non-umano per identificare i geni e le vie rilevanti per le alterazioni dello sviluppo neurocomportamentale, che, modulate dall'ambiente precoce di allevamento, possono influire sul comportamento sociale sin dalle

prime fasi dello sviluppo ontogenetico. Il secondo obiettivo di questa proposta è quello di verificare, in diversi genotipi murini (5-HTT<sup>-/-</sup> e +/-), l'effetto: i) dell'esposizione perinatale a insetticidi organofosfati; ii) dell'allevamento in condizioni di arricchimento sociale durante fasi precoci dello sviluppo.

### **Trasferibilità dei risultati**

La collaborazione tra i Reparti di Neuroscienze comportamentali e Neurotossicologia e neuroendocrinologia consentirà una fusione e sinergia delle rispettive competenze in una prospettiva altamente traslazionale, finalizzata all'identificazione dei meccanismi che, modulando la plasticità cerebrale durante i periodi critici dello sviluppo, favoriscano la messa a punto di efficaci strategie di prevenzione e/o di intervento in soggetti potenzialmente vulnerabili a psicopatologie, oppure con diagnosi certa di disturbo neuropsichiatrico.

## **Realizzazione di una cartella clinica condivisa per la standardizzazione dei protocolli di diagnosi per l'Autismo e i Disturbi Pervasivi dello Sviluppo**

I disturbi dello spettro autistico sono disturbi generalizzati dello sviluppo (DGS) che insorgono precocemente nell'infanzia e perdurano in età adulta. Il decorso può essere migliorato con interventi precoci di tipo abilitativo specifici per il disturbo/individuo. A livello internazionale sono ritenute necessarie le seguenti azioni volte ad assicurare:

- diagnosi accurata e tempestiva;
- qualità dei piani terapeutici;
- organizzazione razionale dei servizi;
- interventi psico-educativi;
- continuità della presa in carico nel passaggio dall'età evolutiva all'età adulta.

In particolare, per quanto riguarda la diagnosi vi è la necessità di standardizzare i percorsi diagnostici. A tal fine, un'azione necessaria è la costruzione di uno strumento condiviso dai sistemi sanitari regionali per poter effettuare la sorveglianza dei DGS a livello sia regionale sia nazionale.

Sulla base di esperienze già consolidate si propone un modello di sorveglianza centrato sulla cartella clinica personale, che permette di registrare per ogni soggetto tutte le informazioni relative alla sua storia clinica e assistenziale, rendendo possibile la valutazione degli esiti e la realizzazione di studi epidemiologici.

Il progetto quindi si pone i seguenti obiettivi:

- sviluppo di un modello di cartella clinica specifico per i DGS;
- validazione del modello "cartella clinica" con i dati di una selezione di centri della Regione Lazio;
- sviluppo di un programma annuale di formazione degli operatori.

### **Risultati attesi nel triennio**

Nella prima fase del progetto verrà sviluppata la cartella clinica, sulla base dei sistemi informativi ELEA della Regione Emilia-Romagna, NPI.NET della Regione Piemonte e Servizio Igiene Sanità Pubblica (SISP) e Sistema Informativo Psichiatria di Comunità (SIPC) dell'Agenzia di Sanità Pubblica (ASP) della Regione Lazio. Nell'elaborazione della cartella clinica si terrà anche conto delle cartelle attualmente in uso nei seguenti centri:

- Università Sapienza di Roma, Dipartimento di Scienze Neurologiche Psichiatriche e Riabilitative dell'Età Evolutiva;
- Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma.

Nella seconda fase del progetto la cartella clinica verrà provata sui centri collaboranti alla prima fase, seguendo il seguente protocollo:

- le informazioni verranno raccolte presso i centri clinici, e trasmesse dal singolo centro all'ISS periodicamente ogni tre mesi previa eliminazione degli elementi identificativi dei pazienti;
- ogni sei mesi si terranno incontri con i responsabili dei centri clinici collaboranti per la valutazione dell'andamento del lavoro e l'eventuale rivalutazione delle variabili da rilevare.

Al termine del progetto si avrà a disposizione uno strumento per la rilevazione dei DSA.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Lo strumento predisposto e validato presso i due centri clinici collaboranti sarà messo a disposizione degli altri centri clinici/ASL-NPI (Neuropsichiatria Infantile) della Regione Lazio.

### **Regolazione del contesto ambientale al fine di migliorare l'efficacia degli antidepressivi serotoninergici**

La depressione maggiore (MD) è una malattia potenzialmente letale che colpisce fino al 10% della popolazione mondiale. Il costo annuale della MD è oltre euro 120 miliardi solo in Europa. Gli antidepressivi (AD) sono il trattamento standard per la MD. In particolare, il trattamento con gli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI) è quello più comunemente utilizzato. Tuttavia, l'efficacia degli AD è incompleta.

Recentemente è stato proposto un nuovo quadro teorico sulla efficacia degli AD. Si postula che la somministrazione di SSRI non influisca sullo stato dell'umore per sé, ma favorisca la plasticità neuronale, amplificando gli effetti dell'ambiente sull'umore. Tuttavia, dato che l'ambiente può essere sia di supporto che avverso, i suoi effetti possono essere sia benefici che dannosi. Pertanto, l'amministrazione di SSRI può aumentare la probabilità sia di sviluppare la psicopatologia sia di guarire da essa. Infatti, i dati clinici in letteratura dimostrano che gli SSRI sono efficaci soprattutto in persone con un elevato status socio-economico, e hanno conseguenze negative più frequentemente in persone con un reddito basso.

Lo scopo principale del progetto è di:

- descrivere l'influenza del contesto ambientale sull'effetto degli SSRI sull'umore;
- dimostrare che cambiando il contesto ambientale si può re-indirizzare l'esito del trattamento.

Questi risultati consentirebbero un miglioramento dei trattamenti attualmente disponibili.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono: i) lo sviluppo di strategie terapeutiche che prendano in considerazione il contesto ambientale al fine di trattare il paziente nel modo più efficace; ii) la messa a punto di una strategia alternativa da implementare nel caso in cui il trattamento con SSRI non risulti efficace; iii) l'identificazione dei meccanismi neurobiologici alla base dell'efficacia degli AD al fine di migliorare i farmaci attualmente disponibili e sviluppare nuovi composti psicoattivi per la cura della MD.

#### **Trasferibilità dei risultati**

In primo luogo, i risultati del presente progetto consisteranno nel definire strategie di trattamento innovative mirate a permettere un miglioramento della qualità della vita dei pazienti depressi. In secondo luogo, verranno definiti nuovi criteri diagnostici della MD basati su studi di *imaging* funzionale. Terzo, lo studio sui modelli animali permetterà di identificare nuovi bersagli terapeutici da sfruttare per lo sviluppo di strategie farmacologiche innovative. Quarto, migliorare il trattamento della MD ridurrà il costo di questa patologia per l'SSN.

## **Ruolo degli astrociti in disturbi dello sviluppo del sistema nervoso centrale**

Il nostro gruppo utilizza modelli *in vitro* di malattie neurodegenerative per studiarne i meccanismi patogenetici e sperimentare fattori neuroprotettivi. Un'attenzione particolare è stata posta, nel corso degli anni, al ruolo delle cellule astrocitarie in varie patologie (malattia di Alzheimer, retinopatia diabetica, SLA). Recentemente, in collaborazione con il gruppo dei Dipartimenti BCN e FARM, abbiamo affrontato lo studio degli effetti del fattore citotossico necrotizzante 1 (*Cytotoxic Necrotizing Factor 1*, CNF1), una tossina che attiva le RhoGTPasi, nei topi MeCP2-308, un modello murino di sindrome di Rett. In questi topi la somministrazione del CNF1 migliorava sensibilmente le performance cognitive. Abbiamo osservato che gli astrociti, atrofici nel modello animale, dopo somministrazione del CNF1 tornavano a presentare le caratteristiche del fenotipo *wild type*, suggerendo che gli effetti benefici del CNF1 potessero essere mediati dalle cellule astrocitarie. Per approfondire l'argomento, il progetto si propone di: i) caratterizzare il fenotipo astrocitario in un diverso modello di malattia di Rett (topi MeCP2 null) e in colture primarie astrocitarie da topi MeCP2 null, 308, e *wild type*; ii) studiare la capacità astrocitaria di favorire la crescita neuritica e la sinaptogenesi; iii) analizzare l'effetto del CNF1 sui vari parametri. Il progetto si propone inoltre di verificare l'eventuale ruolo degli astrociti in altre condizioni di deficit di sviluppo neurocomportamentale.

### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio contribuirà a chiarire se:

- l'alterazione fenotipica astrocitaria osservata nel topo MeCP2-308 è anche presente in un altro modello di malattia, il topo MeCP2 null, permettendo di verificare se una disfunzionalità astrocitaria fa parte del quadro generale della sindrome di Rett;
- l'atrofia astrocitaria osservata nei topi MeCP2-308 si accompagna ad una alterazione di *marker* morfologici di funzionalità (espressione di trasportatori del glutammato, glutamina sintetasi, gliotrasmettitori), che hanno un impatto sulla omeostasi della cellula neuronale;
- l'atrofia determina un alterato supporto degli astrociti alla crescita neuronale, in termini di sviluppo dell'albero neuritico e formazione di sinapsi; questi esperimenti potrebbero contribuire ad identificare l'esistenza di una correlazione tra disfunzionalità astrocitaria e difettoso sviluppo neuronale;
- gli astrociti atrofici forniscono una ridotta neuroprotezione verso l'eccitotossicità e il danno ossidativo, eventi presenti nel corredo sintomatologico della Rett;
- il CNF1 è in grado di ripristinare le normali caratteristiche morfologiche e funzionali degli astrociti disfunzionali Rett.

### **Trasferibilità dei risultati**

La sindrome di Rett è una grave patologia rara congenita dello sviluppo neurologico, che colpisce prevalentemente soggetti di sesso femminile. I pazienti presentano una sintomatologia complessa, che include disfunzioni motorie, disordini del ritmo del sonno, gravi deficit cognitivi. Allo stato dell'arte, non esiste una cura per la sindrome di Rett. La riattivazione del gene MeCP2, la cui mutazione è responsabile per la maggior parte dei casi della malattia, ha determinato una regressione dei sintomi, suggerendo che la patologia è reversibile, ma al momento, la terapia genica non è disponibile. In uno studio recente, abbiamo dimostrato che la modulazione delle RhoGTPasi attraverso la somministrazione di CNF1 è in grado di migliorare significativamente il fenotipo neurocomportamentale nel modello animale di Rett. Alla luce di questi risultati, il CNF1 potrebbe rappresentare una potenziale approccio alternativo nella terapia di questa condizione.

## **Ruolo dei canali del potassio di tipo *inward rectifier* espressi dagli astrociti nella patogenesi dei DSA**

Il progetto si propone di studiare i meccanismi molecolari alla base dei DSA associati a fenotipo epilettico. Recenti studi clinico-genetici hanno infatti indicato che i disturbi dello spettro autistico e l'epilessia sono condizioni strettamente correlate e, quando associate, definiscono un sottogruppo di pazienti denominato "Fenotipo Autismo-Epilessia (*Autism Epilepsy Phenotype, AEP*)". È possibile che, alla base dell'autismo e dell'epilessia, vi possano essere meccanismi patogenetici in comune, legati a disfunzioni dei canali gliali del potassio (canali Kir). Lo studio proposto ha come scopo di capire se e come i canali Kir espressi dalle cellule astrocitarie svolgano un ruolo nell'eziopatogenesi del fenotipo autismo-epilessia.

### **Risultati attesi nel triennio**

Si prevede che il progetto possa contribuire a:

- identificare nuove mutazioni nei geni dei canali del potassio KCNJ10, KCNJ16 e KCNJ2 nei pazienti con AEP e valutare il loro contributo all'insorgenza del fenotipo autismo-epilessia;
- comprendere gli effetti funzionali delle mutazioni sull'attività dei canali;
- rivelare una correlazione tra lo spettro clinico e i dati genetici ottenuti.

### **Trasferibilità dei risultati**

Questo progetto potrebbe generare nuove conoscenze sui meccanismi alla base sia dell'autismo che dell'epilessia e di conseguenza portare ad un miglioramento della diagnosi, della consulenza genetica e del trattamento di questi disturbi, aprendo nuove prospettive per lo sviluppo di strategie farmacologiche innovative.

Ruolo dei microRNA nel differenziamento di cellule staminali neurali e nella neurogenesi e loro applicazione terapeutica in modelli di malattie neurodegenerative e lesioni del midollo spinale.

I microRNA (miR) rappresentano una classe emergente di piccoli RNA non codificanti che, agendo a livello posttrascrizionale, sono in grado di modulare l'espressione genica. Centinaia di miR sono espressi nel sistema nervoso centrale, e alterazioni della loro espressione sono associate ad un numero sempre crescente di patologie neurodegenerative. Un'importante frazione di questi miR è espressa nei precursori neurali che rappresentano un utile modello *in vitro* in grado di ricapitolare il differenziamento gliale e neuronale.

La sostituzione di neuroni degenerati mediante trapianto di cellule staminali neurali (CSN) rappresenta un'importante strategia terapeutica per ricostituire circuiti perduti in seguito a malattie neurodegenerative e a lesioni del midollo spinale. Tuttavia il loro utilizzo terapeutico è ancora limitato dalla scarsa capacità di sopravvivenza delle cellule trapiantate, dalla difficoltà a differenziarsi in uno specifico tipo neuronale e di elaborare una rete di connessioni sinaptiche. Obiettivo del presente progetto di ricerca è l'identificazione di quei miR espressi e modulati in modo specifico in CSN, per poi comprenderne il ruolo durante la neurogenesi, la plasticità e la riparazione del sistema nervoso centrale. In aggiunta, lo studio prevede la valutazione *in vivo* delle capacità riparative delle CSN geneticamente modificate (miR *knock-in* o *knock-out*), utilizzando modelli murini di malattie neurodegenerative e di lesione del midollo spinale.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati previsti sono: i) identificazione di miR modulati durante il differenziamento delle cellule staminali neurali; ii) valutazione degli effetti dell'alterata espressione di specifici miR identificati sul differenziamento neuronale e sulla neurogenesi sia *in vitro* che *in vivo*, iii) valutazione della possibile applicazione terapeutica di CSN con modificata

espressione dei miR in modelli di malattie neurodegenerative e di lesione del midollo spinale.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati legati all'identificazione di miR specificamente modulati nelle CSN permetteranno una migliore comprensione dei complessi meccanismi regolatori che controllano il differenziamento e la neurogenesi come anche di evidenziare potenziali target terapeutici in patologie neurodegenerative.

### **Ruolo dei mitocondri nell'attivazione microgliale**

Con la presente programmazione triennale si intende proseguire gli studi intrapresi lo scorso triennio (2009-2011) con il progetto dal titolo "Funzioni mitocondriali e loro ruolo nella determinazione dello stato di attivazione microgliale". In base ad una crescente letteratura è ormai riconosciuta l'importanza dell'attività mitocondriale nella regolazione dei più vari aspetti della risposta immunitaria. Solo alcuni esempi sono il ruolo di piattaforma per lo sviluppo della risposta anti-virale Ifn- $\beta$  mediata, l'attivazione del complesso multi proteico denominato "inflammosoma" NLRP3 responsabile della formazione di IL-1 $\beta$ , la regolazione del processo di riconoscimento dell'antigene. Più in particolare sembra delinearsi la correlazione esistente fra lo stato funzionale del *lineage* microgliale/macrofagico e gli stati energetico (produzione di ATP), metabolico (equilibrio glicolisi/betassidazione), ossidativo (produzione di ROS) mitocondriali. In questo contesto è data l'importanza dell'infiammazione come evento patogenico nonché per il suo ruolo della microglia nel mantenimento e nel recupero dell'omeostasi tissutale, lo sforzo della ricerca è indirizzato alla individuazione dei segnali prodotti dai mitocondri o agenti su questi ultimi, nonché alla caratterizzazione dei meccanismi coinvolti, alla base dello sviluppo di fenotipi microgliali anti- piuttosto che pro-infiammatori.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Si studieranno i seguenti aspetti:

- Ingresso di Ca<sup>2+</sup> nella matrice mitocondriale. La stimolazione dei recettori purinergici P2 risulta dai nostri studi in una maggiore efficienza nell'indurre captazione di Ca dei recettori P2Y1 e P2Y12 in microglia a riposo, dei recettori P2Y4 e P2X7 dopo attivazione con lipopolisaccaride (LPS). Dato il diverso ruolo svolto da tali recettori (P2Y1 e P2Y12 nella migrazione, P2Y4 nella fagocitosi, P2X7 nella stimolazione dell'inflammosoma), si intende delineare il ruolo del Ca in queste funzioni e gli eventuali effetti della stimolazione anti-infiammatoria.
- Espressione e funzione della proteina UCP2. I ROS prodotti dal mitocondrio possono svolgere una azione di controllo di vie di trasduzione coinvolte nella determinazione del fenotipo microgliale, oltre che l'aumento dello stress ossidativo. La proteina UCP2 sembra svolgere un ruolo centrale nella regolazione della produzione di ROS da parte dei mitocondri. Si intende proseguire gli studi i cui risultati preliminari avvalorano l'ipotesi di un suo ruolo nella regolazione dell'attivazione microgliale.
- Morfologia e localizzazione. La morfologia e la localizzazione mitocondriale sono determinanti per la trasduzione del segnale oltre che predittivi di eventuali disfunzioni funzionali. Con indagini morfometriche e di espressione si intendono studiare gli effetti degli stimoli in oggetto sui fenomeni di fusione e fissione oltre che delle interazioni con il citoscheletro.

### **Trasferibilità dei risultati**

Si studieranno gli effetti di agenti con possibili capacità anti-infiammatorie, fra i quali anche agenti oggetto di altri progetti triennali proposti dal Reparto di Neurologia sperimentale (agonisti del PPAR © aminoacidi ramificati).

I risultati di questo studio potranno contribuire alla comprensione del ruolo della componente mitocondriale nei processi alla base dei fenomeni infiammatori e di stress ossidativo, oltre che di recupero dell'omeostasi tissutale, svolti dalle cellule coinvolte come agenti attivi (microglia) nelle patologie degenerative, e in ultima analisi all'identificazione degli adeguati interventi terapeutici.

### **Ruolo dei recettori adenosinici A2A nel ripristino dell'omeostasi del Ca<sup>2+</sup> lisosomiale in modelli *in vitro* della sindrome metabolica Niemann Pick**

La sindrome Niemann Pick (NP) è caratterizzata da un accumulo lipidico lisosomiale e da recenti osservazioni risulta che una alterata distribuzione del Ca<sup>2+</sup> possa contribuire alla sua patogenesi. In un progetto in collaborazione con il Dipartimento FARM, allo scopo di verificare quanto la stimolazione dei recettori adenosinici A2A possa ripristinare la normale maturazione endo/lisosomiale, la distribuzione del colesterolo e l'omeostasi del Ca<sup>2+</sup> lisosomiale, abbiamo recentemente utilizzato tecniche di misurazione indiretta del Ca<sup>2+</sup> lisosomiale, di citochimica e di immunoidentificazione di specifici marcatori lisosomiali, autofagici e del colesterolo. Tali esperimenti sono stati svolti su modelli *in vitro* della NP quali fibroblasti da pazienti NP, oltre che colture microgliali e oligodendrocitarie in cui l'alterata distribuzione del colesterolo veniva sperimentalmente indotta. Da tali esperimenti è risultata la capacità dei recettori A2A di ripristinare l'omeostasi del Ca<sup>2+</sup> e ci forniscono le prime indicazioni su un possibile ruolo protettivo sulle alterazioni sopra menzionate. Parallelo al danno lisosomiale abbiamo inoltre evidenziato un danno mitocondriale (diminuzione del potenziale mitocondriale e dell'espressione del complesso IV della catena respiratoria, MTCO), alterazioni a loro volta corrette dalla stimolazione dei recettori A2A (in collaborazione con il FARM).

### **Risultati attesi nel triennio**

Nel proseguo di tale studio intendiamo affrontare i seguenti aspetti:

- caratterizzazione farmacologica dei recettori coinvolti e della via di trasduzione del segnale legata al ripristino della concentrazione endo/lisosomiale di Ca<sup>2+</sup>;
- caratterizzazione dell'effetto della stimolazione A2A sulla fisiologia mitocondriale, e sulla protezione/ripristino dell'attività mitocondriale in modelli di NP;
- caratterizzazione degli effetti della stimolazione A2A sulla maturazione endo/lisosomiale, sull'attività autofagica e sull'omeostasi del colesterolo.

### **Trasferibilità dei risultati**

Le osservazioni fin qui acquisite consentono di ipotizzare l'utilizzo della stimolazione dei recettori adenosinici A2A come intervento farmacologico nella terapia della NP. Con gli studi che intendiamo affrontare, attraverso la caratterizzazione più dettagliata del complesso degli effetti di tale stimolazione, ci riproponiamo di validare ulteriormente tale utilizzo terapeutico.

### **Ruolo dell'attivazione gliale nelle fasi precoci della retinopatia diabetica**

Il nostro gruppo conduce da alcuni anni studi sulle alterazioni precoci a carico delle cellule neuronali e gliali retiniche nella malattia diabetica. La ricerca sulla retinopatia diabetica si concentra principalmente sulla fase tardiva della malattia quando l'insorgenza di alterazioni vascolari è in grado di compromettere gravemente la funzionalità retinica. Dati

recenti suggeriscono la presenza di alterazioni retiniche già nelle fasi iniziali della malattia. Al fine di valutare queste alterazioni precoci saranno allestite colture primarie neuronali, gliali e microgliali da retine di embrioni di ratto che verranno coltivate in condizioni di normale e alto glucosio in modo da simulare il *milieu* diabetico. L'uso di queste colture ci consentirà di valutare gli effetti diretti dell'iperglicemia sulle cellule retiniche. Nel nostro laboratorio abbiamo evidenziato come il milieu diabetico *in vitro* sia in grado di attivare la glia di Muller senza che siano ancora evidenti alterazioni a carico delle cellule neuronali. Nel prossimo triennio cercheremo di comprendere sia il meccanismo di questa attivazione ma anche se l'attivazione gliale possa avere un ruolo positivo nel mantenimento della funzione retinica. Dati sperimentali e clinici mostrano la presenza di un certo grado di infiammazione nella retina diabetica suggerendo un coinvolgimento della componente microgliale retinica. Verificheremo questa ipotesi con uno studio su cellule microgliali retiniche esposte al *milieu* diabetico.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Dagli esperimenti di questo triennio ci aspettiamo di ottenere risultati in grado di descrivere in maniera più approfondita i meccanismi legati allo stress causato dalle prime fasi dell'iperglicemia alle cellule retiniche. In studi precedenti abbiamo visto come le colture miste neuroni/glia siano resistenti all'alto glucosio mentre lo stesso trattamento risulta in grado di indurre un aumento di apoptosi nei neuroni "puri". Con i prossimi esperimenti potremo chiarire quali meccanismi siano legati all'apoptosi neuronale e quali *pathway* siano attivati dal *milieu* diabetico nella glia di Muller. Inoltre potremo verificare se all'attivazione di quest'ultima sia associato o meno un effetto protettivo verso le cellule neuronali e quindi quanto siano opportuni eventuali trattamenti in grado di inibire questa attivazione nei pazienti diabetici. Inoltre potremo valutare se nel nostro modello sia presente un'attivazione della microglia retinica e alla produzione di quali fattori pro- o anti-infiammatori sia legata. Grazie alla versatilità dei modelli *in vitro* potremo verificare se terreni condizionati da cellule micro e macrogliali trattate con alto glucosio siano in grado di modificare la vitalità delle cellule neuronali in condizioni normali o di alto glucosio.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'identificazione di fattori in grado di prevenire o rallentare il danno neuronale nel corso della retinopatia diabetica rappresenta certamente un obiettivo di fondamentale importanza nell'ambito della salute pubblica, sia per quello che riguarda il miglioramento della qualità della vita dei pazienti, sia per quello che concerne la riduzione del costo della malattia per il sistema sanitario nazionale. Conoscere in maniera più approfondita la risposta delle cellule retiniche al *milieu* diabetico ci può consentire da un lato di aumentare i target disponibili per nuove molecole da usare come potenziali farmaci nelle fasi precoci della malattia, dall'altro di capire se l'uso di farmaci efficaci nella fase tardiva della retinopatia diabetica possa essere esteso alla fase precoce della malattia senza potenziali conseguenze negative.

### **Ruolo della differenza di genere nella patogenesi delle malattie immunomediate**

Gli estrogeni esercitano la loro funzione mediante il legame a due distinti recettori intracitoplasmatici, *Estrogen Receptor Alpha* (ERa) ed *Estrogen Receptor Beta* (ERb) che una volta legati agiscono come fattori di trascrizione di geni target. Più recentemente è stata evidenziata su alcuni tipi cellulari l'espressione in superficie di tali recettori. Tali recettori di membrana una volta legati, svolgono la loro azione in modo rapido, attivando una serie di cascate di segnale che mediano la proliferazione, la differenziazione e l'apoptosi.

Scopo di questo progetto sarà valutare il ruolo degli estrogeni sull'alterazione dell'omeostasi e sulla modulazione del destino cellulare, in termini di apoptosi e autofagia, in linfociti umani di pazienti affetti da malattie autoimmuni che presentano un'incidenza più elevata nelle femmine e in cellule neuronali e endoteliali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

In generale il risultato atteso di tale progetto è la comprensione del ruolo degli estrogeni e dei loro recettori nell'insorgenza e progressione di malattie autoimmuni e immunomediate:

- l'espressione di ERa e ERb di superficie e intracellulare in differenti sottopopolazioni linfocitarie (T, B e *Natural Killer cell* – NK); in cellule neuronali primarie di ratto e linee di neuroblastoma, in cellule endoteliali della barriera ematoencefalica;
- le differenti vie di trasduzione del segnale (es. Ca<sup>++</sup>, cAMP, attivazione di protein chinasi) indotte da ligandi di ER (es. estradiolo, autoanticorpi specifici per ER);
- la correlazione tra i livelli plasmatici di estrogeni, la presenza di autoanticorpi specifici, l'espressione di ER e l'andamento clinico della malattia.

Verrà inoltre valutato il ruolo degli autoanticorpi specifici per il recettore degli estrogeni su cellule del sistema immunitario e su linee di cellule endoteliali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Lo studio dell'espressione di ER di membrana sulle cellule del sistema immunitario e dei meccanismi di trasduzione del segnale permetteranno di aprire nuove prospettive per lo sviluppo di terapie mirate all'immunomodulazione mediante attivazione o blocco di tali recettori.

### **Sindrome di iperattività e deficit di attenzione (Attention-Deficit Hyperactivity Disorder, ADHD): modellizzazione dei sintomi tramite lentivirus e ricerca di nuovi target per la terapia**

La ADHD si associa con disfunzioni centrali del trasportatore della DAT e della serotonina (SERT). Non vi è ad oggi un modello animale universalmente accettato per l'ADHD: il più utilizzato in laboratorio è lo SHR (Sagvolden *et al. Biol Psychiatry* 2005), privo però di *construct validity*. Ci si propone di validare un modello animale innovativo per la ADHD, mediante *gene transfer* localizzato in specifiche aree cerebrali. Modulatori di espressione genica potranno modificare il comportamento degli animali *in vivo*. Per quanto concerne la diagnosi, non esistono biomarker affidabili e ad oggi la patologia viene riconosciuta prevalentemente tramite l'osservazione nel bambino dei sintomi comportamentali. Per quanto concerne la terapia, gli approcci correnti sono basati su farmaci psico-stimolanti (come il metilfenidato, MPH). Alcuni recenti studi nel ratto hanno dimostrato però che una esposizione a MPH in adolescenza potrebbe causare cambiamenti comportamentali, che perdurano nell'età adulta (Andersen *et al. Nat Neurosci* 2002; Carlezon *et al. Biol Psychiatry* 2003; Bolanos *et al. Biol Psychiatry* 2003). Recentemente abbiamo dimostrato una relazione funzionale fra il recettore 7 della serotonina (Htr7) e il comportamento impulsivo nei ratti (Adriani *et al. Neuropsychopharmacology* 2006; Adriani *et al. Neurotoxicol Teratol* 2007; Adriani *et al. Genes Brain Behav*, in press).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Un vettore lentivirale sarà inoculato stereotassicamente nel *nucleus accumbens* (NAcc) e/o nella *ventral tegmental area* (VTA). Ciò permetterà di somministrare, in maniera altamente localizzata, delle cassette di espressione contenenti *enhancer* e/o *silencer* dei geni per il DAT e/o per il SERT (IGB-CNR). Tale innovativo modello animale sarà caratterizzato:

- nel profilo comportamentale (attenzione/cognizione; auto-controllo/impulsività; motivazione/depressione; emotività/ansia), per valutare se i sintomi della ADHD siano riproducibili e in quale misura;
- utilizzando la tecnica MR *in vivo* della spettroscopia (MRS) e dell'*imaging* farmacologico (ph-MRI), due approcci non invasivi. Inoltre, saranno saggiate nuove molecole che agiscono sull'Htr7, un potenziale nuovo target per taluni sintomi psichiatrici. Infine, per quanto riguarda studi clinici, sarà valutata la risposta emodinamica della corteccia prefrontale, incluse sia tecniche di MR che la spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso (fNIRS). Rispetto agli altri metodi di *neuroimaging* (Wolf *et al.*, 2007), la fNIRS consente di effettuare misurazioni in soggetti comodamente seduti in posizione rilassata. Questo approccio innovativo coinvolgerà bambini con diagnosi di ADHD (con e senza trattamento farmacologico) e un gruppo di controlli di pari età, sottoposti a una batteria di compiti di funzionalità prefrontale (vigilanza, attenzione, inibizione della risposta).

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questo progetto soddisfa la necessità di modellizzare i sintomi della ADHD in animali di laboratorio, per poi valutare l'efficacia di approcci diagnostici e terapeutici innovativi. La trasferibilità a breve termine verrà assicurata con:

- l'organizzazione di una conferenza internazionale presso l'ISS, per riunire gli esperti mondiali nella ricerca preclinica sui sintomi della ADHD;
- la ricerca di nuovi *marker* diagnostici in campioni di sangue di provenienza clinica, in particolare i livelli ematici di auto-anticorpi diretti contro DAT e/o SERT (Swedo & Grant, *J Child Psychol Psychiatry*, 2005);
- studi che avranno valutato i cambiamenti emodinamici nella corteccia prefrontale di bambini con ADHD durante l'esecuzione di TEST (Weber *et al.*, 2005, 2007), permettendo di valutare la sensibilità della fNIRS e della MR nell'individuare possibili modificazioni dell'emodinamica corticale regionale durante l'esecuzione di specifici compiti di funzionalità frontale.

#### **Spettrometria di massa delle proteine**

Il Dipartimento BCN ospita un gruppo informale interdipartimentale di interesse per la proteomica. Tale gruppo agisce di fatto come *facility* di proteomica dell'Istituto e continuerà l'intensa attività collaborativa e di servizio nei confronti di gruppi di ricerca interni ed esterni all'ISS che richiedono l'uso della spettrometria di massa delle proteine.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Pubblicazioni scientifiche.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Eventuali biomarcatori di possibile utilità diagnostica o terapeutica, che verranno trasferiti all'SSN.

#### **Studio degli effetti dell'esposizione ad interferenti tiroidei sulla salute umana**

Lo iodio è il più importante interferente tiroideo (IT) in quanto costituisce l'elemento essenziale per la sintesi degli ormoni tiroidei, i quali svolgono un ruolo fondamentale nello sviluppo del sistema nervoso centrale e nel mantenimento della omeostasi metabolica nell'adulto. Lo iodio viene introdotto nell'organismo attraverso gli alimenti, per cui una carenza nutrizionale anche lieve può condizionare fortemente la normale funzione tiroidea. Sono IT anche alcune sostanze chimiche di sintesi. Tra queste vi sono i pesticidi, sostanze ad

alto potenziale di esposizione poiché entrano facilmente nella filiera alimentare raggiungendo tutti gli strati della popolazione. La progettualità che si intende realizzare nei prossimi tre anni è finalizzata a continuare studi attualmente in corso e attivarne nuovi su modello sperimentale con l'obiettivo di stabilire il reale impatto sulla salute umana dell'esposizione a miscele di pesticidi. In particolare:

- si amplierà lo studio in corso nel comune di Maddaloni per la valutazione degli effetti dell'esposizione a pesticidi in soggetti professionalmente esposti, nei loro familiari e nella popolazione generale;
- si attiverà uno studio condotto su modello murino esposto cronicamente a basse dosi di miscele di pesticidi in fasi critiche dello sviluppo. In entrambi gli studi si cercherà di stabilire l'eventuale effetto protettivo di un adeguato apporto nutrizionale di iodio.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Dall'attività di ricerca proposta ci si attende di ottenere dati rilevanti che consentano di valutare l'effetto nell'uomo e in organismi modello di una miscela di pesticidi quali i composti organofosforici (OP) e gli etilenbisditiocarbamati (EBDC) e di evidenziare la relazione tra esposizione e manifestazioni cliniche o sub-cliniche di patologie tiroidee.

Pertanto, i risultati attesi dal primo studio saranno:

- la verifica del rapporto di causa/effetto tra esposizione a pesticidi (valutazione di marcatori di esposizione) e funzione tiroidea (valutazione di marcatori di effetto) in soggetti professionalmente esposti, nei loro familiari di primo grado e in un campione rappresentativo della popolazione generale;
- la valutazione del possibile ruolo additivo della carenza nutrizionale di iodio (valutazione delle iodurie).

Inoltre, attraverso la realizzazione dello studio *in vivo* sarà possibile:

- verificare i possibili effetti additivi/sinergici sulla funzione tiroidea dell'esposizione cronica a basse dosi di una miscela di OP e EBDC in gravidanza e in fasi critiche dello sviluppo pre- e post-natale;
- verificare il possibile effetto cumulativo dell'esposizione simultanea a dieta iodocarente e alla miscela di IT.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati di questi studi contribuiranno ad aumentare le conoscenze sul reale impatto sulla salute dell'esposizione cronica ad una miscela di IT nella popolazione generale al fine di identificare e, quindi, trasferire all'SSN strumenti utili per la sorveglianza e la prevenzione di eventuali patologie associate all'esposizione di tali sostanze. In particolare, il risultato principale atteso con le nuove conoscenze sui possibili effetti tiroidei a breve, medio e lungo termine relative ai composti in esame, sarà quello di migliorare l'attuale regolamentazione per l'uso di pesticidi nella pratica agricola. Gli studi condotti consentiranno inoltre, l'identificazione di strategie preventive e possibili soluzioni innovative in grado di aumentare la sicurezza del lavoro agricolo e la riduzione dei rischi per la salute nella popolazione generale e in soggetti particolarmente vulnerabili.

### **Studio dei determinanti ontogenetici per un invecchiamento sano o patologico: una prospettiva di lungo termine**

Nei Paesi occidentalizzati l'aspettativa di vita è notevolmente aumentata tuttavia è stata accompagnata da un progressivo aumento dell'incidenza di patologie legate all'età, spesso di origine metabolica, che interferiscono con la qualità della vita. Tali patologie si manifestano in tarda età tuttavia la loro comparsa può essere influenzata da fattori di rischio precoci durante fasi ontogenetiche pre- e postnatali. Scopo del progetto: investigare quei

determinanti che in fasi precoci dello sviluppo possano influenzare l'esito del processo di invecchiamento. La ricerca integrerà lo studio dell'interazione gene-ambiente con quello di cambiamenti funzionali in geni coinvolti nella regolazione del metabolismo e dell'invecchiamento. Il topo p66Shc *knock-out* (p66Shc<sup>-/-</sup>) fornirà il background genetico che comporterà una riduzione sistemica dello stress ossidativo e un aumento del metabolismo basale, predisponendo ad un invecchiamento sano; l'esposizione a una dieta ricca in grassi in gravidanza costituirà la componente ambientale stressante durante fasi ontogenetiche precoci. Obiettivi: i) collegare studi ontogenetici con quelli di invecchiamento in una prospettiva di lungo termine, ii) individuare marcatori precoci di fragilità, iii) elaborare strategie efficaci per prevenire l'insorgenza di uno stato di morbilità durante l'invecchiamento. I marcatori di fragilità che saranno individuati nel modello animale saranno validati su una popolazione di pazienti obesi umani.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Ci aspettiamo: i) che la prole di topi p66Shc<sup>-/-</sup> sia protetta da anomalie dello sviluppo indotte dall'obesità materna e quindi da un invecchiamento precoce; ii) cambiamenti significativi in topi obesi nei livelli di BDNF e nell'espressione di p66Shc; tali geni potrebbero rappresentare utili biomarcatori e possibili obiettivi terapeutici; iii) una forte correlazione tra i biomarcatori di vulnerabilità identificati nel modello animale e nell'uomo. I risultati permetteranno di ricavare nuove informazioni su marcatori genetici e umorali di vulnerabilità nell'uomo e di elaborare strategie efficaci di prevenzione e trattamento. Tale approccio presenta notevoli potenzialità traslazionali per lo studio di patologie associate all'invecchiamento, particolarmente di quelle associate a perturbazioni dell'ambiente metabolico.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'obesità è una condizione strettamente legata allo stile di vita dei Paesi occidentalizzati che può accelerare l'invecchiamento, favorendo l'insorgenza di malattie croniche metaboliche quali il diabete di tipo 2 (T2D) e patologie cardiovascolari (CVD). In Italia, il consumo di cibi ad alto contenuto calorico e poveri di sostanze nutritive, e la mancanza di esercizio fisico, sono in gran parte responsabili per il previsto aumento della prevalenza di T2D, in particolare tra le persone oltre i 65 anni. La comprensione dei meccanismi che collegano fattori ontogenetici precoci al processo d'invecchiamento potrebbe aiutare a elaborare strategie efficaci per prevenire l'obesità e alleviare la fragilità dei pazienti anziani, riducendo anche il peso economico dei costi relativi alla gestione e/o ospedalizzazione dei pazienti cronici.

### **Studio del ruolo dei recettori del *Tumor Necrosis Factor* (TNF) durante i processi di demielinizzazione e rimielinizzazione**

Il TNF, una citochina prodotta durante l'infiammazione, coordina molteplici attività ed è coinvolta nella difesa e nella sorveglianza immunitaria, nell'omeostasi cellulare e nella risposta a vari tipi di danno. Il TNF attiva due recettori, il TNFR1 che è principalmente coinvolto nei processi pro-infiammatori e il TNFR2 che è implicato nei processi di neuroprotezione e riparo del danno. Il duplice ruolo del TNF ha stimolato lo sviluppo di strategie volte ad inibire selettivamente la risposta pro-infiammatoria del TNF mediata da TNFR1, mantenendo i benefici dell'attivazione del TNFR2. Nelle malattie infiammatorie e demielinizzanti dell'SNC, come la SM, l'uso di composti selettivi per i recettori del TNF è ancora molto limitato e il loro meccanismo d'azione deve essere chiarito. In questo progetto ci proponiamo di comprendere meglio i meccanismi che regolano l'espressione di TNFR1 e TNFR2 nell'SNC e il ruolo di questi recettori in modelli di demielinizzazione animale, dove

L'assenza di fattori ostili al differenziamento degli oligodendrociti permette una completa rimielinizzazione e in lesioni di tessuto cerebrale di pazienti con SM, dove la rimielinizzazione è scarsa o assente.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Mediante tali studi cercheremo di capire se la diversa espressione di TNFR1 e TNFR2 possa definire un differente programma d'attivazione dei macrofagi/microglia coinvolti nei processi di demielinizzazione/rimielinizzazione (fenotipo pro-infiammatorio M1 verso fenotipo pro-regenerativo M2).

#### **Trasferibilità dei risultati**

Queste conoscenze potrebbero favorire lo sviluppo di nuove terapie volte a manipolare il sistema TNF/TNFR e a promuovere la componente pro-rimielinizzante e neuroprotettiva dell'infiammazione. Tali terapie potrebbero essere impiegate, in associazione con farmaci immunomodulatori e immunosoppressivi, per la cura dei pazienti affetti da malattie infiammatorie demielinizzanti del sistema nervoso centrale, quali la SM.

### **Studio del ruolo della compromissione dei meccanismi di riparazione del DNA nella neurodegenerazione tipica della Malattia di Niemann Pick di tipo C**

Nella malattia Niemann-Pick di tipo C (NPCD), la mutazione del gene NPC1 porta all'accumulo di colesterolo e sfingomielina negli endosomi. Questa caratteristica è associata con la presenza di grovigli neurofibrillari nel cervello, neurodegenerazione e deficit cognitivi. Sebbene i meccanismi molecolari che sottendono la neurodegenerazione in NPCD non siano tuttora stati chiariti nel dettaglio, la compromissione dei meccanismi di riparazione del DNA potrebbe giocare un ruolo importante. Deficit in questi meccanismi sono stati infatti ampiamente descritti in molte malattie neurodegenerative e associati a condizioni di stress ossidativo e alla presenza del peptide  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ). In particolare, A $\beta$  è noto indurre la produzione di ROS che, a loro volta, sono in grado di ossidare il DNA e accelerare i processi neurodegenerativi. Diverse evidenze sperimentali indicano lo stress ossidativo come un fattore importante nella patogenesi di NPCD e mostrano la presenza di accumuli di A $\beta$  nelle aree cerebrali di modelli sperimentali NPCD. L'obiettivo del presente progetto è quello di verificare la presenza di danno al DNA e di identificare le alterazioni dei meccanismi di riparazione del DNA nelle cellule neuronali NPCD e definirne il ruolo nella neurodegenerazione tipica della malattia.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- verifica della presenza di danno al DNA e sua caratterizzazione in diverse aree cerebrali (corteccia, ippocampo, cervelletto) di modelli animali NPC1<sup>-/-</sup>;
- identificazione di alterazioni nei meccanismi di riparazione del DNA nei neuroni NPC1<sup>-/-</sup>;
- identificazione delle componenti dei meccanismi di riparazione del DNA che risultano compromesse nei neuroni NPC1<sup>-/-</sup>.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti da questi studi consentiranno di chiarire il possibile contributo del danno al DNA e della compromissione dei meccanismi di riparazione del DNA nella morte neuronale che si osserva in NPCD, una malattia neurodegenerativa rara e letale che si manifesta nei bambini geneticamente predisposti nei primi anni di vita. La comprensione dei meccanismi molecolari alla base della patogenesi della malattia potrà fornire utili informazioni per il disegno di strategie terapeutiche volte a contrastarne i sintomi neurologici.

### **Studio del ruolo delle Drusen della retina, come marcatori patologici per la MA: un approccio multidisciplinare**

La MA è la causa più frequente di demenza neurodegenerativa nell'età adulta. I cambiamenti neuropatologici caratteristici possono avvenire molti anni prima della manifestazione clinica della patologia; tuttavia, la diagnosi clinica di MA probabile, è ancora basata su criteri diagnostici standard che non prendono in considerazione la lunga fase preclinica. Risultati sperimentali recenti hanno evidenziato le notevoli similitudini tra gli eventi neurodegenerativi che avvengono nell'SNC nel corso della MA e la retina quali la presenza comune di depositi di sostanza amiloide (detti corpi colloidali o drusen), la perdita delle cellule neurali e la risposta infiammatoria. L'aspetto fondamentale di tali ricerche, tuttavia, riguarda la caratteristica degli eventi neurodegenerativi riscontrati nella retina in grado, almeno nei modelli animali, di anticipare il declino cognitivo nel tempo. Se tale manifestazione precoce potesse essere dimostrata anche nella pratica clinica, l'accessibilità della retina, resa possibile da metodiche di diagnosi non invasive, permetterebbe finalmente di acquisire marcatori predittivi della demenza. Lo studio multidisciplinare proposto da questo progetto prevede la collaborazione di unità cliniche sia neurologiche che oculistiche congiuntamente ad unità di ricerca di base, allo scopo di aumentare la comprensione della patogenesi della MA, e incrementare le possibilità di una sua diagnosi precoce nella fase preclinica.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Lo scopo del progetto riguarda il chiarimento di alcuni aspetti molecolari che legano la MA e la patologia visiva. Se tale associazione esiste, sarà possibile considerare la retina come una finestra accessibile per il sistema nervoso centrale, rendendo disponibili nuovi biomarcatori per la neurodegenerazione basati sulla variazione morfometrica delle drusen. Inoltre, l'investigazione dei meccanismi della amiloidosi retinica potrebbe favorire nel cervello l'individuazione di meccanismi molecolari omologhi, legati alla metilazione di particolari geni e/o alla presenza di miRNA regolatori. Infine, la possibilità garantita dall'accessibilità della retina, consentita dalle moderne metodologie di diagnostica per immagini, potrebbe consentire la valutazione degli effetti delle terapie farmacologiche o meno convenzionali sul decorso della malattia.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'argomento delle demenze sta assumendo rilevanza in termini di salute pubblica per le dimensioni del problema e per l'impatto sull'SSN. In Italia si stima che i casi di demenza siano circa 1.000.000 di cui il 50-60% affetti da MA. Le cause molecolari della forma sporadiche restano sconosciute e la MA può essere diagnosticata solo con un esame autoptico. I nostri risultati, quindi, potrebbero produrre notevoli implicazioni per la diagnosi e la cura della MA. Se l'uso delle analisi retiniche come bio-marcatori per lo studio dell'SNC sarà dimostrato efficace, si potranno analizzare i meccanismi patologici della demenza in un organo facilmente accessibile. L'identificazione di marcatori retinici per la MA potrebbe, inoltre, consentire di valutare l'effetto di nuovi farmaci e terapie. Se i dati raccolti dal progetto confermeranno l'ipotesi iniziale, essi incrementeranno l'efficacia dei trattamenti medici, l'uso adeguato delle risorse e la razionalizzazione dei costi per l'SSN.

### **Studio del ruolo delle infezioni da *Herpes Simplex Virus-1* nella compromissione dei meccanismi di riparo del DNA associata alla MA**

Le alterazioni dei meccanismi di riparazione del DNA sono state documentate in diverse patologie neurodegenerative inclusa la MA, suggerendo che l'accumulo di danno al DNA possa rappresentare un comune denominatore. Il principale meccanismo attraverso il quale i

neuroni riparano i *Double-Strand Break* (DSB), il più letale tra i danni al DNA, è rappresentato dalla riparazione per ricombinazione non omologa (*Non-Homologous End-Joining*, NHEJ), che è mediata dal complesso della DNA-PK. Diverse evidenze sperimentali suggeriscono che il virus *Herpes Simplex* di tipo 1 (HSV-1) è in grado di inattivare i componenti della NHEJ inclusa la DNA-PKcs. Inoltre, diversi studi suggeriscono che le infezioni da HSV-1 possono costituire un fattore di rischio per lo sviluppo di MA, contribuendo alla induzione di fenomeni neurodegenerativi.

Sulla base di queste evidenze, è possibile ipotizzare che l'infezione da HSV-1 danneggi i neuroni anche attraverso la compromissione della NHEJ e, più in generale, attraverso l'alterazione dei meccanismi di riparazione del DNA, con conseguente accumulo di danno al DNA che a sua volta contribuirebbe al processo neurodegenerativo. Nel presente progetto ci focalizzeremo pertanto sulle eventuali variazioni nella cinetica di riparo mediante NHEJ indotte dall'infezione erpetica in colture primarie neuronali, sui meccanismi attraverso i quali il virus modula l'espressione delle proteine che mediano la NHEJ e sull'identificazione di eventuali altri tipi di danno al DNA indotti dal virus.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Identificazione e caratterizzazione del danno al DNA indotto dalle infezioni da HSV-1
- Caratterizzazione della capacità di riparazione del DNA dei neuroni infettati da HSV-1 in condizioni basali e/o in presenza di agenti genotossici.
- Identificazione delle componenti dei meccanismi di riparazione del DNA che risultano compromesse nei neuroni infettati da HSV-1.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati di questo studio permetteranno di definire l'HSV-1 come fattore di rischio per lo sviluppo di malattie neurodegenerative tipiche dell'età senile e di sviluppare nuove strategie terapeutiche o preventive basate su farmaci antivirali o vaccinazioni. Inoltre, il nostro studio potrebbe proporre l'introduzione di un trattamento immediato per le infezioni locali o sistemiche da HSV-1, al fine di evitare la riattivazione del virus e tutti gli eventi infiammatori ad essa associati.

### **Studio del Ruolo delle infezioni ricorrenti da *Herpes simplex virus-1* (HSV-1) nella genesi dei principali *marker* molecolari della MA**

Numerose evidenze epidemiologiche e sperimentali suggeriscono che l'esposizione cronica e persistente all'HSV-1 possa costituire un fattore di rischio per la MA, la principale causa di demenza nell'anziano. Tuttavia, i meccanismi virali e/o cellulari che sottendono il coinvolgimento diretto di HSV-1 nell'innescare di eventi correlati alla neurodegenerazione sono a tutt'oggi da identificare. Risultati ottenuti precedentemente in collaborazione con il gruppo di ricerca della Sapienza Università di Roma mostrano il coinvolgimento diretto di HSV-1 nel processo metabolico che porta al clivaggio della proteina precursore dell'APP e alla formazione di frammenti della proteina con un documentato potenziale neurotossico, tra i quali il peptide A $\beta$ , che, come noto, gioca un ruolo fondamentale nella patogenesi di MA. Tali risultati, ottenuti nell'arco di un unico ciclo di replicazione virale, suggeriscono che le infezioni ricorrenti da HSV-1 che avvengono durante la vita possano contribuire all'induzione dei fenomeni neurodegenerativi che si manifestano in età avanzata. Appare quindi di particolare interesse definire il ruolo di HSV-1 nella generazione dei principali marker biochimici e funzionali di MA, su modelli sperimentali di infezione ricorrenti *in vitro* (colture primarie di neuroni di ratto) e *in vivo* che possono mimare le condizioni di infezioni erpetiche ricorrenti tipiche dell'uomo.

### **Risultati attesi nel triennio**

Risultati attesi sono:

- messa a punto di un modello sperimentale *in vitro* di infezione ricorrente da HSV-1 in cellule neuronali (colture primarie di neuroni ippocampali e/o corticali di ratto; cellule di neuroblastoma umano differenziate);
- identificazione degli effetti di ripetute infezioni da HSV-1 sulla comparsa di alcuni *marker* di neurodegenerazione sui modelli sperimentali *in vitro*;
- messa a punto di un modello di infezione ricorrente da HSV-1 *in vivo* e analisi degli effetti della riattivazione virale nell'SNC.

### **Trasferibilità dei risultati**

La messa a punto di modelli sperimentali *in vitro* e/o *in vivo* di infezioni ricidivanti da HSV-1 permetterà di comprenderne il ruolo nella degenerazione neuronale tipica di MA, permettendo in tal modo di classificare l'infezione da HSV-1 come possibile fattore di rischio per lo sviluppo di malattie neurodegenerative tipiche dell'età senile. Lo studio potrebbe inoltre aprire la strada a nuovi interventi terapeutici e/o preventivi basati sull'uso di molecole ad attività antivirale per combattere la progressione della neurodegenerazione nei pazienti affetti da HSV-1.

### **Studio del virus di Epstein-Barr (EBV) e della risposta immunitaria nel liquor e nel sangue di pazienti con sclerosi multipla mediante tecniche di real-time PCR**

La SM è una malattia complessa alla quale contribuiscono sia fattori genetici che ambientali. Tra questi ultimi, l'EBV, un virus erpetico molto diffuso nella popolazione, è oggetto di crescente attenzione per un supposto diretto coinvolgimento nella SM. Per comprendere attraverso quali meccanismi (diretti o indiretti) l'EBV contribuisce alla SM è necessario caratterizzare lo stato dell'infezione virale nel liquor e nel sangue periferico dei pazienti, capire se esistono differenze nei due distretti, e verificare l'esistenza di possibili correlazioni tra infezione virale, risposta immunitaria, decorso clinico e attività di malattia. Il progetto, della durata di un anno, coinvolge l'ISS e i Dipartimenti di Scienze neurologiche dell'Ospedale S. Luigi Gonzaga di Orbassano e delle Università di Firenze e Cagliari. Campioni di liquor e di sangue periferico verranno prelevati, dopo consenso informato, da pazienti con SM seguiti nei rispettivi centri, e analizzati utilizzando tecniche di biologia molecolare altamente specifiche e sensibili che permettono di studiare contemporaneamente numerosi marcatori associati all'infezione virale e alla risposta immunitaria.

### **Risultati attesi nel triennio**

Si auspica che i risultati di questo studio possano costituire la base di partenza per studi prospettici mirati a correlare la presenza di marcatori dell'infezione da EBV con l'evoluzione della malattia e la risposta alla terapia.

### **Trasferibilità dei risultati**

Una migliore comprensione del ruolo dell'EBV nella SM avrebbe ricadute importanti in ambito terapeutico e consentirebbe l'identificazione di fattori di rischio e di strategie preventive che potrebbero ridurre gli elevati costi diretti e indiretti di questa malattia.

### **Studio multicentrico sui disturbi ticcosi in età pediatrica (EMTICS)**

I disturbi ticcosi sono malattie neuropsichiatriche, a esordio infantile, caratterizzate dalla presenza di movimenti ripetitivi, improvvisi, rapidi, ricorrenti e non-ritmici (tic motori) e/o dalla presenza di tic verbali o vocali. La sindrome di Tourette (*Tourette Syndrome*, TS, il

disturbo ticcoso maggiormente conosciuto con una prevalenza dello 0,4-1% nella popolazione pediatrica) è caratterizzata dalla presenza di molteplici tic motori e verbali per una durata di almeno un anno. Ai disturbi ticcosi sono generalmente associate alterazioni neurocomportamentali quali mancanza di attenzione, iperattività, impulsività e disturbi ossessivo-compulsivi. Sebbene al quadro clinico contribuiscano sia fattori genetici (non ancora inequivocabilmente identificati), sia fattori ambientali (infezione da streptococco ed esposizione a elevati livelli di stress psicosociale), le cause della malattia sono ancora scarsamente conosciute. L'infezione da streptococco produce una risposta immunitaria mediata da anticorpi diretti contro alcuni antigeni di superficie dello streptococco stesso. Si ipotizza che questi anticorpi aggravino il quadro clinico tramite una risposta autoimmune diretta contro porzioni specifiche del cervello. Elevati livelli di stress possono aggravare i sintomi legati a questo processo. Il progetto si propone di chiarire le cause principali della TS tramite uno studio traslazionale condotto da pediatri, genetisti, ricercatori di base, neuropsichiatri infantili, microbiologi e psicologi.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il presente progetto, finanziato nell'ambito delle attività del VII Programma Quadro "HEALTH.2011.2.2.1-3: Addictive and/or compulsive behaviour in children and adolescents (such as obsessive-compulsive disorders and tic disorders): translating pre-clinical results into therapies", si propone di:

- comprendere le cause multifattoriali (genetiche e ambientali) dell'insorgenza e dell'esacerbazione della TS e dei disturbi ticcosi;
- trasferire le conoscenze acquisite tramite la ricerca di base alla pratica clinica;
- costituire un'infrastruttura europea per lo studio della TS e dei disturbi ossessivo-compulsivi;
- diffondere le conoscenze acquisite nell'ambito delle attività del progetto alla comunità scientifica e, in un'ottica di *governance* a livello europeo, alla società in generale (con un'attenzione particolare rivolta a pazienti, familiari e associazioni di malati).

#### **Trasferibilità dei risultati**

Alla luce delle scarse conoscenze in ambito TS, le informazioni ottenute nel corso di questo progetto europeo hanno un impatto potenziale di grande rilevanza, in ambito sia clinico-terapeutico sia di conoscenze riguardanti lo sviluppo fisiologico dell'individuo. La possibilità di analizzare, in un unico studio con durata prevista di cinque anni, soggetti sani e soggetti malati, fornirà informazioni normative sullo sviluppo tipico dei bambini. Dal punto di vista clinico-terapeutico, la natura cross-nazionale del progetto, cui partecipano esperti di diverse discipline provenienti da 17 Nazioni europee, garantirà il trasferimento capillare delle conoscenze scientifiche acquisite alla pratica clinica. Il progetto, inoltre, sarà in grado di fornire indicazioni generali non limitate alla TS: in particolare, le informazioni ottenute riguarderanno anche patologie, diverse alla TS, che con essa condividono alcuni fattori causativi quali disturbi ossessivo-compulsivi e dell'attenzione.

#### **Studio neuropatologico e molecolare mirato a comprendere la relazione tra processo infiammatorio nelle meningi e danno cerebrale corticale nella SM**

Nonostante sia oggi largamente accettato che la SM è una malattia che non coinvolge solo la sostanza bianca del sistema nervoso centrale e che alterazioni della sostanza grigia corticale hanno un ruolo fondamentale nella progressione della SM, con particolare impatto sulla disabilità fisica, cognitiva ed emozionale dei pazienti, i meccanismi coinvolti nella genesi delle lesioni corticali nella SM rimangono largamente sconosciuti. Nei nostri studi precedenti abbiamo dimostrato l'esistenza di una forte associazione tra presenza di

infiammazione accompagnata da neogenesi linfoide nelle meningi, entità del danno nell'adiacente sostanza grigia e gravità del decorso clinico della SM. L'obiettivo di questo progetto è di contribuire alla comprensione dei meccanismi che sottendono alla patologia corticale nella SM e all'identificazione di biomarcatori di progressione della malattia attraverso una approfondita analisi neuropatologica e molecolare delle meningi e della sostanza grigia corticale da cervelli autoptici di casi con SM e controlli sani.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Identificazione di *pathway* infiammatori e citotossici responsabili della patologia corticale e dell'accumulo di deficit neurologici nella SM.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Una migliore comprensione dei meccanismi patologici che sottendono al danno corticale nella SM potrebbe consentire di individuare biomarcatori diagnostici utili per l'identificazione di particolari sottogruppi di pazienti da sottoporre a specifiche terapie al fine di prevenire e/o rallentare il decorso progressivo della SM.

### **Sviluppo di innovative strategie immunoterapeutiche per la MA utilizzando gli anticorpi intracellulari**

Nella patogenesi della MA l'accumulo intraneuronale di forme oligomeriche del peptide A $\beta$  costituisce l'evento principale del processo di sinaptotossicità che precede la formazione delle placche extracellulari e che correla con la comparsa di deficit cognitivi. Di conseguenza, gli oligomeri intracellulari di A $\beta$  rappresentano importanti bersagli terapeutici per contrastare la MA. Negli ultimi anni l'immunoterapia ha dato risultati promettenti focalizzandosi sulla neutralizzazione/solubilizzazione delle fibrille extracellulari di A $\beta$  mediante anticorpi intracellulari. La tecnologia degli anticorpi intracellulari si basa sulla capacità di forme anticorpali ricombinanti di riconoscere, in maniera specifica, diverse conformazioni proteiche incluse gli oligomeri. Questa caratteristica permette di modulare la funzione di differenti target molecolari nei diversi compartimenti subcellulari. Gli anticorpi intracellulari sono stati applicati con successo su diverse patologie neurodegenerative incluse le malattie da prioni, l'Huntington e il PD. L'obiettivo principale di questo progetto è lo sviluppo di nuove strategie immunoterapeutiche dirette contro le forme oligomeriche del peptide A $\beta$  1-42 utilizzando l'approccio degli anticorpi intracellulari. In particolare, verranno ingegnerizzati anticorpi intracellulari anti-A $\beta$  oligomero indirizzandoli specificamente verso i siti di generazione e aggregazione del peptide A $\beta$ .

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Sviluppo di un nuovo approccio immunoterapeutico contro gli oligomeri di A $\beta$ , attraverso l'espressione di anticorpi intracellulari contro le forme oligomeriche di A $\beta$  1-42 e diretti verso i compartimenti sinaptici.
- Identificazione dei siti intracellulari dove si generano gli oligomeri di A $\beta$  1-42.
- Definizione della relazione tra i *pool* intracellulari ed extracellulari di A $\beta$  1-42 oligomero.
- Definizione del ruolo patologico degli oligomeri di A $\beta$  1-42 nei compartimenti sinaptici e identificazione dei meccanismi molecolari che mediano la sinaptotossicità.
- Valutazione della capacità degli anticorpi intracellulari sviluppati di legare le forme oligomeriche di A $\beta$  1-42 *in vivo*, utilizzando modelli sperimentali di MA, e degli effetti che tale legame ha sul metabolismo e sul traffico degli oligomeri di A $\beta$  1-42.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati di questi studi permetteranno di sviluppare nuove strategie immunoterapeutiche per la cura di MA, che rappresenta la principale causa di demenza negli anziani. La generazione di forme anticorpali ricombinanti in grado di riconoscere specificamente gli oligomeri più neurotossici di A $\beta$  e la possibilità di ingegnerizzare tali anticorpi con specifici segnali di localizzazione intracellulare consentirà di sviluppare una nuova piattaforma terapeutica per combattere la malattia. Inoltre, l'uso degli anticorpi sviluppati in questo progetto in modelli sperimentali di MA consentirà di caratterizzare in dettaglio la neurotossicità e in particolare la sinaptotossicità degli oligomeri di A $\beta$  1-42.

### **Un approccio multidisciplinare per lo studio dell'interazione funzionale tra geni coinvolti nella MA, bilancio redox intracellulare, regolazione del calcio e apoptosi**

La formazione di aggregati proteici e la perdita progressiva di specifiche popolazioni neuronali rappresentano i tratti salienti nello sviluppo e nella progressione della MA, anche se la sua eziopatogenesi non è stata ancora chiarita. Questo rende conto del fatto che ad oggi, in tale ambito, non esistono valide strategie terapeutiche. La recente letteratura suggerisce che le preseniline 1 e 2 (PS1 e PS2) svolgono un ruolo importante nella modulazione del danno neuronale, attraverso l'instaurarsi di interazioni molecolari con le vie di regolazione del calcio, del metabolismo ossido riduttivo e dell'apoptosi. Questo progetto, si propone di approfondire alcuni aspetti legati a tali interazioni, utilizzando come modello sperimentale linee cellulari stabilizzate umane e linee primarie murine ottenute da animali transgenici con mutazione del gene PS1 (TgPS1 $\Delta$ 9). In particolare verranno studiate:

- la relazione tra il *timing* del danno cellulare indotto sperimentalmente e il profilo di espressione di un gruppo di geni coinvolto nella MA, con particolare riferimento alle preseniline;
- le caratteristiche morfologiche e biochimiche della patologia subcellulare legata alla morte cellulare;
- la possibilità di interferire su tali eventi attraverso l'uso di agenti chimici e/o biologici di sintesi e/o naturali, nonché attraverso tecniche di silenziamento genico.

### **Risultati attesi nel triennio**

Le tematiche del progetto verranno affrontate mediante un approccio multidisciplinare, attraverso l'adozione di metodiche di biologia molecolare (espressione e silenziamento genico), biochimica (*western blot*, dosaggi enzimatici), immunocitochimica e immunoenzimatica (ELISA test). Attraverso l'uso di appropriati modelli *in vitro*, si potranno ottenere migliori e approfondite conoscenze delle alterazioni cellulari e molecolari innescate da stimoli di carattere neurodegenerativo. In particolare saranno esaminati i *pathway* correlati ai processi di morte cellulare programmata, con particolare riferimento al metabolismo ossido riduttivo intracellulare e alle vie del calcio. Allo stesso tempo, l'uso di sostanze esogene specifiche consentirà una valutazione della possibile rilevanza terapeutica di trattamenti potenzialmente interferenti e/o protettivi, in relazione alle diverse vie metabolicamente interessate (stress ossidativo, apoptosi, vie del calcio). Lo scopo che ci si propone sarà di identificare idonee strategie farmacologiche atte ad interferire con la morte neuronale. Infine, in una fase successiva, attraverso l'uso di animali transgenici, sarà possibile la verifica dell'efficacia terapeutica dei trattamenti proposti sui deficit cognitivi e sull'apprendimento.

### **Trasferibilità dei risultati**

Lo studio tramite modelli cellulari e animali dei meccanismi alla base dello sviluppo delle patologie neurodegenerative si inserisce in un importante settore delle ricerche finalizzate alla comprensione delle cause di patologie come la MA. In tale contesto, questo progetto si propone di ampliare e aggiornare le conoscenze che sono alla base dei meccanismi di morte neuronale programmata che accompagna i processi di neurodegenerazione, e in particolare la MA. L'obiettivo fondamentale sarà quello di sviluppare modelli cellulari e animali adeguati, il più fedelmente rappresentativi del modello di neurodegenerazione della MA. La validazione e il trasferimento di tali modelli sul piano della ricerca preclinica rappresenterebbe un ulteriore e importante passo in avanti per la formulazione e la messa in opera di efficaci trattamenti terapeutici per questa e altre patologie neurodegenerative.

### **Un nuovo modello murino per lo studio dell'Alzheimer: caratterizzazione cognitiva, funzionale e morfologica di un topo(C.B6/J-APPswe) derivato dal topo tg2576**

L'Alzheimer è la malattia neurodegenerativa più diffusa nella popolazione anziana. Alcuni dei sintomi che la caratterizzano sono l'incapacità di acquisire nuove memorie e la difficoltà di ricordare eventi recenti. Negli ultimi anni è stato sviluppato un nuovo modello di topo congenito (C.B6/J-APPswe) mediante l'introduzione del gene APPswe su background genetico Balb-c. I topi del ceppo Balb-c sono stati scelti in quanto caratterizzati da elevata capacità riproduttiva e ridotta aggressività.

### **Risultati attesi nel triennio**

L'utilità di un modello animale di Alzheimer risiede nella capacità di riprodurre quei processi che sono alla base dello sviluppo della malattia, manifestando a livello fenotipico le caratteristiche della malattia osservate nell'uomo. Ad oggi, nessun modello è in grado di riprodurre tutte le caratteristiche della patologia. L'obiettivo di tale studio è pertanto la caratterizzazione del profilo cognitivo, funzionale e morfologico del topo C.B6/J-APPswe.

### **Trasferibilità dei risultati**

La caratterizzazione del topo C.B6/J-APPswe rappresenterà un passo in avanti nello studio dell'Alzheimer. La maggiore sopravvivenza di questi animali consentirà lo studio delle fasi avanzate della malattia. Le caratteristiche immunologiche del background genetico Balb-c faciliteranno l'uso di tecniche innovative e di nuove strategie di vaccinazione.

### **Valutazione del rischio ambientale e genetico nell'eziologia dell'Autismo: un Network Italiano (E-GRAIN)**

Studi recenti hanno analizzato diversi fattori genetici, immunologici, neurochimici per comprendere l'eziologia degli ASD. La maggior parte dei casi ASD è attribuita ad un alterato processo fisiopatologico derivante dall'interazione di un insulto iniziale ambientale con una predisposizione genetica. E-GRAIN intende affrontare il ruolo dei fattori ambientali nell'eziologia dell'autismo tramite una strategia interdisciplinare focalizzata su alcuni contaminanti, e che combini studi epidemiologici prospettici con lo screening di diagnosi precoce, fattori genetici, valutazione di esposizione esterna e interna, e studi preclinici e tossicologici su modelli animali. La valutazione dell'esposizione prevede azioni di monitoraggio ambientale, l'integrazione di dati esistenti provenienti da sistemi di monitoraggio per i livelli di inquinanti in Toscana e Sicilia, la raccolta di informazioni socio-demografiche e di salute da genitori di bambini autistici, e la quantificazione di biomarcatori di esposizione nel sangue, urine, saliva e campioni di capelli nei bambini con autismo e delle loro famiglie. Gli studi *in vivo* saranno eseguiti in modelli murini genetici per valutare gli

effetti neurocomportamentali di esposizioni chimiche (singoli composti o la loro miscela) individuate nella prima fase del progetto, per valutare ipotesi meccanicistiche e identificare nuovi biomarcatori di effetti che saranno poi utilizzati negli studi clinici.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto prevede la costituzione di un network italiano che metta a punto una strategia interdisciplinare per l'identificazione di cause genetiche e/o ambientali nell'eziologia dell'autismo. Tutto questo condurrà all'implementazione di eventuali strategie di prevenzione primaria.

### **Valutazione del rischio di trasmettere la malattia di Creutzfeldt-Jakob attraverso trasfusioni di sangue: Sorveglianza epidemiologica in medicina trasfusionale**

La malattia di Creutzfeldt-Jakob (*Creutzfeldt-Jakob Disease*, CJD) sporadica è una rara malattia del sistema nervoso centrale che colpisce entrambi i sessi a tutte le età, ma con aumentata incidenza nei soggetti al di sopra dei 60 anni ed è presente in tutto il territorio nazionale con una distribuzione abbastanza uniforme nelle diverse regioni senza apparenti *cluster* spazio-temporali. Nonostante la CJD sporadica sia una malattia trasmissibile causata da un agente infettivo molto atipico (prione) in grado di resistere alle comuni pratiche di decontaminazione utilizzate nella routine medico-chirurgica, gli eventi legati a trasmissione interumana rimangono estremamente rare (CJD iatrogene). Studi caso-controllo eseguiti in Europa (con dati anche italiani), Australia, Giappone e Stati Uniti sono stati poco informativi nell'identificare fattori di rischio responsabili della malattia, probabilmente perché la metodologia fino ad oggi seguita non permette di identificare eventi occorsi più di dieci anni prima dell'inizio clinico di malattia e perché è difficile ottenere dati epidemiologici relativi alle abitudini di vita direttamente dai pazienti con gravi disturbi comportamentali (*recall bias*). In questo progetto proponiamo il primo studio di sorveglianza epidemiologica in medicina trasfusionale in Italia per verificare la possibilità o meno di trasmissione della CJD sporadica attraverso il sangue.

#### **Risultati attesi nel triennio**

L'identificazione di casi di trasmissione di CJD sporadica attraverso le trasfusioni avrebbe importanti implicazioni in sanità pubblica. I risultati di questo studio potrebbero determinare l'introduzione di nuove misure di sicurezza e linee guide regolatorie mirate alla prevenzione dell'infezione interumana. Ciò è particolarmente importante perché:

- non esistono test di screening del sangue in grado di individuare soggetti infetti ma ancora clinicamente sani;
- non esistono terapie per la CJD;
- l'unica misura per ridurre il rischio di trasmissione della CJD via sangue è quello di escludere i donatori che abbiano avuti casi di CJD in famiglia o coloro che siano stati esposti a fattori iatrogeni noti, quali trapianto di dura mater e terapia con ormoni ipofisari di natura estrattiva.

Inoltre, questo studio potrebbe individuare sul territorio nazionale eventuali trasmissioni della CJD variante attraverso il sangue. Un ulteriore importante risultato del progetto sarà anche la verifica del tasso di risposta delle strutture trasfusionali. Questo permetterà di avere una stima della capacità del sistema trasfusionale di rispondere ad una emergenza infettiva e potrà dare indicazioni su eventuali implementazioni da apportare.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati di questo studio potrebbero determinare l'introduzione di nuove misure di sicurezza e linee guide regolatorie mirate alla prevenzione dell'infezione interumana. Al

CNS è affidato il coordinamento del network nazionale delle strutture trasfusionali in accordo col suo ruolo istituzionale di elaborazione di pareri tecnici e scientifici, redazione di linee guida e promozione della ricerca in medicina trasfusionale.

### **Valutazione della qualità della vita legata alla salute (HRQoL) nei pazienti con sindrome di Turner o di Prader Willi in trattamento con ormone somatotropo**

La qualità della vita legata alla salute (*Health Related Quality of Life*, HRQoL), definita come percezione dello stato di salute da parte del sistema paziente-persona, è un parametro che ha finalmente acquisito un ruolo nella valutazione degli interventi medici e, quindi, una sua corretta misurazione mediante strumenti validati scientificamente è divenuta un elemento cruciale in numerosi trial clinici e nell'assistenza sanitaria. A tal fine sono attualmente disponibili questionari generici o specifici per malattia, sviluppati per le più diffuse aree di patologie, soprattutto nell'ambito della cronicità. In questo settore, assumono particolare rilevanza le patologie dell'età evolutiva e quelle in cui è attuata una terapia palliativa o comunque non eziologica.

Questa linea di ricerca intende affrontare il tema della HRQoL in soggetti affetti da sindrome di Prader Willi o di Turner, in cui viene somministrata terapia a base di ormone della crescita (*Growth Hormone*, GH), nonostante non vi sia deficit di GH, con il solo scopo di migliorare, senza riuscire a normalizzare, i parametri auxologici. Lo studio della HRQoL verrà effettuato mediante la somministrazione di un questionario specifico, in base a età o condizione morbosa, a soggetti trattati e non trattati oppure ai loro familiari e i risultati saranno analizzati con pacchetti statistici adeguati.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Questa linea di ricerca si basa sul reclutamento di soggetti affetti da patologie genetiche rare, sindrome di Prader Willi o di Turner e prevede di confrontare soggetti trattati con GH, reclutati in base alle segnalazioni al Registro Nazionale degli Assuntori dell'Ormone della Crescita (RNAOC) e soggetti non trattati (selezionati da centri specialistici che collaborano allo studio). Ai pazienti selezionati verrà somministrato, a tempi variabili dall'inizio della terapia, il questionario generico di HRQoL, per la valutazione del benessere fisico e psicologico, e un questionario specifico, selezionato in base all'obiettivo del singolo studio. La scelta dei questionari è, infatti, particolarmente importante nella valutazione della QoL di malattie complesse, con molteplici condizioni associate e andamento cronico e deve tener conto dell'età del soggetto.

I risultati di questo studio forniranno dati utili relativi all'impatto della terapia con GH sugli aspetti soggettivi e relazionali della vita dei pazienti trattati. Questo parametro ha una particolare rilevanza nelle decisioni terapeutiche, trattandosi di una terapia non eziologica, che, quindi, non modifica sostanzialmente la storia naturale della malattia e che, peraltro, prevede la somministrazione per via percutanea e per un periodo piuttosto lungo (anche anni) in età pediatrica.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La HRQoL è un aspetto di grande utilità in alcune aree di patologia, ma spesso sottostimato e di difficile valutazione, da cui la necessità di disporre di strumenti scientificamente adeguati.

I risultati di questo studio possono fornire informazioni sulla HRQoL di pazienti nei quali viene utilizzata la terapia con GH come trattamento della scarsa crescita staturale, che è noto condizionare la normale vita di relazione. L'adozione di questa terapia deve, quindi, tener conto dell'impatto globale sia sul paziente, essendo una terapia adottata in età evolutiva, per

anni e con somministrazione percutanea, che sul sistema sanitario, trattandosi di una terapia piuttosto costosa e a lungo termine.

Questo studio può, quindi, dare informazioni importanti sui parametri di salute globale di questi pazienti e fornire un modello di applicazione di un approccio scientifico adeguato per parametri spesso non adeguatamente considerati e misurati.

**Dipartimento**  
**Biologia cellulare e neuroscienze**

---

**Attività di controllo, valutazione, parere**



### **Attività di valutazione e produzione di pareri da parte del Gruppo di lavoro sulle encefalopatie spongiformi trasmissibili dell'ISS (GESTISS)**

Il Gruppo di Lavoro Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (GESTISS) presso l'ISS ha il compito di fornire pareri in materia di Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST). Il GESTISS riceve richieste di parere dall'AIFA, dalle ASL, dal Ministero della Salute e da altri Ministeri, oltre che dai vari Dipartimenti o Centri dell'ISS. Tutte le pratiche che richiedono un parere sulle EST vengono inviate con un'unica classificazione d'archivio al GESTISS che provvede tramite il proprio Coordinatore ad esprimere parere. In particolare, il gruppo è impegnato nelle seguenti attività, alcune delle quali tariffate sul tariffario ISS:

- valutazione delle autorizzazioni all'immissione in commercio (AIC) di prodotti medicinali per uso umano e veterinario contenenti materie prime di origine umana e animale;
- valutazione del rischio sangue e suoi derivati per l'uomo;
- risposte ad interrogazioni parlamentari;
- redazione pareri e scrittura linee guida;
- rilascio della certificazione CE (scrittura SER) per dispositivi medico impiantabili contenenti materie prime di origine animale o umana;
- visite ispettive ad impianti e siti di produzione di dispositivi medico-impianabili per i quali è richiesta la certificazione CE.

#### **Attività programmata**

L'attività GESTISS è andata incrementandosi nel 2009-2011. Si stima che il numero di pareri richiesti al GESTISS possa ulteriormente crescere nel prossimo triennio in considerazione dell'attualità e urgenza di problemi di sanità pubblica umana e veterinaria legati al rischio di trasmissione delle EST all'uomo e agli animali tramite: alimenti, farmaci, dispositivi medico-impianabili, sangue, plasma derivati, prodotti immunobiologici, procedure mediche invasive, trapianti e uso di cellule staminali. Si stima altresì che l'offerta di voci specifiche legate al rischio EST sul tariffario ISS possa nel tempo rappresentare una non trascurabile risorsa per l'Istituto. Il GESTISS provvederà ad evadere le seguenti pratiche relative al rischio EST: i) pareri per procedure nazionali e centralizzate relative al rilascio AIC di specialità medicinali e vaccinali; ii) pareri per la valutazione della bio-sicurezza del sangue e suoi derivati; iii) pareri per il rischio trapianti/cellule staminali; iv) pareri richiesti da Ministeri, Regioni, ASL; v) pareri per rilascio certificazioni CE per dispositivi medico-impianabili; vi) rilascio certificazioni del rischio EST di farmaci; vii) interrogazioni parlamentari; viii) redazione linee-guida; ix) visite ispettive.

### **Coordinamento dell'Osservatorio Nazionale per il Monitoraggio della Iodoprofilassi in Italia (OSNAMI)**

La legge n. 55 del 21/3/2005 "Disposizioni finalizzate alla prevenzione del gozzo endemico e di altre patologie da carenza iodica" mette a disposizione, a livello nazionale, un importante strumento legislativo volto a ridurre la frequenza dei disordini derivanti dalla carenza di iodio. La normativa prevede una serie di misure volte a promuovere il consumo di sale arricchito su tutto il territorio nazionale, quali la presenza obbligatoria di sale iodato nei punti vendita, la fornitura del sale comune soltanto su specifica richiesta dei consumatori, l'uso di sale iodato nella ristorazione collettiva e la possibilità di utilizzazione nella preparazione e nella conservazione dei prodotti alimentari. Successivamente alla emanazione della legge e in virtù dell'Intesa Stato-Regioni del 26 febbraio 2009, è stato istituito, presso l'ISS, l'OSNAMI che ha il compito di coordinare attività finalizzate alla verifica periodica dell'efficienza e dell'efficacia della iodoprofilassi e al monitoraggio di eventuali effetti

avversi conseguenti all'uso generalizzato di sale arricchito di iodio nella popolazione. In particolare, l'efficienza della iodoprofilassi, ovvero la capacità di quest'ultima di raggiungere la popolazione e quindi di migliorarne l'apporto iodico, viene valutata attraverso l'analisi dei così detti "indicatori di processo" (consumo annuale di sale iodato, contenuto di iodio nelle confezioni immesse sul mercato, determinazione della ioduria in campioni di bambini in età scolare rappresentativi della popolazione generale). Diversamente, l'efficacia della iodoprofilassi, ovvero la capacità di quest'ultima di produrre un effetto positivo sulla popolazione in termini di riduzione di alcune patologie, viene valutata attraverso l'analisi di specifici marcatori biologici, quale l'ormone tireostimolante (*Thyroid-Stimulating Hormone*, TSH) neonatale che rappresenta un indicatore molto sensibile alla carenza nutrizionale di iodio e che, grazie allo screening neonatale di massa per l'ipotiroidismo congenito, viene determinato in tutti i neonati italiani. L'efficacia della iodoprofilassi viene anche valutata verificando l'attesa riduzione di alcune patologie da carenza iodica quali il gozzo, attraverso la realizzazione di specifiche indagini epidemiologiche sul territorio, e di alcune forme di ipotiroidismo congenito grazie al contributo fornito dal Registro Nazionale degli Ipotiroidei Congeniti. Viene infine monitorata la frequenza dei nuovi casi di ipertiroidismo, quale possibile e transitorio effetto avverso della iodoprofilassi. È prevista, inoltre, un'attività di sostegno alla campagna di informazione sull'uso di sale arricchito di iodio presso la popolazione.

#### **Attività programmata**

Si prevede di estendere le attività di monitoraggio sull'intero territorio nazionale. Verrà effettuata:

- la verifica dell'efficienza della iodoprofilassi attraverso: i) il monitoraggio dei dati di consumo di sale iodato effettuato in collaborazione con i più importanti produttori/distributori di sale del Paese, ii) l'analisi del contenuto di iodio nelle confezioni immesse sul mercato, iii) la determinazione della concentrazione dello iodio urinario in campioni rappresentativi di popolazione in età scolare;
- la verifica dell'efficacia della iodoprofilassi attraverso: i) l'analisi della frequenza di gozzo in soggetti in età scolare reclutati per la determinazione della ioduria, ii) l'analisi dei valori di TSH neonatale, rilevati alla nascita dai 25 Centri di screening attivi sul territorio nazionale, iii) il monitoraggio dell'incidenza di ipotiroidismo congenito sulla base dei dati del Registro Nazionale degli Ipotiroidei Congeniti;
- la verifica di eventuali effetti avversi della iodoprofilassi attraverso l'analisi dei dati relativi al consumo in Italia dei farmaci anti-tiroidei, in collaborazione con l'Osservatorio Medicinali coordinato dall'ISS;
- il sostegno alla campagna d'informazione sull'utilizzo di sale iodato attraverso: i) la realizzazione di materiale informativo per il cittadino da distribuire presso i medici generalisti, le scuole e le mense aziendali; ii) l'aggiornamento sul portale dell'ISS del sito web dell'OSNAMI.

#### **Coordinamento Registro Nazionale degli Assuntori dell'Ormone della Crescita**

Il Registro Nazionale degli Assuntori dell'Ormone della Crescita (RNAOC) raccoglie le segnalazioni di trattamento con ormone somatotropo in base ad una normativa che, nella sua versione attuale (GU n. 270 dell'8/11/2010) alla nota 39, indica le limitazioni di prescrivibilità, i criteri diagnostici e le avvertenze alla prescrizione della terapia con ormone della crescita, e ribadisce l'incarico all'ISS della sorveglianza epidemiologica nazionale mediante un registro informatizzato, cui abbiano accesso i centri clinici e gli organismi di controllo regionali. A tale scopo, è stato creato un Gruppo di Lavoro dell'RNAOC, in

collaborazione con un gruppo di esperti clinici e dell'AIFA, che ha progettato una scheda web di segnalazione, strutturata in accordo con quanto previsto dalle note AIFA. La scheda è stata pubblicata su web e consente l'inserimento di dati anagrafici e clinici relativi a soggetti in trattamento con ormone della crescita da parte dei Centri prescrittori individuati dalle Regioni di appartenenza, mediante credenziali di accesso. L'informatizzazione delle segnalazioni ha lo scopo di consentire l'inserimento dei dati in maniera facilitata e guidata, consentire l'elaborazione dei dati immessi e la produzione di rapporti, sia da parte delle Regioni che da parte del Registro nazionale ed esercitare l'attività di controllo su adeguatezza e sicurezza da parte dell'RNAOC.

#### **Attività programmata**

Le attività dell'RNAOC nel prossimo triennio saranno indirizzate al completamento degli accessi alla scheda web di segnalazione da parte dei centri autorizzati dalle Regioni. Saranno inoltre messi in atto i sistemi di connessione con le Regioni che possiedono già strutture di segnalazione indipendenti, al fine di ottenere la copertura di tutto il territorio nazionale. Il database completo verrà utilizzato sia a fini di controllo dell'appropriatezza e degli eventuali abusi, che allo scopo di valutazioni di efficacia e sicurezza. L'RNAOC implementerà il collegamento con le Regioni attraverso un referente specifico e, laddove istituita, con la Commissione regionale GH, allo scopo di stabilire un flusso bidirezionale di informazioni sulla farmacovigilanza di questa terapia. Inoltre si manterrà l'appuntamento annuale con il convegno e si effettueranno corsi specifici sulla scheda web. Nel prossimo triennio verrà concluso un progetto di ricerca europeo (SAGhE) che si pone l'obiettivo di valutare sicurezza e appropriatezza del trattamento con GH in terapie a lungo termine, in cui partecipa anche l'RNAOC con le segnalazioni raccolte negli anni di comunicazioni cartacee. La disponibilità di un database adeguato consentirà di partecipare a nuovi studi nazionali e internazionali.

### **Coordinamento Registro Nazionale degli Ipotiroidei Congeniti**

Dalla seconda metà degli anni '90 la totalità dei nati in Italia viene sottoposta per legge (Legge n. 104 del 5/2/1992) a screening neonatale per l'ipotiroidismo congenito (IC), grazie all'attività di 25 Centri di screening accreditati per la diagnosi precoce dell'IC, regionali o interregionali, dislocati su tutto il territorio nazionale. L'attuazione di questo programma di prevenzione ha comportato uno stretto collegamento tra reparti neonatali, centri di screening e strutture di riferimento per la cura e il follow-up dei bambini con IC. Ciò ha determinato la necessità di realizzare un coordinamento nazionale dello screening tiroideo e delle altre attività connesse a tale patologia attraverso l'istituzione del Registro Nazionale degli Ipotiroidei Congeniti (RNIC). Questo è stato istituito nel 1987 con l'adesione di tutti i Centri di screening e delle strutture deputate alla cura e al follow-up dei bambini con ipotiroidismo che operano nel nostro Paese. Come previsto dal DPCM del 9/7/1999 il coordinamento del Registro è affidato all'ISS. L'RNIC è una struttura epidemiologica che realizza la continua e completa raccolta, registrazione, conservazione ed elaborazione di dati relativi ai bambini affetti da IC identificati su tutto il territorio nazionale. Gli obiettivi di questo Registro sono: i) la valutazione dell'efficienza del programma di screening; ii) la valutazione dell'incidenza della patologia e di eventuali fluttuazioni spazio-temporali di quest'ultima; iii) la promozione di studi multicentrici di tipo eziologico.

#### **Attività programmata**

Le attività di controllo relative al coordinamento dell'RNIC riguarderanno la sorveglianza della patologia sull'intero territorio nazionale con particolare attenzione alla: i) valutazione dell'efficienza delle procedure di screening su tutto il territorio nazionale, al fine di

verificare eventuali differenze geografiche in termini di organizzazione e funzionamento; ii) valutazione dell'efficacia delle azioni di prevenzione intraprese e delle scelte sanitarie effettuate per la prevenzione delle sequele neurocognitive della patologia; iii) analisi delle fluttuazioni spazio-temporali dell'incidenza della patologia. Infine, sul sito web del Registro (<http://www.iss.it/rnic/>) saranno riportati gli aggiornamenti sulle attività di sorveglianza sotto forma di dati aggregati a livello nazionale e disaggregati per Regione e verranno riportati gli appuntamenti, riunioni e convegno annuale.

### **Procedure e criteri per l'autorizzazione alla sperimentazione clinica di prodotti per terapia genica e per terapia cellulare**

Per quanto riguarda le attività nazionali si propone di migliorare il meccanismo procedurale, interno all'ISS, della valutazione dei dossier di richiesta di autorizzazione alla sperimentazione clinica, aggiornando le linee guida (emesse nel 1996), adottando una lista di esperti per ciascuna delle tre parti (qualità, sicurezza, efficacia), definendo con chiarezza i compiti valutativi, nominando un *rapporteur*, preparando uno schema di relazione per la valutazione dell'esperto che copra gli argomenti da valutare nel dossier. Si propone inoltre di migliorare il meccanismo di contatti con l'AIFA, per rendere più veloce e riproducibile la procedura di autorizzazione. Si propone infine di contribuire alla formazione dei ricercatori clinici impegnati in questa sperimentazione organizzando workshop e corsi di formazione aventi come tematica l'attività regolatoria in questo ambito.

Per quanto riguarda le attività internazionali si intende collaborare con l'EMA per una armonizzazione europea (ed eventualmente internazionale nella *International Conference on Harmonisation*, ICH) dei criteri di autorizzazione, in vista del recepimento della direttiva europea 2001/CE sulla sperimentazione clinica e del regolamento 1394/2007/EC sui prodotti medicinali per terapia avanzata. Si intende inoltre collaborare con lo *European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare* (EDQM) per la definizione di nuovi criteri di sicurezza per i prodotti a base di cellule sia in fase di rilascio che per i materiali utilizzati per la loro preparazione.

#### **Attività programmata**

Il Reparto di Terapia genica e cellulare è fortemente coinvolto in attività istituzionali sia nazionali sia internazionali che riguardano prevalentemente i prodotti medicinali per terapie avanzate (*Advanced Therapy Medicinal Product*, ATMP) definiti del Regolamento 1394/2007/EC. Tale attività viene esplicitata nei confronti dell'AIFA, del Consiglio Superiore di Sanità (CSS), della Farmacopea italiana e a livello internazionale presso l'EMA e l'EDQM. Le attività consistono sia di ispezioni ai centri di produzione di buone pratiche di fabbricazione (*Good Manufacturing Practice*, GMP) che di consulenza come esperti di sicurezza e qualità per l'autorizzazione delle sperimentazioni cliniche con prodotti ATMP.

Proiezione delle attività istituzionali nel triennio 2012-2014:

- partecipazione alla commissione per l'autorizzazione della sperimentazione di fase I-III; alle riunioni del CSS; alle attività sulla terapia genica e cellulare della Farmacopea europea (riunioni trimestrali);
- attività istituzionali come partecipazione a ispezioni GMP a officine produttrici;
- attività istituzionali come formazione (corsi residenziali).

### **Valutazione dei Progetti di ricerca per il rilascio dell'autorizzazione in deroga ai sensi degli art. 8-9 del DL.vo 116/92**

La stesura di pareri su progetti di ricerca proposti per la autorizzazione in deroga, secondo quanto previsto dal DL.vo 116/1992 sulla sperimentazione animale, impegna un certo

numero di ricercatori di questo Dipartimento (principalmente del Reparto di Neuroscienze comportamentali) in relazione alle loro specifiche conoscenze professionali. Questa è una attività istituzionale di crescente importanza, attribuita all'Istituto dal Ministero della Salute e coordinata dal Settore per la Sperimentazione Animale. L'attuale normativa, che è ispirata dal principio delle "3R" (*Replacement, Reduction, Refinement*) e che parte da un vincolo della preventiva ricerca di metodi alternativi validi e insieme da un divieto di principio dell'uso di animali, in molti casi ammette l'impiego di questi ultimi solo in deroga a tale principio. I criteri secondo i quali può essere accordata sono indicati chiaramente nella normativa. L'attività di valutazione è il risultato della ricerca di una modalità di analisi che verifichi rapidamente le credenziali scientifiche del proponente, la congruità del disegno sperimentale e della procedura proposta, le possibili ricadute applicative, la specie e il numero degli animali che si prevede di utilizzare, le condizioni di mantenimento di questi ultimi. Infatti, la normativa esige di collegare la valutazione etica a una valutazione scientifica del potenziale applicativo o propedeutico della sperimentazione proposta. In questo senso, l'applicazione di questa stessa è servita a confermare ulteriormente che aspetti bioetici in cui i ricercatori del Reparto svolgono attività a livello internazionale (UE, OECD, WHO, *International Brain Research Organization* – IBRO, NIH, ecc.) e verifica di rispetto delle buone prassi scientifiche in massima parte coincidono. Collegata all'attività di valutazione delle richieste di autorizzazione in deroga i ricercatori del Reparto di Neuroscienze comportamentali svolgono attività di formazione su questi temi indirizzata alla comunità biomedica nazionale.

#### **Attività programmata**

Il Reparto continuerà a prestare la propria *expertise* per ottemperare all'attività di valutazione delle richieste di autorizzazione in deroga alla sperimentazione animale. Applicando criteri perfezionati con l'esperienza acquisita nel corso degli anni, l'attività di revisione avrà i seguenti obiettivi: i) contribuire all'identificazione di indici comportamentali e fisiologici finalizzati alla valutazione del livello di benessere degli animali da sperimentazione; ii) incentivare lo scambio di informazioni e spunti sia teorici sia metodologici tra tre contesti principali, ovvero: animali da laboratorio, da reddito e da compagnia, attingendo all'esperienza etologica; iii) sviluppare l'analisi (basata sulla letteratura scientifica internazionale) sulle potenzialità delle terapie assistite con l'ausilio degli animali, compresi gli aspetti che riguardano la formazione di personale specializzato; iii) valutare la possibilità di coniugare aspetti bioetici generali con disegni e metodologie sperimentali secondo protocolli vincolanti. Per esempio, la stabulazione in ambienti arricchiti, requisito che risponde a un'esigenza etica, comporta alcuni vantaggi per la raccolta dei dati. Esiste, infatti, una fiorente letteratura, in particolare nell'ambito della biologia e neuroscienze del comportamento, che dimostra come soggetti mantenuti in ambienti fisicamente e socialmente stimolanti forniscano dati scientifici qualitativamente superiori.



**Dipartimento**  
**Ematologia, oncologia e medicina molecolare**

---

**Attività di ricerca**



### **Alterazioni emoreologiche e fenomeno del *no-reflow* nell'infarto acuto**

Una delle problematiche non risolte nelle sindromi coronariche acute è la possibilità della complicità del *no-reflow phenomenon*, un fenomeno che va ad inficiare i benefici previsti dalla rivascolarizzazione, che potrebbe essere ricondotto all'ostruzione del microcircolo, ma del quale non sono ancora chiari i meccanismi. Studi recenti hanno mostrato che la presenza di alti valori di ematocrito potevano essere considerati come un lieve ma significativo fattore di rischio nell'infarto del miocardio. Inoltre sono state osservate alterazioni di viscosità ematica nelle sindromi coronariche acute sia durante la fase acuta che diverse settimane dopo l'evento acuto. L'aumento di rigidità del globulo rosso, l'aumento di aggregabilità eritrocitaria, la viscosità ematica, la viscosità plasmatica contribuiscono alla riduzione di riperfusione micro vascolare. In collaborazione con l'Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma verrà effettuato uno studio sulle alterazioni emoreologiche nel setting dell'infarto acuto, modificazioni che si ipotizza possano essere un fattore importante nello sviluppo del fenomeno del *no-reflow*.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Questo studio permetterà di valutare una possibile associazione tra viscosità del sangue e incidenza di *no-reflow* in pazienti STEMI (*Segment Elevation Myocardial Infarction*). Infatti lo studio prevede il confronto di tre gruppi di pazienti con sindrome coronarica STEMI, N STEMI (*Non Segment Elevation Myocardial Infarction*) e con angina stabile e la valutazione del profilo emoreologico comprendente viscosità plasmatica, viscosità ematica a bassi e alti *shear rate* e indice di aggregazione eritrocitaria in sistema rotazionale e viscoelasticità con test in oscillatorio determinando i moduli viscoso ed elastico. Le determinazioni verranno effettuate secondo le linee guida dell'*International Expert Panel for Standardization of Hemorheology* con Reo-Microscope Anton Paar, MCR 301 Physica, sistema di misura che permette la contemporanea valutazione del comportamento delle emazie in condizioni di flusso a *shear rate* definiti. Si potrà pertanto evidenziare differenze di comportamento a bassi *shear rate*, che corrispondono al microcircolo, tra i gruppi di pazienti anche confrontandoli a controlli senza patologia coronarica.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questa ricerca fornirà maggiori conoscenze sull'importanza e il ruolo delle alterazioni emoreologiche nelle sindromi coronariche acute.

Potranno essere individuati nuovi parametri target per il monitoraggio dei diversi gruppi di pazienti anche in funzione delle terapie applicate.

Verrà valutato il ruolo dell'aggregabilità e indeformabilità delle emazie in fase acuta e nel follow-up.

### **Applicazione del protocollo di indagine molecolare per il deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi ai donatori di sangue**

Il deficit di G6PD è una malattia ereditaria dovuta a una mutazione del gene codificante l'enzima G6PD il cui ruolo metabolico consiste nella difesa delle cellule contro le ossidazioni. Il deficit è asintomatico, ma predispone a una suscettibilità allo stress ossidativo che può condurre a manifestazioni cliniche severe come anemia emolitica o ittero neonatale. Il test diagnostico di base è il saggio dell'attività enzimatica nei globuli rossi, scarsamente efficace per la diagnosi delle femmine eterozigoti che presentano un'ampia variabilità di attività enzimatica dovuta al fenomeno del mosaicismismo. In questi casi la diagnosi si ottiene con l'analisi molecolare. Nel protocollo analitico applicato nel nostro laboratorio confluiscono anamnesi familiare, analisi biochimiche ed esame della regione esonica del DNA. Il deficit di G6PD può influire sulla sopravvivenza post trasfusionale dei globuli rossi

conservati e dare luogo ad emolisi intravasale soprattutto in presenza di varianti molecolari di G6PD che inducono deficit severi. Dal momento che il deficit può essere asintomatico, alcuni donatori di sangue potrebbero essere portatori inconsapevoli. La ricerca si prefigge due obiettivi:

- aggiornamento del protocollo diagnostico con la messa a punto di metodi per lo studio della sequenza nucleotidica delle giunzioni esone-introne e della regione del *promoter*;
- applicazione del protocollo ad uno studio di prevalenza del deficit e del tipo di variante fra i donatori di sangue

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Ottimizzazione del protocollo diagnostico per l'individuazione di mutazioni nelle zone di giunzione introne- esone e nella regione del *promoter*.
- Definizione della prevalenza del deficit fra i donatori di alcuni centri trasfusionali nella provincia di Roma.
- Definizione del tipo di variante molecolare maggiormente rappresentata fra i donatori.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'esito degli studi di prevalenza potrà dare indicazioni sull'opportunità di effettuare uno screening dei donatori afferenti ai centri trasfusionali.

### **Applicazione di cellule staminali neurali o autologhe di paziente indotte da cellule differenziate per il recupero di malattie degenerative del sistema nervoso. Utilizzo di nuovi modelli animali, cellulari/molecolari, nanotecnologie e tecniche di *neuro-imaging***

Le malattie infiammatorie e degenerative dell'SNC includono, tra le altre, il morbo di Alzheimer, di Parkinson, la SLA, l'ictus e la SM. Numerosi lavori evidenziano il ruolo fondamentale di geni chiamati miRNA nella regolazione di molte funzioni biologiche. Inoltre, recentemente è stato possibile ottenere cellule pluripotenti, iPS, da cellule differenziate e in particolare manipolando miRNA. Questo approccio è stato definito riprogrammazione, *reprogramming*. Questi risultati offrono la potenzialità di creare una sorgente di cellule proveniente dal paziente stesso che minimizzerebbe il problema non risolto di rigetto di staminali non proprie.

Questa unità si propone di individuare i miRNA e i geni bersaglio coinvolti nel mantenimento e regolazione della nicchia staminale in condizioni normali e patologiche con lo scopo di poter manipolare tale equilibrio e potenziare l'utilizzo terapeutico delle staminali. Pertanto, i progenitori neurali verranno isolati da modelli normali e patologici e miRNA e geni coinvolti verranno analizzati usando *real time* PCR con l'obiettivo di produrre un profilo di espressione differenziale.

Un altro obiettivo è individuare i miRNA e i geni coinvolti nella regolazione del *reprogramming* cellulare con lo scopo di ampliare la conoscenza e la potenzialità di ottenere nuove sorgenti di cellule staminali da utilizzare nella terapia di malattie del sistema nervoso.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto proposto potrebbe aumentare la conoscenza riguardo ai network correlati al mantenimento e *cross-talk* della nicchia staminale e microambiente e in particolare potrebbe aiutare a mettere in luce i meccanismi alla base del *reprogramming* allo scopo di ottenere nuove banche di staminale per la terapia rigenerativa. Con questo scopo il profilo di espressione differenziale su modelli di ictus vs sistemi normali verranno seguiti utilizzando saggi di *real time* PCR a reazione singola e in piastra, della ditta Applied Biosystem. Una volta ottenuto il sottogruppo di miRNA di interesse si procederà allo studio fisiologico della

loro specifica funzione. Si individueranno i relativi geni bersaglio attraverso una elaborazione bioinformatica, utilizzando i software Target Scan, PicTar, miRBASE software.

Pertanto, lo studio si focalizzerà sull'effetto biologico dei miRNA valutando il silenziamento e la riespressione degli stessi. A questo scopo verranno utilizzati oligonucleotidi modificati chimicamente in grado di mimare (*mimics*) o di silenziare (antimir o antagomir) i miRNA per esperimenti *in vitro* e *in vivo*.

Tra i miRNA menzionati sopra, quelli che daranno maggiori risultati verranno studiati in relazione ai loro geni bersaglio. Tali risultati potranno anche offrire spunti nel predire la risposta ad eventuali terapie e farmaci.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati prodotti dallo studio potrebbero fornire nuovi modi per creare sorgenti di cellule utilizzabili in malattie degenerative. In particolare produrrebbe banche di cellule potenzialmente provenienti dal paziente stesso e questo approccio minimizzerebbe il problema non risolto di rigetto di staminali non proprie. Numerose evidenze mostrano come sia possibile manipolare le cellule iPS utilizzando miRNA e pertanto tecniche molecolari transienti come utilizzo di oligonucleotidi per esprimere o reprimere questi geni. Questo aspetto permette di eliminare anche il problema di modificare stabilmente le cellule ottenendo una popolazione da reimpiantare non manipolata e non tumorigenica e di più sicura applicazione clinica.

### **Attività immunomodulatoria e metabolismo della vitamina D3 in cellule dell'immunità innata**

Lo studio dell'attività immunomodulatoria della vitamina D3 (vitD3) in cellule dendritiche (DC) umane è un filone di ricerca attivo nel gruppo da diverso tempo, e ci ha permesso di dimostrare effetti della 1,25(OH)2D3 sulla regolazione trascrizionale del differenziamento/attivazione delle DC e sulla loro attività chemiotattica. Negli ultimi due anni lo studio si è più indirizzato nel campo della ricerca traslazionale, applicata alla SM, una patologia dell'SNC con una importante componente immunomediata. In questo contesto, è stato avviato uno studio integrato del metabolismo autocrino e della risposta alla vitD3 in DC ottenute da pazienti con SM. Il progetto ha il duplice scopo di valutare se un'alterazione di questi parametri contribuisca al ruolo pro-infiammatorio e patogenetico delle DC nella SM, e di valutare possibili interferenze e/o sinergie tra vitD3 e IFN $\beta$  (IFN $\beta$ ).

Nel prossimo triennio ci proponiamo di proseguire questi studi ed estenderli ad altre patologie con componenti infiammatorie, focalizzandoci su: i) meccanismi molecolari di azione e metabolismo autocrino della vitD3 in DC e in altre cellule dell'immunità innata; ii) relazioni tra l'attività immunomodulatoria della vitD3 e dell'IFN di tipo I in queste cellule; iii) effetti della vitD3 sul *cross-talk* tra popolazioni dell'immunità innata.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Gli studi proposti contribuiranno alla caratterizzazione di meccanismi d'azione della 1,25(OH)2D3 (1,25D3), il metabolita attivo della vitD3, in diverse popolazioni dell'immunità innata, incluse DC generate *in vitro* con diversi cocktail di citochine, monociti e linfociti T gamma/delta (Tgd). Studieremo il ruolo di citochine e chemochine, quali IL6 e CCL2, che abbiamo osservato essere indotte da 1,25D3, nell'attivazione e reclutamento delle DC stesse e di altre popolazioni (Tgd e regolatorie). Verificheremo inoltre l'ipotesi che tra i bersagli molecolari della 1,25D3 ci sia l'inflammasoma, una piattaforma molecolare assemblata in risposta a segnali di pericolo esogeni ed endogeni, e la cui alterata attivazione è legata alla patogenesi di diverse malattie infiammatorie (inclusa la SM). Questa ricerca

sarà affiancata alla continuazione del filone applicativo alla SM, nel quale approfondiremo l'analisi delle interferenze e/o sinergie a livello molecolare, cellulare e inter-cellulare (*cross-talk* tra differenti popolazioni dell'immunità innata) tra vitD3 e IFN $\beta$ . L'IFN $\beta$  è infatti una delle principali opzioni terapeutiche nella SM, ma la relazione tra l'IFN $\beta$  e la vitD3 è ancora poco studiata. Poiché la vitD3 è recentemente entrata nella sperimentazione clinica per la cura della SM, gli studi su DC isolate da pazienti potranno fornire importanti informazioni sia su meccanismi patogenetici che su nuovi bersagli molecolari o cellulari dell'efficacia terapeutica di queste molecole.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La ricerca sulla vitD3 ha subito negli ultimi anni una sorprendente accelerazione, e 1,25D3 e i suoi analoghi sono entrati nella pratica clinica o sono in via di sperimentazione in numerose patologie, incluse malattie iper-proliferative, come la psoriasi, l'iperplasia prostatica e diversi tipi di tumori, e malattie autoimmunitarie come la SM. Questo potenziale in espansione richiede una dettagliata caratterizzazione degli effetti e dei bersagli cellulari di questo ormone. Gli studi proposti amplieranno le conoscenze di base sui meccanismi attraverso i quali l'1,25D3 induce tolleranza modulando l'immunità innata, e contribuiranno quindi ad un suo impiego razionale in un più ampio spettro di interventi terapeutici. Contribuiranno inoltre alla comprensione di eventuali meccanismi patogenetici o protettivi legati alla vitD3 in patologie immunomediate e infiammatorie.

### **Basi molecolari della sindrome di Noonan e di malattie dello sviluppo ad essa correlate**

La sindrome di Noonan (SN) è una malattia genetica caratterizzata da cardiopatia congenita, *facies dismorfica*, bassa statura, disturbi dell'apprendimento. Negli ultimi anni abbiamo scoperto che mutazioni nei geni PTPN11, KRAS, NRAS, SOS1, RAF1, BRAF, SHOC2 e CBL si riscontrano nel 75% degli individui con SN o con un fenotipo correlato. Tali geni codificano per proteine implicate nella via di trasduzione RAS/MAPK e le mutazioni identificate promuovono l'iperattivazione della via.

Gli obiettivi della ricerca sono l'identificazione di nuovi geni responsabili della SN e di disordini dello sviluppo correlati e la comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi di queste malattie. Saranno intrapresi studi di *linkage* su famiglie informative per l'identificazione di nuovi *loci* che saranno successivamente analizzati attraverso metodologie di screening molecolare. Un secondo approccio sperimentale basato sull'analisi *in silico* dell'interattoma delle proteine che svolgono un ruolo chiave nella via di trasduzione RAS/MAPK permetterà l'identificazione di geni candidati che saranno analizzati attraverso sequenziamento. Come strategia complementare, sarà condotto il sequenziamento dell'esoma su un campione selezionato di pazienti con SN sporadica. La caratterizzazione funzionale delle lesioni molecolari causative della malattia sarà condotta attraverso studi biochimici e di biologia cellulare e tramite lo sviluppo di modelli animali (*C. elegans* transgenici).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Le linee di ricerca proposte porteranno all'identificazione di nuovi geni-malattia responsabili della SN e di condizioni clinicamente correlate, consentiranno di delineare lo spettro fenotipico associato alle mutazioni identificate, la loro associazione con specifici difetti dello sviluppo e la loro diversità molecolare. Gli studi forniranno dati che consentiranno di comprendere le conseguenze strutturali e funzionali delle mutazioni e il loro effetto su diverse vie di trasduzione del segnale.

### **Trasferibilità dei risultati**

La comprensione delle basi molecolari della SN e delle malattie genetiche ad essa correlate è fondamentale per definire un appropriato ed efficace percorso diagnostico, di follow-up e terapeutico di queste condizioni patologiche.

### **Controllo delle attività antitumorali dirette e immunomediate di IRF-8 tramite i farmaci epigenetici in un modello sperimentale murino di coloncarcinoma trapiantabile CMT-93.**

L'*Interferon Regulatory Factor 8* (IRF-8) modula importanti processi fisiologici compresa la difesa dell'ospite, la crescita cellulare, il differenziamento e la regolazione del sistema immunitario. È stato riconosciuto che l'espressione di IRF-8 è inversamente proporzionale alla resistenza all'apoptosi e al fenotipo metastatico delle cellule tumorali, e il suo silenziamento trascrizionale è stato verificato in molti carcinomi primari, compreso il cancro coloretale (*ColoRectal Cancer*, CRC). Recentemente, *Histone deacetylases* (HDACi) sono emerse come potenti insuttori dell'arresto della crescita, differenziamento e apoptosi delle cellule CRC. HDACi modula la risposta immunitaria e su queste basi una delle più affascinanti prospettive è la conoscenza dei meccanismi molecolari riguardanti l'attività antitumorale di queste *epidrug* per arrivare alla messa a punto di migliori effetti terapeutici a diretto beneficio del paziente. Gli scopi di questo *task* del progetto sono:

- monitorare l'espressione di IRF-8 da parte della 5-Aza-2'-deossicitidina (5AzadC) nelle linee CRC e nei tumori primari di colon;
- sviluppare un nuovo dispositivo per lo studio delle perturbazioni chimico-fisiche delle cellule CRC dopo trattamento con 5AzadC. Il raggiungimento di tali obiettivi consentirà avanzamenti importanti nello studio dei meccanismi molecolari alla base della carcinogenesi della CRC e del potenziale antitumorale delle *epidrug* per il miglioramento della diagnosi del CRC.

### **Risultati attesi nel triennio**

Valutazione del ruolo di IRF-8 nella connessione fra le attività antitumorali dirette e immunomediate della 5AzadC in modelli murini di CRC singenici. Per tale *task*, i modelli *in vivo* sono essenziali per decifrare il ruolo del sistema immunitario durante il decorso della carcinogenesi del CRC. Le risposte antitumorali da parte del sistema immunitario si originano all'interno del microambiente tumorale, laddove le cellule cancerose e immunitarie interagiscono tramite una complessa ed elaborata rete di mediatori solubili e componenti strutturali. Dati preliminari provenienti dal nostro laboratorio suggeriscono l'esistenza di una stretta correlazione tra la down-regolazione intratumorale dell'espressione di IRF-8 e la scarsa infiltrazione delle cellule immunitarie all'interno della massa tumorale stessa. Nel corso della progressione cancerosa di melanomi B16-F10 trapiantati in modelli murini (Mattei *et al.*, *Eur J Immunol* 2009;39(S1):S621). È importante notare che, in tali condizioni sperimentali, il trattamento con 5AzadC dei topi portatori di melanoma dava luogo al ripristino dell'espressione di IRF-8, dell'infiltrazione delle cellule immunitarie, e tutto questo a sua volta portava alla regressione tumorale. Su tali basi, il razionale di questo *task* riguarda lo studio del ruolo di IRF-8 negli effetti antitumorali immunomediati in seguito a trattamento con *epidrug* nel cancro del colon-retto.

### **Trasferibilità dei risultati**

Gli studi in avviamento relativi a questo progetto consentirebbero il raggiungimento di importanti traguardi nell'ambito dell'immunoterapia dei tumori, in particolare del cancro al colon. Globalmente, questi studi mirano all'approfondimento di un eventuale ruolo del fattore di trascrizione IRF-8 nella progressione tumorale di questo tipo di cancro, anche con

la messa a punto di terapie di nuova generazione, basate sull'impiego di farmaci epigenetici quali ad esempio la 5-deossi-2'azacitidina, un inibitore della DNA metilasi. Ne consegue che l'uso intensivo di modelli murini in queste indagini avrà un sicuro e immediato beneficio sulla messa a punto, nell'uomo, di nuove e più efficaci terapie di nuova generazione mirate alla cura contro il cancro al colon.

### **Costruzione dell'*hub* italiano delle biobanche di popolazione (HIBP)**

Il potenziale predittivo e preventivo per le malattie umane è il principale scopo delle raccolte di campioni biologici nelle biobanche di popolazione (Bp). Il riconoscimento del valore delle collezioni prospettiche nel migliorare la salute pubblica e diminuire la spesa sanitaria costituisce un forte incentivo a sostenere progetti basati sulle Bp. Lo straordinario sforzo di alcune Regioni italiane per costituire Bp che raccolgano in qualità campioni umani e i dati associati a tali campioni, insieme alle risorse economiche impiegate per l'allestimento, la gestione e la conservazione dei campioni biologici, rappresentano un grande investimento sul futuro della medicina preventiva italiana. Tuttavia, l'enorme potenzialità rappresentata dall'insieme di queste collezioni, e quindi dalla capacità di incidere sulla medicina preventiva e predittiva nazionale, è depauperata dalla frammentarietà, dalla scarsa interazione e visibilità di queste strutture a livello nazionale.

Scopo della presente proposta è quella di integrare le singole biobanche di popolazione in un network (*hub*) italiano di Bp, con lo scopo di sinergizzare le potenzialità di medicina predittiva e preventiva delle singole strutture e collezioni con una rete di informazione, collaborazione, e interazione dei patrimoni biologici italiani.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Ci si aspetta che la costruzione una piattaforma elettronica comune alle Bp italiane metta in risalto con chiarezza le attività delle biobanche stesse. Tale obiettivo verrà realizzato mediante:

- Allestimento, mantenimento e gestione di un sito web interattivo e permanente del nodo nazionale delle Bp.
- Il sito web sarà implementato in modo da garantire l'accesso alle funzioni del sito stesso e la comunicazione tra le differenti biobanche.
- La piattaforma comune valorizzerà le attività di medicina preventiva e predittiva poste in essere dalle Regioni/Province mediante le Bp; faciliterà il flusso informativo a livello nazionale; ospiterà i report dei meeting dei partecipanti al network; opererà per la sensibilizzazione sul valore delle Bp, anche mediante la realizzazione di manifestazioni specifiche (congressi, azioni presso le scuole ecc.) promosse dal network. Ulteriore scopo è la costruzione di una rete di collaborazione scientifica e funzionale tra l'ISS le biobanche e Regioni/Province.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Costituire il nodo di interfaccia tra le Bp e la *roadmap* nazionale italiana delle infrastrutture scientifiche; Implementare a livello nazionale il modello di organizzazione "*hub and spoke*" e promuovere e facilitare la partecipazione ai progetti europei e, in particolare, al *Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure* – BBMRI ([www.bbmri.eu/](http://www.bbmri.eu/)). In pratica, si promuove la convergenza degli obiettivi di medicina predittiva e preventiva regionali e nazionali con gli obiettivi strategici dell'infrastruttura BBMRI.

## **Creazione di modelli pre-clinici per testare farmaci per la cura del tumore alla prostata**

La produzione di modelli animali che permettano di studiare la progressione tumorale rappresenta uno dei punti focali più importanti per eradicare il cancro alla prostata. Correntemente, gli animali più usati sono modelli murini transgenici creati con geni virali o over-espressanti oncogeni controllati da promotori virali. Molti studi clinici per l'applicazione di nuovi farmaci e condotti su pazienti con cancro sono risultati fallimentari. Questo molto spesso è stato attribuito all'inaffidabilità dei modelli preclinici usati. Numerose evidenze suggeriscono che una famiglia di geni, i miR, svolga una funzione chiave nella tumorigenesi. Nel nostro laboratorio sono stati individuati una serie di miR associati con la progressione del tumore alla prostata. Con questo progetto ci proponiamo di creare modelli *in vivo* innovativi basati sulle conoscenze acquisite *in vitro* e *in vivo* attraverso lo studio e utilizzo dei miR. Verranno scelti i miR che sono più significativamente alterati nei tumori e che partecipino in maniera preponderante alla tumorigenesi.

Il progetto si propone inoltre di creare modelli di xenotrapianto con cellule di paziente inoculate nella capsula renale per produrre topi con tumori simili al tumore di provenienza. Questo modello permetterà di creare dei tumori che mimeranno quello del paziente. Entrambi i modelli verranno utilizzati per valutare la efficacia di farmaci nella massa tumorale e nel contenimento ed eradicazione delle metastasi.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati prodotti dal progetto potrebbero permettere di creare sistemi *in vivo* meno manipolati e che meglio rappresentino le risposte dei pazienti ai farmaci.

I miRNA di interesse saranno quelli provenienti da studi precedenti e che abbiano dimostrato una notevole importanza nella progressione del tumore. In tal modo si può ipotizzare di sommare gli eventi così come riscontrati più frequentemente nei pazienti simulando ciò che accade nella tumorigenesi.

I modelli di xenotrapianto forniranno un ulteriore controllo per valutare la sensibilità alla terapia. Inoltre potranno permettere una risposta più veloce per la programmazione di studi di *trial* clinici.

### **Trasferibilità dei risultati**

Lo studio può generare nuovi modelli per testare farmaci approvati dal *Food and Drug Administration* (FDA) e da valutare in studi preclinici.

## **Dalla dieta al tumore: un approccio integrato per lo studio di *pathway* che legano l'infiammazione associata al tessuto adiposo viscerale al tumore del colon**

Il rischio di sviluppare tumori del colon (*Colon Cancer*, CC) è significativamente aumentato in individui obesi. Ciò rappresenta un problema rilevante in ambito sanitario considerato il forte aumento di persone in sovrappeso e obese. L'infiammazione cronica associata all'obesità e l'effetto benefico della somministrazione di farmaci anti-infiammatori sull'incidenza di CC suggeriscono l'esistenza di un legame tra obesità, infiammazione e sviluppo di CC. È inoltre d'interesse che componenti della dieta sono in grado di modulare l'infiammazione così come il rischio di sviluppare CC. Un elemento critico che ha impedito grossi progressi nel campo è rappresentato dalla scarsa comprensione degli eventi cellulari e segnali che contribuiscono all'insorgenza/mantenimento dell'infiammazione. Al riguardo, gli acidi grassi sono dei candidati interessanti poiché sono in grado di modulare l'infiammazione, positivamente o negativamente in relazione alla loro struttura chimica. Obiettivi principali di questo progetto sono:

- identificare variazioni individuali nella composizione in acidi grassi nel tessuto adiposo e la loro correlazione con la dieta, il peso corporeo e lo stato infiammatorio del tessuto adiposo;
- definire la risposta di adipociti e cellule dendritiche a diverse categorie di acidi grassi;
- sviluppare un approccio integrativo per annotare e stimare correlazioni tra variabili nutrizionali, molecolari e cliniche.

#### **Risultati attesi nel triennio**

L'incidenza dell'obesità e di tumori è in forte crescita nei Paesi industrializzati e può essere prevenuta mediante una migliore conoscenza dei meccanismi molecolari che legano dieta, infiammazione e carcinogenesi. È atteso che lo sviluppo di questo progetto migliorerà le nostre conoscenze su come il tessuto adiposo riconosce e usa sostanze nutritive per mantenere l'omeostasi, attraverso l'analisi integrata del trascrittoma. Inoltre, la definizione di biomarcatori predittivi che collegano l'obesità a specifiche *signature* infiammatorie e risposte immuni sarà rilevante per la chemio prevenzione dei tumori e per lo sviluppo di strategie dietetiche più efficaci, nelle quali l'equilibrio tra componenti del cibo pro- e anti-infiammatori sarà un fattore determinante.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Identificazione di biomarcatori predittivi che collegano l'obesità all'infiammazione e allo sviluppo di CC. Definizione di linee guida per regimi dietetici preventivi.

### **Disregolazione funzionale della via di trasduzione del segnale mediata dalle proteine JAK nella leucemogenesi**

Le leucemie linfoblastiche acute (LLA) comprendono un gruppo biologicamente e clinicamente eterogeneo di emopatie maligne clonali. Ricerche condotte dal nostro gruppo hanno recentemente dimostrato il coinvolgimento di *Janus kinase 1* (JAK1) nella patogenesi e/o progressione delle LLA dell'adulto. Le mutazioni di JAK1 sono attivanti, ricorrono nel 20% delle LLA della linea T (T-LLA) e sono associate a una prognosi sfavorevole. I primi studi di caratterizzazione funzionale delle mutazioni identificate suggeriscono che queste alterino la funzione della chinasi attraverso diversi meccanismi molecolari.

Sulla base di questa scoperta, ci si propone la dissezione molecolare delle vie di trasduzione del segnale mediate dalle proteine JAK per l'identificazione di nuovi eventi molecolari coinvolti nella patogenesi e/o progressione leucemica. Inoltre, gli studi saranno diretti alla comprensione dei meccanismi molecolari alla base della disregolazione funzionale di JAK1 associata alle mutazioni identificate, alla caratterizzazione del loro effetto sul *signalling* intracellulare, nonché alla valutazione di JAK1 come possibile bersaglio molecolare per lo sviluppo di nuovi farmaci antitumorali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio porterà all'identificazione di nuovi meccanismi molecolari aventi un ruolo nella patogenesi e/o progressione leucemica.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati dello studio porteranno all'identificazione di nuovi bersagli molecolari per terapie biologiche mirate.

### **Disregolazione funzionale di SHP2 nelle RASopatie germinali e somatiche**

Il gene PTPN11 codifica per SHP2, una proteina che gioca un ruolo cruciale nell'attivazione della via di trasduzione del segnale mediata da RAS. Mutazioni germinali in PTPN11 rappresentano la principale causa molecolare della sindrome di Noonan (SN) e

della sindrome LEOPARD (SL), due malattie dello sviluppo clinicamente correlate. Una distinta classe di mutazioni è acquisita come evento somatico e contribuisce allo sviluppo di leucemie acute. Mentre le mutazioni oncogeniche e associate a SN determinano un guadagno di funzione della proteina, le mutazioni associate a SL causano una drammatica riduzione della sua attività catalitica, sebbene il loro significato funzionale sia ancora ignoto.

La presente ricerca sarà volta alla comprensione dei meccanismi molecolari alla base della disregolazione funzionale di SHP2 e agli effetti delle mutazioni associate a SN, SL e leucemie sul *signalling* intracellulare. A questo scopo, verrà caratterizzato un pannello di mutazioni germinali e somatiche di PTPN11 localizzate nei diversi domini funzionali della proteina. Analisi biochimiche e cellulari, e l'uso del nematode *C. elegans* come sistema modello, saranno volte allo studio delle conseguenze di ciascuna mutazione sulla struttura e funzione della fosfatasi, così come sulla trasduzione del segnale e sullo sviluppo embrionale.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Gli studi programmati consentiranno di delineare i diversi meccanismi molecolari responsabili della disregolazione funzionale di SHP2 coinvolta nella patogenesi della SN e della SL, e associata all'oncogenesi. Gli studi consentiranno inoltre di comprendere le conseguenze funzionali delle mutazioni germinali e somatiche di PTPN11 sul *signalling* intracellulare e sullo sviluppo embrionale.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La comprensione dei meccanismi molecolari responsabili della disregolazione funzionale di SHP2 associata ai disordini dello sviluppo e alle leucemie fornirà i presupposti per l'eventuale sviluppo di nuove strategie terapeutiche volte al recupero della normale funzionalità della fosfatasi.

### **Effetti immunomodulatori di HIV-1 sulle Antigen Presenting Cells: ruolo nella patogenesi dell'AIDS**

Le *Antigen Presenting Cell* (APC) sono bersagli critici di *Human Immunodeficiency Virus* (HIV-1) e le loro alterazioni funzionali sono alla base di strategie virali di evasione della risposta immune. I meccanismi mediante i quali HIV induce disfunzioni di DC e macrofagi sono ancora poco conosciuti, ma si ritiene che fattori virali solubili, rilasciati in circolo o ai siti di replicazione, svolgano un ruolo importante. Questo progetto si propone di studiare l'effetto delle interazioni precoci di HIV-1, in particolare della glicoproteina gp120, con APC mediante l'identificazione dei segnali molecolari innescati, e la definizione di come questo set di segnali contribuisce alle disfunzioni cellulari e al controllo della replicazione virale. Obiettivi principali: i) caratterizzazione degli effetti dell'esposizione alla gp120 o al virione sulle funzioni delle DC. Si esplorerà la possibilità che le interazioni precoci HIV-DC possano portare alla generazione di DC tollerogeniche incapaci di indurre un'appropriata risposta dei linfociti T contro il virus; ii) identificazione dei meccanismi molecolari e fattori responsabili delle alterazioni funzionali di APC indotte da gp120. Si studierà la capacità della gp120 di modulare componenti della famiglia dei microRNA, regolatori critici dell'espressione genica, in macrofagi e DC e il loro coinvolgimento nelle interazioni ospite-patogeno, funzioni immunitarie, induzione di segnali necessari allo stabilirsi dell'infezione e/o alla sua modulazione.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Gli studi rivolti alla caratterizzazione degli effetti di HIV-1 sulla funzionalità delle DC permetteranno di associare l'attivazione di specifiche vie di traduzione del segnale, fattori trascrizionali e/o mediatori solubili prodotti, con le alterazioni funzionali osservate in queste cellule in risposta alla gp120. Ci si aspetta inoltre che le interazioni precoci HIV-cellula

bersaglio possano modulare il profilo di espressione cellulare dei microRNA e che tale regolazione possa essere specifica nei vari tipi cellulari dell'immunità innata. I risultati ottenuti nell'ambito di questo studio forniranno una migliore conoscenza dei segnali molecolari attivati dall'interazione precoce di HIV-1 con macrofagi e DC, e forniranno indicazioni sui geni regolati da microRNA che modulano la risposta cellulare ad HIV-1 e la propagazione del virus nella cellula ospite. Il raggiungimento degli obiettivi proposti porterà a un ampliamento delle conoscenze attuali sulla patogenesi dell'AIDS e all'identificazione di bersagli molecolari, creando così le basi per lo sviluppo di nuovi interventi terapeutici.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Identificazione di nuovi bersagli molecolari per lo sviluppo di approcci terapeutici contro l'infezione di HIV-1 (microRNA o componenti delle proprietà tollerogeniche delle DC come potenziali target di intervento).

### **Fattori cellulari endogeni nella modulazione della risposta immunitaria contro l'infezione da HIV: meccanismi molecolari di permissività al virus in monociti/macrofagi umani**

L'incidenza dell'infezione da HIV nel mondo è in costante declino dalla fine degli anni '90 e lo sviluppo di farmaci antiretrovirali efficaci e la loro disponibilità in espansione hanno permesso la cronicizzazione dell'infezione, con significativi progressi nella risposta globale contro l'HIV/AIDS. Tuttavia, l'impatto sociale della malattia rimane ancora molto elevato e in un contesto di crisi economica globale la sostenibilità a lungo termine delle reti di trattamento è in pericolo. Pertanto, studi volti allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche che possano consentire ai pazienti con infezione da HIV di interrompere il trattamento sono della massima urgenza. I monociti/macrofagi rappresentano il comparto cellulare non-T principalmente coinvolto nell'infezione da HIV e i meccanismi di infezione e persistenza virale nei macrofagi non sono definiti in modo chiaro. Lo studio proposto ha lo scopo di caratterizzare *in vitro* i meccanismi molecolari di resistenza innata al virus riguardanti i fattori endogeni cellulari ad attività antivirale, come i membri delle famiglie di proteine APOBEC e TRIMM, in cellule di monocita/macrofago isolate dal sangue periferico di donatori sani o soggetti infettati da HIV *naïve* o in terapia antiretrovirale. Inoltre, saranno indagati i mediatori solubili, citochine e chemochine, in co-culture di cellule infette, e il loro ruolo nella modulazione della risposta immunitaria all'infezione da HIV per il controllo della replicazione virale.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Eventi di latenza virale, scarsa penetrabilità dei farmaci nei santuari immunologici e sviluppo di resistenza alla terapia rappresentano un forte ostacolo ai progressi verso la cura dell'AIDS. La caratterizzazione in cellule di monocita/macrofago coltivati *in vitro* dei meccanismi intracellulari endogeni ad azione antivirale potrebbe contribuire a spiegare i meccanismi che regolano i fenomeni di resistenza e persistenza di infezione latente da HIV e permettere, anche in assenza di una completa eradicazione del virus, lo sviluppo di strategie terapeutiche, farmacologiche o vaccinali, mirate ed efficaci, per la remissione a lungo termine dei pazienti. Inoltre, considerando la crescente evidenza di una drastica riduzione della trasmissione dell'HIV in assenza di carica virale rilevabile, lo studio dei *pathway* endogeni di controllo dell'infezione potrebbe favorire la prevenzione dell'infezione da HIV anche a livello di popolazione.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La definizione molecolare della malattia facilita lo sviluppo di terapie mirate ed efficaci, favorendo una sempre maggiore personalizzazione della cura. Gli studi condotti *in vitro* su

cellule di monocita/macrofago isolati da donatori sani o pazienti con diverso stadio di infezione da HIV possono identificare nuovi target terapeutici cellulari ad attività antivirale. Inoltre, sarebbe possibile potenziare tali meccanismi antivirali endogeni per la cura di altre patologie virali, come anche tumori ad eziologia virale.

### **HIV e il *pathway* regolatorio miR-146a/CXCR4: un potenziale strumento per nuovi approcci terapeutici**

Il virus di tipo 1 dell'HIV-1 presenta un capsido provvisto di diverse glicoproteine, responsabili dell'entrata del virus nelle cellule. Usando differenti co-recettori, HIV-1 è in grado di infettare sia i linfociti-T che i macrofagi. L'abilità del virus di legarsi e di entrare nelle cellule T CD4+ dipende dall'espressione, sulla membrana delle stesse cellule T, della molecola CD4 e dei suoi co-recettori CXCR4 e CCR5.

Se da un lato il virus dell'HIV si replica prevalentemente in cellule T attivate, dall'altro i suoi virioni sono capaci di legarsi e di fondersi sia con le cellule T attivate che con quelle quiescenti, creando così un *reservoir* di particelle virali.

Visto che CXCR4 media l'entrata dell'HIV nei linfociti CD4+, la scoperta di inibitori di CXCR4 è da considerarsi un importante obiettivo per la farmacologia molecolare.

Vista l'ottima capacità dei microRNA di regolare al livello post-trascrizionale i loro geni bersagli e di operare *in vivo*, il nostro progetto vuole approfondire il ruolo del miR-146a, che abbiamo identificato come uno repressore di CXCR4 nelle cellule ematopoietiche e leucemiche, nella regolazione dei livelli d'espressione di CXCR4 nelle cellule T CD4+ resting rispetto alle cellule CD4+ attivate. Studieremo qual è il ruolo del *pathway* miR-146a/CXCR4 nel controllo dell'entrata dell'HIV nelle cellule CD4+.

#### **Risultati attesi nel triennio**

La migliore strategia sinora utilizzata contro l'HIV è stata lo sviluppo di farmaci antiretrovirali che, tra l'altro, ha fornito un utile trattamento nella cura dei pazienti affetti da HIV. Purtroppo, il fenomeno della resistenza farmacologica ha inevitabilmente causato un fallimento della terapia antiretrovirale. D'altro canto, però, tale fallimento può essere un buon motivo per spingere la ricerca verso nuovi orizzonti, alla scoperta di nuovi farmaci.

La ricerca per i farmaci anti-HIV si sta interessando maggiormente a composti che agiscono contro la cellula piuttosto che ai bersagli virali, e recentemente sono cominciati i primi test per mettere a punto l'utilizzo di un recettore antagonista che blocchi CCR5.

Nell'intento di perseguire questa strategia, in particolare rivolgendo l'attenzione a CXCR4, il nostro progetto si ripropone di verificare se il *pathway* regolatorio comprendente miR-146a/CXCR4 possa essere presente e agire nelle cellule T CD4+ *resting* rispetto alle cellule T CD4+ attivate; di capire se il *pathway* miR-146a/CXCR4 possa essere coinvolto nella regolazione dei livelli d'espressione di CXCR4 sulla membrana delle cellule T CD4+ e conseguentemente capire se si possa usare un lentivirus esprimente il miR-146, da solo o assieme ad un trattamento con AMD3100, un inibitore del CXCR4, come nuovo strumento per abbassare i livelli di CXCR4 e quindi inibire o perlomeno limitare la fusione del virus con le cellule bersaglio.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Ad oggi miR e anti-miR (antagomiR) rappresentano degli efficaci strumenti terapeutici. Questo progetto ha lo scopo di voler comprendere se il miR-146 possa diventare un promettente nuovo approccio alla terapia *in vivo* contro il virus dell'HIV.

I nostri studi sono un prerequisito indispensabile per ideare la fase I degli studi clinici, a cui si arriva solamente in seguito all'insieme di studi molecolari, cellulari e preclinici, prima *in vitro* e poi negli animali.

### **Identificazione di *pathway* molecolari correlati ai processi angiogenici nella progressione del melanoma cutaneo, diabete mellito e malattie vascolari, utilizzando approcci OMICI e di bio-informatica**

La regolazione della crescita cellulare e di nuovi vasi (angiogenesi) è un campo estremamente interessante nella ricerca biomedica. Nel corso degli studi in oggetto si utilizzeranno le più recenti tecnologie per identificare nuovi fattori proteici e vie metaboliche coinvolte nella regolazione dell'angiogenesi e dello sviluppo/progressione del cancro, in particolare il melanoma cutaneo, e altre patologie in cui l'angiogenesi ha un ruolo determinante, come il diabete (retinopatia diabetica) e le patologie ischemiche. A tal fine si useranno tecniche di spettrometria di massa, cromatografia ed elettroforesi mono- e bi-dimensionale e tecniche immunologiche che consentiranno anche di implementare il Servizio di analisi proteomica di miscele complesse proteiche di recente messo a punto nel Dipartimento. Inoltre, la disponibilità di modelli animali, cellule staminali e le nuove tecniche per interferire o amplificare specifici *pathway*, consentiranno di analizzare il ruolo di molecole chiave nei meccanismi dell'angiogenesi, per es. i fattori di crescita e le citochine, e di molecole cruciali nella regolazione di processi cellulari come la proliferazione e l'apoptosi. In particolare, si procederà anche allo studio dell'intero proteoma e dei microRNA, utilizzando modelli animali e biobanche da pazienti e la bioinformatica. Questi studi consentiranno di identificare nuovi meccanismi patogenetici e profili diagnostici potenzialmente utili per mettere a punto nuovi approcci terapeutici.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Pubblicazione dei risultati su riviste internazionali.
- Messa a punto di nuove metodiche biochimiche utili per diagnostica avanzata e identificazione di nuovi *pathway* de-regolati nel cancro e in altre patologie.
- Disegno di nuovi protocolli diagnostici e approcci terapeutici e di nuovi algoritmi bioinformatici di supporto alla ricerca oncoproteomica.
- Acquisizione e implementazione di specifici know-how tecnologici da università e istituti esteri, anche attraverso la formazione di giovani ricercatori presso laboratori all'estero.
- Scrittura di Grant e progetti di ricerca per ricevere fondi da utilizzare per le suddette attività.
- Deposito di domande di brevetto riguardanti gli aspetti innovativi dei suddetti studi.
- Formazione di personale qualificato.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Si prevede la trasferibilità alla comunità scientifica internazionale e all'SSN dei risultati delle ricerche in oggetto.

### **Il ruolo dell'ipossia nella regolazione dei microRNA e dei loro geni bersaglio nella biologia del cancro**

L'asse CXCR4/SDF-1 è coinvolto nella disseminazione metastatica e nella crescita e sviluppo delle cellule cancerose, comprese quelle leucemiche. CXCR4 è un gene bersaglio del miR-146a nelle cellule ematopoietiche; miR-146a è coinvolto nella tumorigenesi, in particolare nel tumore della mammella. Recentemente, abbiamo dimostrato che miR-146a abbassa i livelli di espressione della proteina CXCR4, blocca la proliferazione delle cellule leucemiche e può essere utilizzato in combinazione con dei terapeutici anti-leucemici standard, nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

Nei tumori solidi, le cellule tumorali nelle aree ipossiche sono caratterizzate da un'alta espressione di CXCR4 che favorisce lo sviluppo di metastasi. L'impatto dell'ipossia sull'espressione e sulla funzione biologica di CXCR4 nelle leucemie acute mieloide (LAM) è a tutt'oggi oggetto di studio.

Nei tumori maligni, l'ipossia associata alla sopravvivenza delle cellule tumorali potrebbe avere un ruolo nel fenomeno del cannibalismo che viene attivato in situazioni di depressione cellulare e vede coinvolto il gene TM9SF4, la cui funzione sia nei tumori solidi che nelle leucemie deve essere ancora identificata.

Ci proponiamo di studiare l'impatto dell'ipossia sulla regolazione e la funzione biologica di specifici miRNA, miR-146a e miR-145, e dei geni bersaglio, CXCR4 per miR-146a e TM9SF4 per miR-145, nelle patologie correlate all'ipossia, in particolare nelle LAM e nel tumore della mammella.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il nostro studio sul ruolo dell'ipossia nella regolazione dei microRNA, miR-146a e miR-145, e dei loro geni bersaglio CXCR4 e TM9SF4, permetterà di valutare se miR-146a/CXCR4 e miR-145/TM9SF4, possano rappresentare dei potenziali bersagli terapeutici, in particolare nelle patogenesi correlate all'ipossia, come nelle LAM e nel tumore della mammella.

Capire il *signalling* network e il ruolo dei fattori HIF attivati dall'ipossia nella biologia del cancro è indispensabile per disegnare nuove terapie, così come è importante identificare sia i geni che i miRNA che rispondono all'ipossia, e dunque ad una regolazione tramite HIF. Nuove droghe anti-HIF sono state identificate; nel prossimo futuro l'attività del nostro gruppo sarà incentrata su:

- verificare le patologie nelle quali HIF, HIF-1a in particolare, può avere un ruolo critico;
- identificare le combinazioni di trattamenti che abbiano degli effetti sinergici (usare i miRNA stessi, gli inibitori specifici come AMD3100 per bloccare CXCR4, i chemioterapeutici noti, le molecole anti-HIF);
- valutare, in esperimenti *in vitro*, gli effetti dei diversi trattamenti sulla biologia del cancro, analizzando la proliferazione tumorale, la vascolarizzazione e altri parametri biologici fondamentali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il nostro progetto rappresenta una prima tappa nella ricerca, indispensabile per lo sviluppo di modelli preclinici necessari per la valutazione e la definizione di nuove strategie di ricerca traslazionale, con lo scopo di sviluppare nuove terapie antitumorali sicure ed efficaci.

### **Indagini sul potenziale metastatico delle cellule staminali tumorali in modelli animali**

Partendo da cellule staminali tumorali isolate da cancro coloretale e carcinoma della mammella, due unità operative del Dipartimento EOMM hanno realizzato dei modelli animali di metastasi. Le linee utilizzate danno origine a derivati metastatici che sono più efficienti della linea parentale. Esperimenti di competizione *in vivo* con popolazioni parentali e derivate, marcate geneticamente, hanno formalmente dimostrato questo risultato. Alla base di questo fenomeno sono ipotizzabili fenomeni di adattamento o, in alternativa, di selezione all'interno della popolazione parentale. Le variazioni nei profili di espressione genica tra le due popolazioni, sono state stimate tramite una piattaforma di analisi a *microarray*, e l'analisi dei valori di espressione ha permesso di identificare un ristretto numero di geni che

risultino differenzialmente espressi in maniera consistente nel confronto tra cellule parentali (otto) e derivati metastatici (18). È previsto un incremento dei campioni analizzati entro i prossimi 12 mesi. Nel frattempo stiamo cercando di stabilire una relazione tra geni differenzialmente espressi e potenziale metastatico tramite esperimenti di trasferimento genico e di interferenza genica nelle popolazioni parentali e derivate.

#### **Risultati attesi nel triennio**

La presenza di geni propri del fenotipo metastatico, o altamente arricchiti in popolazioni metastatiche, può risultare da una variazione del loro livello nella popolazione *in toto*, o da una variazione nei rapporti relativi di sottopopolazioni caratterizzate da un diverso livello di espressione. In entrambi i casi una discriminante molecolare potrà essere utilizzata, a prescindere dal ruolo causale o casuale giocato nel fenomeno, come potenziale biomarcatore.

La nozione di eterogeneità interna in una popolazione di cellule tumorali è ampiamente suffragata dalla letteratura degli ultimi dieci anni. Il tumore, analogamente ai tessuti normali, dipende da un comparto con proprietà staminali per la rigenerazione e il turnover cellulare. In un tumore esiste pertanto una sottopopolazione che non è in grado di rigenerare il tumore, e neanche di generare metastasi, e una che invece è capace di rigenerarlo, che viene definita come staminale. All'interno del comparto staminale è ipotizzabile l'identificazione di un sottocomparto con capacità metastatica non necessariamente sovrapponibile a quello capace di generare un tumore *in situ*. Ci attendiamo quindi di discriminare tra un modello eterogeneo in cui le cellule metastatiche siano una sottopopolazione del tumore e un modello omogeneo. Ci aspettiamo di trovare, tra i *pattern* di espressione delle cellule metastatiche e non metastatiche, differenze che aprano la strada ad ipotesi terapeutiche e diagnostiche innovative.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La proposta si colloca nel quadro di un paradigma recente nell'ambito dell'oncologia sperimentale: l'idea che i tumori presentino al loro interno delle eterogeneità in termini di potenziale tumorigenico. Nelle cellule staminali tumorali (*Cancer Stem Cells*, CSC), tale eterogeneità discrimina tra cellule tumorigeniche e non tumorigeniche. In questo quadro ormai consolidato, la ridefinizione, all'interno delle CSC, di sottopopolazioni dotate di capacità di metastatizzare, è per analogia un obiettivo di estrema importanza per l'allestimento di protocolli sperimentali preclinici. La caratterizzazione molecolare a livello trascrittomico rappresenta un approccio robusto e ad elevato potenziale per individuare sia bersagli per una terapia mirata, sia potenziali biomarcatori per la validazione di approcci terapeutici o per la diagnostica molecolare. La comparsa di metastasi è uno dei fattori prognostici più negativi in clinica. Ciò rende la proposta altamente rilevante per le problematiche dell'SSN.

### **La fattibilità per la produzione industriale di eritroblasti umani per trasfusione**

È risaputo che le banche del sangue attualmente non riescono più a soddisfare la crescente richiesta di prodotti per trasfusione sicuri. Per colmare questa carenza, si stanno sviluppando prodotti alternativi. Il gruppo ha svolto un ruolo determinante nello sviluppo di metodi di coltura per la produzione di globuli rossi (*Red Blood Cells*, RBC) in quantità sufficiente per trasfusione a partire da sorgenti di staminali emopoietiche al momento non utilizzate (sangue di cordone con volumi insufficienti per trapianto e prodotti di leucoriduzione nella preparazione delle RBC per trasfusioni). È dimostrato che eritroblasti umani ottenuti *in vitro* con questi sistemi di coltura maturano in RBC *in vivo* in un modello animale immunodepresso (topi SCID-NOD). Inoltre, RBC generati *in vitro* hanno una sopravvivenza normale se trasfusi in un volontario autologo. RBC generati *in vitro* potranno

presto essere usati come prodotto alternativo per trasfusione. Tuttavia, ci sono diversi ostacoli da risolvere. Ad esempio i costi di questo tipo di produzione sono ancora troppo elevati. Svilupperemo nuove tecnologie adeguate ed efficienti per produrre cellule a costi competitivi. Tenteremo di identificare obiettivi clinici raggiungibili con quantità di cellule ragionevolmente producibili con le attuali tecnologie. Un obiettivo realistico sarà l'uso di cellule eritroidi espanse *in vitro* per sviluppare terapie personalizzate. Ciò consentirebbe l'estensiva caratterizzazione di queste cellule per una loro considerazione di uso *in vivo*.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il principale prodotto di questo progetto sarà un piano di sviluppo industriale per un prodotto medicinale avanzato per terapia cellulare somatica, composto da un concentrato di eritroblasti umani coltivati *in vitro* per uso allogenico.

In aggiunta, ci proponiamo di sviluppare usi clinici non trasfusionali di cellule eritroidi generate *in vitro*. Abbiamo identificato come obiettivi clinici immediati per queste cellule l'identificazione di terapie personalizzate in pazienti con policitemia vera (iperproliferazione di cellule rosse *in vivo*) e con anemia eritropoietina-refrattaria quali pazienti di Diamond Blackfan (sottoproduzione di cellule rosse *in vivo*). Ci proponiamo di usare cellule eritroidi espanse *in vitro* da questi pazienti per identificare farmaci che possano inibire (policitemia vera) o attivare (Diamond Blackfan Anemia) l'eritropoiesi in questi pazienti.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Una popolazione di pazienti che potrebbe beneficiare della produzione di sangue *in vitro* per trasfusione sono i talassemici, e altri pazienti trasfusi cronicamente a rischio di sviluppare alloimmunità.

Gli studi sull'uso di cellule espanse *in vitro* per l'identificazione di terapie personalizzate possono invece avere ricadute importanti per pazienti con policitemia vera e anemia di Blackfan Diamond.

### **Malattia renale cronica e rischio cardiovascolare in Italia. Studio longitudinale di popolazione basato sull'utilizzo del database e della banca biologica del CNESPS-ISS**

L'insufficienza renale cronica (IRC) è una patologia importante che interessa, spesso in modo silente, circa il 10% della popolazione generale dei Paesi industrializzati. L'IRC è prevalente nelle fasce di età media e alta dove rappresenta un importante fattore di rischio cardiovascolare (CV) indipendente dai fattori di rischio tradizionali. Ad oggi non è disponibile una valutazione epidemiologica dei fattori di rischio modificabili associati con lo sviluppo della IRC e delle patologie ad essa correlate. Il presente progetto intende utilizzare i dati e il materiale raccolto da un campione rappresentativo della popolazione generale italiana all'interno dello studio longitudinale MATISS (1984-2004) con lo scopo di:

- valutare la prevalenza e l'incidenza di IRC;
- valutare la frequenza dei principali fattori di rischio CV associati con l'IRC;
- valutare il ruolo predittivo del filtrato glomerulare calcolato (eGFR) nella definizione del rischio CV e l'effetto di includere l'eGFR nella funzione per la valutazione del rischio CV a dieci anni;
- identificare nuovi fattori di rischio CV associati con l'IRC in uno studio caso-controllo nidificato nello studio longitudinale. Campioni di siero (n. ~5.000) saranno estratti dalla banca biologica e utilizzati per l'esecuzione di nuove determinazioni analitiche alla linea di base dello studio. I dati ottenuti saranno analizzati con metodologie consolidate per lo studio della funzione di predizione del rischio e di mortalità.

### **Risultati attesi nel triennio**

Risultati principali dello studio saranno la stima degli indicatori di IRC e dell'associazione tra fattori di rischio per IRC e malattia CV nella popolazione adulta italiana. Inoltre, sfruttando l'eccezionalmente lungo follow-up dello studio MATISS sarà possibile stimare il ruolo indipendente dell'eGFR e di nuovi fattori di rischio associati all'IRC nella predizione di malattia CV e mortalità totale e CV.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti contribuiranno alla pianificazione di nuove strategie di salute pubblica *evidence-based* e allo sviluppo di strumenti aggiornati per la valutazione del rischio cardiovascolare globale della popolazione adulta italiana.

## **Mutazioni somatiche di JAK1 e leucemogenesi**

Le LLA comprendono un gruppo clinicamente eterogeneo di emopatie maligne clonali. Ricerche condotte dal nostro gruppo hanno dimostrato il coinvolgimento di JAK1 nella patogenesi delle LLA dell'adulto. Le mutazioni di JAK1 sono attivanti, ricorrono nel 20% delle LLA della linea T (T-LLA) e sono associate a prognosi sfavorevole. JAK1 è una tirosina-chinasi che, in risposta alla stimolazione promossa da citochine e fattori di crescita, promuove l'attivazione delle proteine STAT e di diverse vie di trasduzione del segnale. Gli studi di caratterizzazione funzionale delle mutazioni identificate suggeriscono che queste alterino la funzione della chinasi attraverso diversi meccanismi molecolari.

Alla luce di queste considerazioni, obiettivi della presente proposta di progetto sono:

- definizione della rilevanza clinica e del significato prognostico delle mutazioni di JAK1 nelle LLA e in altre emopatie maligne pediatriche e dell'adulto;
- comprensione dei meccanismi molecolari alla base della disregolazione funzionale di JAK1 associata alle mutazioni identificate e la caratterizzazione del loro effetto sul *signalling* intracellulare;
- valutazione di JAK1 come possibile bersaglio molecolare per lo sviluppo di nuovi farmaci antitumorali.

### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio porterà alla delineazione della rilevanza clinica delle mutazioni somatiche di JAK1 nelle LLA e in altre emopatie maligne e alla comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nella disregolazione funzionale di JAK1 con ruolo nella patogenesi e/o progressione leucemica.

### **Trasferibilità dei risultati**

Nonostante i recenti progressi nel trattamento delle LLA in età pediatrica, la risposta alle terapie correnti rimane insoddisfacente negli adulti. Gli obiettivi del presente progetto rispondono alla necessità di sviluppare nuovi approcci diagnostici, prognostici e terapeutici per le LLA dell'adulto.

Le conoscenze acquisite renderanno disponibili nuove metodologie di screening molecolare mirate a un miglior inquadramento diagnostico e prognostico delle LLA. La comprensione del ruolo funzionale delle mutazioni oncogeniche di JAK1 in modelli *in vitro* e l'identificazione di specifici inibitori della chinasi consentiranno di direzionare la ricerca verso lo sviluppo di nuovi approcci farmacologici bersaglio-specifici.

Accanto alla ricaduta clinica a breve e medio termine, le conoscenze acquisite contribuiranno a una miglior comprensione degli eventi molecolari sottostanti la leucemogenesi.

## **Nuovi biomarcatori per monitorare i pazienti con tumore alla prostata e facilitare le scelte terapeutiche**

Nell'ultimo ventennio la possibilità di dosare nel sangue il marcatore *Prostate Specific Antigen* (PSA) ha favorito la diagnosi precoce, diminuendo la mortalità della malattia, ma di fatto aumentando la morbilità dovuta agli effetti collaterali del trattamento chirurgico. Comunque, il PSA non può considerarsi un marcatore specifico di cancro prostatico, ma un indicatore utile per impostare eventuali ulteriori accertamenti diagnostici. Sottoponendo al test del PSA tutti gli uomini adulti, si rischia di sottoporre a diagnosi e terapie eccessive (con la biopsia, la chirurgia, la radioterapia e i farmaci) anche i pazienti che non necessiterebbero di intervento. Sono necessari nuovi *biomarker* per ben caratterizzare il tumore e per individuare i cancri che produrranno forme resistenti alle terapie o metastatiche. Risultati preliminari prodotti nel nostro gruppo mostrano che è possibile isolare esosomi organo-specifici. Abbiamo dimostrato che gli esosomi contengono miRNA e proteine. Abbiamo successivamente iniziato la raccolta di plasma da pazienti con carcinoma prostatico nelle differenti fasi della storia naturale della malattia compreso il momento diagnostico, il periodo perichirurgico, alla prima evidenza di recidiva biochimica e infine nella fase di svincolamento dalla dipendenza ormonale. Il progetto si propone di collezionare plasmidi/esosomi-cancro specifici di pazienti con varie caratteristiche e di valutare il profilo di espressione di miRNA e proteine associate ad ogni fase della malattia.

### **Risultati attesi nel triennio**

La fase di raccolta seriale di campioni biologici sarà propedeutica, unitamente al database elettronico già creato di raccolta dati inerenti le caratteristiche clinico-patologiche e il follow-up, a studi di correlazione tra specifici *profiling* di miRNA esosomiali e outcome clinici. In particolare verrà valutata: i) la concordanza tra specifici profili, ii) l'aggressività della malattia in termini di recidiva a distanza, iii) il viraggio verso la fase di ormonorefrattarietà, iv) la velocità della progressione scheletrica, v) i fenomeni di resistenza acquisita e refrattarietà al TXT. In definitiva ci aspettiamo di ottenere informazioni rilevanti, in grado di impattare profondamente sul management di questi pazienti, dirimendo i dubbi che spesso influenzano l'atteggiamento terapeutico (trattamento aggressivo o vigile attesa, terapia medica perioperatoria o terapia locale esclusiva, anticipazione o meno della terapia sistemica ecc.).

Il piano sperimentale prevede:

- I plasmidi, campioni istologici e le informazioni cliniche relative ai pazienti saranno fornite dai gruppi del Dipartimento di Urologia, Ospedale San Giovanni di Torino, e dell'Istituto Tumori Regina Elena di Roma.
- La valutazione dell'espressione di specifici microRNA negli esosomi sarà realizzata attraverso saggi di PCR quantitativa (*Applied Biosystem*).
- Tecniche di *reverse-phase* e proteomica verranno usate per valutare le proteine differenzialmente espresse.

### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto si propone di individuare nuovi biomarcatori per monitorare i pazienti e garantire una corretta scelta della terapia.

**Profili di espressione tissutale ed esosomiale di microRNA associati al cancro come nuovi parametri prognostici nella valutazione del rischio individuale in pazienti affetti da cancro alla prostata e come bio-marcatori per la valutazione di agenti molecolari bersaglio**

Il cancro alla prostata (CP) è maggiormente diagnosticato mediante il test del PSA e/o mediante esplorazione rettale seguita da biopsia locale. Il controllo dei livelli di PSA ha reso più facile diagnosticare il CP (soprattutto nei primi stadi tumorali), ma non è uno strumento del tutto certo. La maggiore sintesi di PSA non occorre solamente in caso di tumore ma anche durante un'infezione o il semplice ingrossamento della ghiandola prostatica.

I miRNA controllano numerosi processi cellulari e sono coinvolti nel cancro. Alcuni miRNA promuovono la tumorigenesi mentre altri favoriscono l'acquisizione del fenotipo metastatico. Il miR-146a blocca la traduzione del recettore CXCR4 nei tumori del sangue e, inoltre, diminuisce l'invasività delle cellule del cancro alla prostata.

Le cellule tumorali rilasciano dei microvescicole/esosomi capaci di trasportare una varietà di molecole, come mRNA, miRNA e persino oncogeni attivi. I miRNA circolanti possono essere indice di un fenotipo tumorale.

In questo progetto studieremo la possibile correlazione tra microRNA di tessuti ed esosomi, trascrittoma e profilo d'espressione proteica di pazienti affetti da diversi stadi di CP. Ci concentreremo sul miR-146a e sul suo bersaglio CXCR4 per ottenere informazioni di natura molecolare da utilizzare nel futuro per la sperimentazione di nuovi inibitori dei miRNA, come strumento terapeutico alternativo.

**Risultati attesi nel triennio**

Studiare i microRNA contenuti negli esosomi di derivazione tumorale per capire l'intrinseca eterogeneità del cancro alla prostata, può rappresentare un utile strumento per la valutazione dell'efficacia di farmaci "canonici" e sperimentali (terapia ormonale, terapia mirata) in una popolazione di pazienti altamente selezionati.

Intendiamo studiare se molecole note coinvolte nella patobiologia delle metastasi ossee possano essere nuovi bersagli del miR-146a. In linea col nostro scopo, abbiamo già dimostrato che CXCR4 è un target del miR-146a nel sistema ematopoietico, così come nelle cellule del cancro (come indicato dai nostri dati preliminari ottenuti su cellule derivanti dal tumore alla mammella e all'ovario). Inoltre, numerose evidenze suggeriscono che CXCR4, in seguito al legame col suo ligando esclusivo CXCL12, permette alle cellule del cancro alla prostata di migrare. Tale risposta migratoria sfrutta un gradiente di chemochine, essendo CXCL12 prodotto in maniera costitutiva nella maggior parte dei siti di lesioni metastatiche, come le ossa.

Provare a capire, studiandone il *pathway*, se CXCR4 e miR146a possano essere nuovi e specifici marcatori per la distinzione tra le forme indolenti e aggressive del cancro, potrebbe aiutare a trovare e/o ad ottimizzare test di screening che risultino meno invasivi e potrebbe essere utile nel chiarire gli eventi genetici e molecolari che si verificano nella tumorigenesi, così da sviluppare nuove terapie.

**Trasferibilità dei risultati**

Se da un lato la valutazione del livello di PSA ha agevolato l'identificazione degli stadi precoci del tumore alla prostata, dall'altro lato essa ha portato anche a diagnosi errate, a trattamenti non ideali e ha aumentato altresì il costo della sanità pubblica nazionale. Infatti, il test del PSA non permette di discriminare tra un'ipertrofia prostatica benigna e forme tumorali aggressive. È innanzitutto per questo motivo che si ha la necessità di scoprire nuovi marcatori molecolari che siano non solo in grado di identificare e monitorare le cellule cancerose, ma anche di fornire una valutazione accurata del rischio individuale.

### **RASopatie: studi di correlazione genotipo-fenotipo**

Le RASopatie sono un gruppo di disordini dello sviluppo clinicamente correlati, caratterizzate da difetti cardiaci congeniti, dismorfismi facciali, bassa statura e deficit cognitivi. L'evento patogenetico di queste malattie è rappresentato da mutazioni in geni che codificano per trasduttori del segnale che partecipano alla via RAS/MAPK. Primi studi di correlazione genotipo-fenotipo suggeriscono che le mutazioni nei diversi geni sono riconducibili a quadri clinici distinti. Nella sindrome di Noonan, la più frequente di queste malattie genetiche, le mutazioni del gene PTPN11 sono associate a stenosi della valvola polmonare, mentre quelle dei geni KRAS e BRAF sono riscontrate in soggetti con quadro clinico generalmente più grave e quelle di RAF1 sono associate a cardiomiopatia ipertrofica.

Sulla base delle precedenti osservazioni, sarà condotto uno studio finalizzato alla definizione delle correlazioni genotipo-fenotipo. In particolare, coorti di pazienti con quadro clinico riconducibile alle RASopatie saranno genotipizzate per l'intero pannello di geni implicati in queste malattie. La ricerca utilizzerà banche biologiche disponibili presso centri di riferimento nazionali ed europei. La dettagliata caratterizzazione clinica dei campioni inclusi nello studio consentirà di delineare lo spettro fenotipico associato alle mutazioni nei diversi geni identificati e le eventuali correlazioni genotipo-fenotipo con rilevanza clinica.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio porterà alla delineazione di correlazioni genotipo-fenotipo con rilevanza clinica e a definire con più precisione le caratteristiche cliniche legate a ogni gene mutato.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Lo studio permetterà di sviluppare *flow-chart* diagnostiche e protocolli di follow-up volti a ottimizzare la gestione del paziente.

### **Ricerca di nuovi geni coinvolti nella deregolazione di vie di trasduzione del segnale nella patogenesi e progressione leucemica**

La trasduzione del segnale ha un ruolo cruciale nel controllo del comportamento proliferativo, differenziativo e metabolico della cellula. Alterazioni di tale network contribuiscono in maniera sostanziale alla trasformazione neoplastica. I recenti progressi nella caratterizzazione degli eventi di disregolazione delle vie di trasduzione del segnale, come eventi molecolari causali nell'oncogenesi, hanno fornito nuovi strumenti per una corretta diagnosi e aperto nuove vie per un trattamento mirato delle neoplasie attraverso lo sviluppo di strategie terapeutiche specificamente dirette contro gli eventi molecolari responsabili.

Lo studio, volto all'identificazione di nuovi eventi molecolari coinvolti nella patogenesi e progressione leucemica, utilizzerà strategie sperimentali basate sul sequenziamento dell'esoma e di geni candidati codificanti per proteine con ruolo nelle vie di trasduzione del segnale selezionati mediante analisi di biologia dei sistemi. La ricerca utilizzerà banche biologiche disponibili presso centri di riferimento nazionali per la popolazione pediatrica e adulta. La dettagliata caratterizzazione clinica, citogenetica e molecolare dei campioni inclusi nello studio consentirà di valutare la rilevanza clinica e il significato prognostico delle lesioni molecolari identificate. Saranno inoltre intrapresi studi biochimici e di biologia cellulare per la caratterizzazione funzionale delle lesioni molecolari identificate sulla specifica via di trasduzione.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio porterà all'identificazione di nuovi meccanismi molecolari aventi un ruolo nella patogenesi e/o progressione leucemica.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati dello studio consentiranno, in linea di principio, l'individuazione di nuovi bersagli molecolari per terapie biologiche mirate.

### **Ruolo dei segnali trasmessi attraverso i *pathogen recognition receptor* (PRR) e del *cross-talk* tra epitelio e cellule dell'immunità innata nella regolazione dell'omeostasi intestinale e nello sviluppo dell'infiammazione cronica**

L'incidenza delle malattie infiammatorie intestinali (*Inflammatory Bowel Diseases*, IBD), quali il morbo di Crohn e la colite ulcerosa, è in crescente aumento. L'infiammazione cronica in queste patologie è ritenuta un fattore di rischio per lo sviluppo di tumori del colon. Nonostante l'eziopatogenesi delle IBD sia ancora poco definita, le disfunzioni immunologiche a livello della mucosa intestinale e l'interazione di quest'ultima con la flora commensale sembrano giocare un ruolo. Il presente progetto si propone di verificare l'ipotesi secondo cui un'aberrante stimolazione dei PRR nelle cellule epiteliali intestinali (IEC) altera il *cross-talk* tra IEC e cellule immuni determinando uno *shift* da tolleranza immunologica a infiammazione cronica. Il progetto si articolerà in tre obiettivi principali:

- Caratterizzazione degli effetti della stimolazione di singoli o multipli PRR su profilo metabolico, funzione di barriera e proprietà secretorie delle IEC.
- Definizione del contributo del microambiente delle IEC nel regolare reclutamento, differenziamento e proprietà funzionali delle cellule dell'immunità innata (monociti, DC, linfociti T gamma delta).
- Correlazione tra stato infiammatorio mucosale nei pazienti IBD, composizione della microflora intestinale e alterazioni immunologiche sistemiche.

Lo studio sarà effettuato su biopsie coloniche e campioni di sangue di pazienti con IBD e donatori sani e su una linea di IEC polarizzate come modello di epitelio intestinale normale.

### **Risultati attesi nel triennio**

Gli studi proposti permetteranno di identificare specifici ligandi, o combinazioni di ligandi, di PRR capaci di alterare la risposta metabolica e secretoria delle IEC, e di indurre il reclutamento/differenziamento di popolazioni immuni con caratteristiche infiammatorie, determinando così lo *shift* da tolleranza a infiammazione cronica. Ci attendiamo in particolare che PRR finora poco considerati, quali quelli coinvolti nel riconoscimento di microorganismi virali e fungini, possano giocare un ruolo importante.

Sulla base dei nostri studi precedenti sui linfociti T gamma delta, ci proponiamo di comprendere il ruolo di questo subset linfocitario nel contesto dell'infiammazione intestinale, considerando l'importanza che sta assumendo come fonte innata di IL-17/IL-22. Queste evidenze saranno complementate da studi paralleli in corso volti alla comprensione degli effetti di trattamenti immunosoppressivi (quali vitamina D3 e lattoferrina) sulle funzioni di queste cellule.

Attraverso l'NMR, ci si attende di identificare cambiamenti IBD-associati nei *pathway* metabolici mucosali che potrebbero non solo aumentare le nostre conoscenze sulla patogenesi di queste malattie ma anche portare all'identificazione di metaboliti specifici come potenziali biomarcatori. Questo studio fornirà inoltre informazioni importanti sulla correlazione tra lo stato metabolico delle IEC nei pazienti con IBD, il tipo di risposta immune indotta e la composizione della flora intestinale.

### **Trasferibilità dei risultati**

La ricerca proposta è essenzialmente di base, senza immediate ricadute nella pratica clinica. Tuttavia, questo studio ha il potenziale di chiarire meccanismi molecolari e interazioni cellulari responsabili dello squilibrio immunologico osservato in pazienti con

IBD. I risultati ottenuti consentiranno l'identificazione di nuovi circuiti regolatori, PRR-mediati, che coinvolgono *pathway* metabolici, mediatori solubili e interazioni cellulari che contribuiscono all'infiammazione intestinale. L'acquisizione di queste conoscenze potrebbe contribuire, a lungo termine, a definire nuovi bersagli per interventi terapeutici mirati a ripristinare l'omeostasi intestinale, così come all'identificazione di nuovi marcatori diagnostici per le IBD e predittivi per il tumori del colon ad esse associato. Inoltre, questo studio genererà informazioni più generali sui meccanismi che regolano l'equilibrio tra immunità e tolleranza, che potrebbero essere applicate ad altri modelli di infiammazione.

### **Ruolo del fattore di trascrizione Gata1 nell'ematopoiesi normale e patologica, incluse le sindromi mieloproliferative**

Il Dipartimento di EOMM è tra i pionieri nell'identificazione del ruolo determinante svolto dal fattore di trascrizione Gata1 nella corretta differenziazione di cellule eritroidi (EC) megacariocitarie (MK) e mastocitarie (MT) e nella corretta funzionalità di cellule staminali (*Stem Cell*, SC) e progenitori emopoietici (EPC). Alterazioni strutturali ereditarie di Gata1 determinano anemie e piastrinopenie congenite, tra cui alcune talassemie. Alterazioni somatiche nella struttura e nei livelli d'espressione di Gata1 sono invece associate a leucemie e sindromi mieloproliferative, tra cui la mielofibrosi primaria (PMF), neoplasia mieloproliferativa caratterizzata da patologica interazione tra SC e microambiente midollare dovuta ad un difetto nell'espressione del fattore di trascrizione Gata1 nei MK. Topi portatori di mutazione ipomorfica *Gata1<sup>low</sup>* sviluppano, nel tempo, una forma di mielofibrosi identica a quella di pazienti affetti da PMF. La PMF fa parte delle MPD (*Phneg chronic Myeloproliferative Disorder*) di cui fanno parte policitemia vera (PV) e trombocitopenia essenziale (ET). Numerose nostre ricerche sono state, e alcune lo sono tutt'ora, finanziate da numerosi enti di ricerca tra cui Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC), progetto Italia-USA, NIH e CNS. Nei prossimi tre anni, si utilizzerà il modello murino *Gata1<sup>low</sup>* per definire i meccanismi patobiologici alla base del traffico anormale delle SC/EPC e dello sviluppo di ematopoiesi extramidollare per identificare strategie stadio-specifiche per la cura di questa malattia.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Si propongono per i prossimi tre anni i seguenti obiettivi specifici:

- Dimostrare che la mutazione *Gata1<sup>low</sup>* è direttamente responsabile per lo sviluppo della mielofibrosi nel modello murino della malattia e chiarire se alterazioni simili siano presenti anche nei pazienti con mielofibrosi idiopatica.
- Definire il ruolo esercitato da MK alterati nello sviluppo non solo della fibrosi midollare ma anche nell'intero quadro delle alterazioni che accompagnano lo sviluppo della malattia.
- Caratterizzare l'estensione delle anomalie nella mobilizzazione e traffico delle cellule staminali e dei progenitori indotte dalla mutazione ipomorfica *Gata1<sup>low</sup>*.
- Identificare agenti farmacologici per il trattamento di ciascuno stadio della malattia nei topi *Gata1<sup>low</sup>*.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Come già fatto in passato, i risultati prodotti saranno trasferiti alla comunità scientifica come pubblicazioni scientifiche, alle associazioni dei pazienti e al servizio sanitario nazionale in quanto identificheranno possibili target terapeutici nelle malattie mieloproliferative e nelle allergie.

## **Ruolo della chemochina CCL2 nella regolazione di fattori dell'ospite coinvolti nella resistenza/permmissività all'infezione da HIV-1 di monociti/macrofagi**

I monociti/macrofagi svolgono un ruolo importante nell'infezione da HIV. Sono, infatti, tra le prime cellule a essere infettate *in vivo* e rappresentano importanti veicoli di trasmissione e serbatoi di virus. Diversi fattori regolano la replicazione di HIV in queste cellule. Tra questi, fattori di restrizione intracellulari innati e mediatori solubili della risposta immune, quali citochine e chemochine, contribuiscono a determinare il grado di resistenza/suscettibilità all'infezione e di replicazione del virus. In questo ambito, il nostro gruppo da alcuni anni si interessa allo studio del ruolo della chemochina CCL2 nell'infezione da HIV-1 dei macrofagi. I nostri studi hanno dimostrato che la CCL2 prodotta dal macrofago rappresenta un fattore autocrino che promuove la replicazione del virus. Nel prossimo triennio proseguiamo ed estenderemo tali studi, focalizzandoci sull'analisi del ruolo della CCL2 nella regolazione di fattori di restrizione cellulari e dell'impatto sull'infezione da HIV-1. Sarà inoltre valutato l'utilizzo di farmaci che bloccano CCL2 o il suo recettore CCR2 per il controllo della replicazione di HIV-1. Infine, sarà condotta una caratterizzazione del ruolo svolto dalla CCL2 e da fattori di restrizione da essa regolati nella modulazione delle funzioni del monocita/macrofago e delle possibili implicazioni in altre patologie (tumori, malattie autoimmuni e infiammatorie).

### **Risultati attesi nel triennio**

Gli studi proposti porteranno ad una dettagliata caratterizzazione del ruolo della CCL2 nella regolazione di fattori cellulari importanti per il controllo dell'infezione da HIV e potenzialmente coinvolti anche nella patogenesi di altre malattie. In particolare, saranno definiti: i) l'effetto del blocco di CCL2/CCR2 sull'espressione di fattori di restrizione cellulari e il loro contributo alla modulazione della replicazione di HIV-1 CCL2-mediata; ii) il ruolo della CCL2 macrofagica nella trasmissione virale e nell'infezione dei linfociti T; iii) l'effetto del blocco di CCL2/CCR2 sull'espressione di trascritti e microRNA in cellule infettate *in vitro* o isolate da pazienti HIV positivi mediante analisi del trascrittoma; iv) l'effetto di farmaci che bloccano CCL2 o CCR2 sulla replicazione di HIV-1; v) il ruolo della regolazione di fattori di restrizione CCL2-mediata nell'espressione di fattori solubili e nelle funzioni del monocita/macrofago e il possibile impatto di tale regolazione nella patogenesi di altre malattie, in particolare di alcuni tipi di tumori e di malattie autoimmuni e infiammatorie. L'insieme di questi risultati contribuirà ad ampliare le conoscenze sui meccanismi mediante i quali la CCL2 svolge un importante ruolo di regolazione della risposta immune e su come questi meccanismi possano essere alterati nel corso di malattie infettive, autoimmuni, infiammatorie e nei tumori.

### **Trasferibilità dei risultati**

È atteso che quest'area di ricerca possa avanzare lo stato delle conoscenze attuali dei meccanismi attraverso i quali la CCL2 regola fattori e funzioni cellulari cruciali nelle risposte immuni fisiologiche e patologiche, portando così all'identificazione di nuovi bersagli terapeutici per il controllo di patologie di origine virale e immuno-mediate. Inoltre, la valutazione del potenziale terapeutico del blocco di CCL2/CCR2 per il controllo dell'infezione da HIV potrà rappresentare la base per l'applicazione clinica di questo approccio.

## **Studi sull'attività antinfiammatoria della lattoferrina bovina (bLf) sulle cellule della risposta innata e suo ruolo nel mantenimento dell'omeostasi intestinale e del ferro**

La lattoferrina (LF) è una glicoproteina secreta nei processi infiammatori con diverse proprietà che includono quella immunomodulatoria.

Le cellule della risposta innata (monociti/macrofagi e cellule dendritiche) svolgono un ruolo chiave nella induzione e definizione della risposta immune specifica in risposta alle infezioni e nel mantenimento dell'omeostasi in condizioni fisiologiche.

Evidenze recenti suggeriscono che alterazioni della flora batterica in associazione a processi infiammatori e perdita dell'integrità della mucosa intestinale possano predisporre all'insorgenza di malattie croniche infiammatorie di rilevante emergenza sanitaria quali il Morbo di Crohn (MC), la Colite Ulcerosa (UC) e il tumore del colon-retto. Studi *in vivo* e *in vitro* suggeriscono che la LF possa favorire la crescita dei Bifidobatteri, attenuare i sintomi della colite e stimolare la proliferazione delle cellule della mucosa.

L'attività di ricerca qui descritta si propone il raggiungimento dei seguenti obiettivi:

- dimostrare la capacità della bLf di modulare l'attività immunostimolante delle DC in risposta a stimoli pro-infiammatori;
- definire gli effetti della bLf sulla polarizzazione del monocita/macrofago verso M2 e sui target molecolari attivati dal monocita nei processi del trasporto cellulare del ferro;
- identificare i meccanismi attraverso cui la LF ristabilisce il normale equilibrio della mucosa intestinale.

### **Risultati attesi nel triennio**

Ci aspettiamo di:

- identificare i meccanismi attraverso cui la LF regola le attività immuni delle DC, i fattori/target molecolari coinvolti nella generazione e migrazione di popolazioni cellulari regolatorie;
- dimostrare possibili effetti della LF sui bersagli molecolari coinvolti nei meccanismi che favoriscono l'insorgenza dell'anemia infiammatoria (epcidina, ferroportina e fattori di trascrizione quali STAT3 e STAT5);
- comprendere i meccanismi d'azione attraverso cui la LF contribuisce al mantenimento dell'omeostasi intestinale studiando il suo ruolo nella infiammazione indotta dalla combinazione di diversi ligandi dei *Toll-like receptor*, in modelli cellulari *in vitro* (Caco-2) ed enterociti ottenuti da biopsie di pazienti affetti da MC e CU.

Riteniamo che i risultati ottenuti possano contribuire ad avanzare le nostre conoscenze dei meccanismi molecolari che legano l'omeostasi del ferro all'infiammazione aprendo nuove prospettive per lo sviluppo di interventi terapeutici più sicuri ed efficaci per il trattamento delle anemie con particolare riguardo alla anemia infiammatoria. Infine, la definizione degli effetti di un composto naturale quale la bLf nella riduzione dello stato infiammatorio e nel ripristino di una bilanciata attività della risposta immunitaria e dell'omeostasi intestinale potrebbe contribuire al disegno di interventi sanitari mirati alla cura delle malattie cronicoinfiammatorie.

### **Trasferibilità dei risultati**

Identificazione di nuovi target molecolari per interventi terapeutici mirati all'attenuazione dello stato infiammatorio alla base di molte patologie di rilevante emergenza sanitaria.

### **Studio del comportamento delle vitamine antiossidanti C, A, E in pazienti uremici cronici in trattamento con emodiafiltrazione online standard vs emodiafiltrazione con tecnica HFR standard e Supra**

L'infiammazione e lo stress ossidativo svolgono un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella progressione delle patologie correlate nel paziente uremico cronico in trattamento sostitutivo. La ridotta *clearance* di tossine uremiche e la perdita intradialitica di macro- e micronutrienti sono tra i fattori principali che sostengono l'infiammazione e che contribuiscono allo sbilanciamento redox. Questo studio si propone di verificare se metodiche emodialitiche di più recente introduzione quali quelle convettive-diffusive con reinfusione dell'ultrafiltrato rigenerato (*High Frequency of Recombination*, HFR) sono in grado di limitare la perdita intradialitica di vitamina C e/o modificare i livelli circolanti di importanti micronutrienti ad attività antiossidante (vitamine A, C, E). Il progetto è parte integrante di uno studio multicentrico al quale partecipano 28 centri dialisi dell'SSN dislocati in Italia centrale. In breve, 50 pazienti saranno reclutati in uno studio longitudinale della durata di dieci mesi e trattati sequenzialmente con emodiafiltrazione online (quattro mesi) e HFR standard o Supra (sei mesi). Ai tempi zero, quattro e dieci mesi, ad inizio e fine di una prima seduta dialitica settimanale saranno eseguiti prelievi di sangue e, in caso di HFR, di ultra filtrato pre- e post-cartuccia. I campioni prelevati, opportunamente trattati per garantire la stabilità degli analiti di interesse, saranno trasferiti presso l'ISS e processati per il dosaggio delle vitamine C, A, E mediante HPLC con rivelazione UV o fluorimetrica

#### **Risultati attesi nel triennio**

Verificare se le tecniche HFR con reinfusione dell'ultrafiltrato rigenerato rispetto alla emodiafiltrazione online comportino un risparmio intradialitico e/o una variazione stabile dei livelli circolanti delle vitamine antiossidanti C, A, E.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti consentiranno di individuare se e quali tecniche di emodiafiltrazione sono in grado di migliorare l'assetto antiossidante di pazienti uremici cronici in trattamento sostitutivo. Queste informazioni, insieme a quelle relative allo stato di infiammazione e al grado di depurazione da tossine uremiche a medio-alto peso molecolare ottenute nell'ambito dello studio multicentrico cui il presente progetto afferisce, potranno quindi essere utilizzate per ottimizzare la gestione del malato in dialisi da parte dell'SSN, con potenziali importanti ricadute positive sia sulla qualità di vita del paziente, sia sui costi sociali ed economici legati alla cura delle patologie correlate alla malattia renale.

### **Studio della neurodegenerazione associata alla malattia di Gaucher e studi funzionali di diversi mutanti della saposina C ricombinante**

Scopo dello studio sarà quello di comprendere i meccanismi molecolari alla base della neurodegenerazione presente in alcuni pazienti con malattia di Gaucher, dovuta a deficit della glucosilceramidasi o a deficit del suo attivatore, la Saposina (Sap) C. A tal fine utilizzeremo cellule di neuroblastoma differenziate in neuroni e trattate con conduritolo- $\beta$ -epossido (CBE), inibitore della glucosilceramidasi per mimare il deficit enzimatico, oppure trasfettate con costrutti contenenti il cDNA della Sap C mutata per sostituzione o delezione di una cisteina. Tali mutazioni sono state analizzate in fibroblasti di pazienti con deficit di Sap C. Essendo stata osservata in queste cellule un'alterata autofagia, verranno esaminati anche nei modelli neuronali i tre principali passaggi del processo autofagico: la formazione degli autofagosomi, la loro fusione con i lisosomi e la loro degradazione. Qualsiasi disfunzione autofagica potrebbe provocare accumulo di autofagosomi, morte cellulare e neurodegenerazione essendo le cellule neuronali non soggette a duplicazione.

Le forme mutanti della Sap C, presenti nei pazienti esaminati, saranno espresse in *E. coli*, purificate e caratterizzate al fine di comprendere le cause del loro alterato funzionamento e di stabilire eventuali correlazioni tra la mutazione e il fenotipo ad esso associato. Ci proponiamo, inoltre, di esprimere la Sap C *wild-type* in fibroblasti di pazienti con deficit di Sap C per tentare di ristabilire il normale processo catabolico lisosomiale.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I nostri studi potranno permettere di raggiungere i seguenti obiettivi:

- comprendere le basi biochimiche e molecolari della neurodegenerazione presente in pazienti Gaucher con mutazioni nel gene della glucosilceramidasi o con mutazioni nel gene della prosaposina a livello della regione che codifica per la Sap C;
- comprendere in che modo le diverse mutazioni influiscono sulla funzionalità della Sap C e se esiste una correlazione tra il tipo di mutazione e il fenotipo clinico. I nostri risultati potranno, inoltre, permettere di conoscere meglio il meccanismo d'azione di questo attivatore.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Attualmente le forme neurodegenerative della malattia di Gaucher vengono trattate con la *®substrate reduction therapy*, basata sull'uso di inibitori della biosintesi degli sfingolipidi. Tale trattamento non sembra essere molto efficace, come riportato in un recentissimo lavoro. I nostri risultati potrebbero essere utili per una la definizione di una nuova e più efficiente strategia terapeutica. Inoltre la comprensione dei meccanismi alla base della neurodegenerazione associata alla malattia di Gaucher permetterà di trasferire le nostre conoscenze ad altre malattie neurodegenerative a base genetica.

### **Tumore alla prostata: alla ricerca di nuove terapie**

Il tumore alla prostata è caratterizzato da una marcata dipendenza dagli ormoni nelle prime fasi. L'efficacia delle terapie basate sugli anti-androgeni è però limitata nel tempo in quanto con alta frequenza si sviluppano forme resistenti al trattamento. Necessitano pertanto nuove terapie che possano contribuire all'eradicazione del tumore specialmente nelle forme metastatiche.

Recentemente una famiglia di geni, miRs sono stati correlati con numerose patologie tra cui il cancro. Inoltre molti articoli mostrano come siano delle cellule chiamate cellule staminali tumorali ad essere responsabili della progressione del cancro. Nel nostro laboratorio è stato dimostrato che un'elevata percentuale di pazienti presenta una ridotta espressione di miR 15a e 16 e che questa correla con aumentata aggressività del tumore. Inoltre la ricostituzione di questi miRNA nel tumore *in vitro* e *in vivo* favorisce la regressione della massa neoplastica. Abbiamo isolato vari linee di staminali di tumore alla prostata. Il progetto si propone di creare nuovi approcci terapeutici basati o su inibizione/reintroduzione di miRNA o sull'identificazione di antigeni specifici per staminali tumorali e verso cui direzionare anticorpi a scopo terapeutico.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Sono previsti i seguenti risultati:

- Sviluppo di nuovi *tool* per diagnosi mediato da anticorpi e ottenuto su staminali di prostata.
- Sviluppo di terapie molecolari mirate all'inibizione del potenziale tumorigenico delle CSC:
  - Individuazione di nuovi trattamenti RNA mediati con oligo modificati (Antagomir)
  - Sviluppo di terapie molecolari mediato da anticorpi mirate all'inibizione del potenziale tumorigenico delle CSC.

- Sviluppo di nuovi composti nanoparticelle/oligo/ anticorpi mediati in collaborazione con un gruppo dell'Università di Losanna.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto si propone di individuare e sviluppare nuove terapie per le forme avanzate di tumore alla prostata

### **Valutazione della *storage lesion* delle emazie portatrici di difetti congeniti del globulo rosso: il deficit enzimatico di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) e il *trait sferocitico***

Dal momento che la sopravvivenza eritrocitaria è strettamente correlata allo stato metabolico e allo stato fisico della membrana, la presenza di un deficit di G6PD o di difetto congenito delle proteine del membrano-scheletro, rende la cellula più suscettibile allo stress ossidativo e alla denaturazione delle proteine di membrana e può accelerarne l'invecchiamento e la lisi. Le alterazioni che le emazie subiscono durante la conservazione a scopo trasfusionale condizionano l'efficacia e la sicurezza della trasfusione. Lo scopo di questa ricerca è studiare i meccanismi alla base della *storage lesion* delle emazie pre trasfusione e la loro sensibilità allo stress ossidativo. Saranno oggetto di studio globuli rossi con difetti congeniti ereditari sia da difetto enzimatico di G6PD che a carico della membrana eritrocitaria, comportanti alterazioni nella morfologia e nell'interazione tra le componenti proteiche del membrano-scheletro, al fine di paragonarne la velocità e l'entità della lesione rispetto all'invecchiamento normale (emazie controllo senza difetti congeniti) e comprenderne i meccanismi alla base della *storage lesion*. La valutazione complessiva dei dati metabolici, strutturali, reologici e morfologici associata a parametri funzionali permetterà di individuare percorsi specifici per le diverse anomalie e darà indicazioni sull'efficacia della trasfusione di tali preparati, i tempi reali di conservazione delle emazie con difetto congenito ai fini della trasfusione.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati di questa ricerca permetteranno di:

- fornire nuovi parametri strutturali e funzionali indicativi della reale vitalità delle cellule trasfuse ai diversi tempi di conservazione;
- approfondire le conoscenze sui meccanismi che sono alla base della lesione da conservazione;
- caratterizzare la sequenza temporale dei cambiamenti in deformabilità e aggregazione dei globuli rossi durante la preservazione, anche in funzione delle possibili alterazioni del flusso ematico a livello del microcircolo;
- definire la possibilità di emolisi post trasfusionale nei riceventi in relazione al tempo di conservazione.
- valutare l'effetto sulle emazie con difetto congenito di stress ossidativi per mimare *in vitro* l'effetto di condizioni che si possono presentare in circolo dopo reinfusione come ad esempio la somministrazione di farmaci ossidanti, condizione frequente nei pazienti sottoposti a trasfusione.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La ricerca darà indicazioni sulla possibilità e l'efficacia di trasfondere emazie con difetti congeniti, dirimendo un problema che si presenta nei paesi mediterranei in quelle zone con alta incidenza di tali difetti e permetterà di valutare l'opportunità e la rilevanza, a fini trasfusionali, di introdurre uno screening dei donatori per la presenza di tali difetti congeniti per evitare l'emolisi post trasfusionale nei pazienti riceventi.

**Dipartimento**  
**Ematologia, oncologia e medicina molecolare**

---

**Attività di controllo, valutazione, parere**



### **Accertamenti ispettivi relativi alle GMP**

Questa attività è svolta nell'ambito della convenzione tra AIFA e CRIVIB dell'ISS. Le ispezioni sono volte alla verifica della conformità ai principi delle norme di GMP. In relazione a questa attività, quattro persone del Dipartimento sono inserite nella lista di ispettori nazionali e svolgono in media dieci ispezioni annue ciascuno, in siti di produzione di sostanze farmacologicamente attive e di prodotti medicinali. Gli ispettori partecipano periodicamente a corsi di aggiornamento specifici.

#### **Attività programmata**

Si prevede il proseguimento di questa attività anche per il triennio 2012-2014.

### **Autorizzazioni in deroga riguardanti la sperimentazione animale**

Su richiesta del Settore Sperimentazione Animale (SSA) dell'ISS, il Dipartimento fornisce pareri scientifici su domande di autorizzazione in deroga alla sperimentazione animale presentate da istituzioni pubbliche e private al Ministero della Salute, secondo quanto stabilito dal DL.vo 16/1992. In particolare, secondo le proprie competenze, esamina protocolli inerenti a ricerche su ematopoiesi, cellule staminali e oncologia.

#### **Attività programmata**

Nel triennio 2009-2011 sono stati emessi pareri su circa 140 protocolli in totale, con un andamento in crescita dai circa 35 del 2009 ai circa 65 del 2011. In vista del recepimento da parte dell'Italia della nuova direttiva emessa dalla Comunità Europea nel luglio 2010, si prevede che il numero di protocolli soggetti ad approvazione da parte del Ministero, e conseguentemente del numero di pareri richiesti al Dipartimento dal SSA, sia destinato ad aumentare nel prossimo triennio 2012-2014.

### **Controllo di Stato degli emoderivati (*Batch release*)**

Il Decreto Ministeriale del 31 marzo 2008 (GU n. 90 del 16/4/2008) riguardante "Prescrizioni e procedure tecniche per l'esecuzione dei controlli dei lotti di medicinali immunologici e di medicinali derivati dal sangue e dal plasma umani" ha stabilito che devono essere sottoposti a Controllo di Stato, lotto per lotto, i medicinali derivati da sangue o da plasma umani in applicazione del DL 219 del 24/4/06. In qualità di "*Official Medicines Control Laboratory (OMCL)*" per l'Italia, l'ISS, e in particolare il Dipartimento di EOMM, effettua il controllo dei medicinali emoderivati albumina, fattori della coagulazione, inibitori plasmatici e plasma virus-inattivato e partecipa al Network europeo dei Laboratori Ufficiali del Controllo dei Medicinali (OMCL Network). Per ogni lotto sottoposto a controllo vengono valutati l'adeguatezza della documentazione presentata dalla società produttrice ed effettuati saggi su tutti i parametri rilevanti ai fini della qualità e della sicurezza dei prodotti nel rispetto dei limiti stabiliti dalla farmacopea europea e della società produttrice. Al fine di armonizzare negli stati membri della Comunità Europea i processi di controllo degli emoderivati, l'EDQM ha elaborato una linea guida "*EU Administrative Procedure for Official Control Authority Batch Release (OCABR)*" nel quale si ribadisce, tra l'altro, il principio del mutuo riconoscimento del certificato di *Batch Release* rilasciato in ambito europeo dagli stati membri senza la possibilità di ripetere il controllo su un lotto già esaminato. Come previsto dal DM del 31/3/2008, il controllo degli emoderivati viene effettuato secondo la linea guida europea e per ogni lotto di emoderivato viene emesso un certificato di *Batch Release* attestante la conformità o non conformità del prodotto alle specifiche definite dalla Farmacopea europea. In accordo a quanto previsto dalla *EU Administrative Procedure for OCABR* è stato implementato un Sistema di Assicurazione

della Qualità secondo la norma UNI CEI EN ISO/IEC17025 (2005), relativa ai “Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura”, e il Reparto di Biochimica e biologia molecolare clinica che effettua il *Batch Release* è stato oggetto nel 2008 di audit europeo da parte dell’EDQM che ne ha attestato la conformità a tale norma con certificato del Consiglio d’Europa.

#### **Attività programmata**

Verranno sottoposti a controllo di stato circa 400 lotti/anno di emoderivati con la possibilità di effettuare i controlli sia su prodotto finito che con test in parallelo. Oltre all’attività di controllo dei lotti di emoderivati, verranno effettuati, in collaborazione con l’EDQM nel Network OMCL, studi collaborativi come Laboratorio di Riferimento per l’assegnazione dei valori a standard e preparazioni di riferimento internazionali.

### **Diagnosi di laboratorio di anemie emolitiche associate a difetti ereditari della membrana e degli enzimi eritrocitari**

Nell’ambito dell’attività di controllo il Reparto di Biochimica e biologia molecolare clinica svolge indagini specialistiche per la diagnosi di alcune anemie ereditarie incluse nel gruppo delle malattie rare (DM del 18/5/2001 n. 279), su richiesta di Centri ospedalieri afferenti all’SSN, tra cui sono compresi Centri di riferimento e Presidi della rete regionale delle malattie rare. Gli accertamenti diagnostici sono richiesti in quanto tali Centri non dispongono delle necessarie competenze specialistiche nel settore. Gli obiettivi diagnostici sono i seguenti: i) individuazione del deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) e identificazione della variante molecolare; ii) individuazione di deficit di altri enzimi eritrocitari; iii) individuazione di sferocitosi ed ellissocitosi ereditarie e caratterizzazione dei relativi difetti delle proteine di membrana. Le richieste hanno diverse motivazioni: i) diagnosi per i pazienti con sintomatologia clinica caratteristica; ii) studio di gruppi familiari con difetti genetici ereditari. Le ricerche diagnostiche effettuate nei nostri laboratori comprendono: i) esami di II livello per l’individuazione del difetto enzimatico mediante saggi di attività enzimatiche e intermedi metabolici eritrocitari, o della patologia di membrana mediante il test di fragilità osmotica e la valutazione della morfologia eritrocitaria su striscio di sangue periferico; ii) esami di III livello per la caratterizzazione molecolare del difetto di G6PD mediante analisi genica e del difetto di membrana mediante analisi elettroforetiche qualitative, quantitative e funzionale delle proteine di membrana e analisi della mappa peptidica dell’estratto di spettina dopo digestione triptica.

#### **Attività programmata**

Si prevede di svolgere attività di consulenza tecnico-scientifica secondo le richieste che perverranno dai presidi diagnostici e dai centri di riferimento ospedalieri afferenti alla Rete nazionale delle malattie rare, e di effettuare Corsi di formazione del personale sanitario dell’SSN sulle strategie diagnostiche e terapeutiche delle anemie emolitiche ereditarie.

### **Interrogazioni parlamentari**

Il Dipartimento EOMM svolge un valido supporto tecnico scientifico al Ministero della Salute sia formulando pareri in risposta ad interrogazioni parlamentari e quesiti posti dal Ministero su argomenti di competenza che con la partecipazione di esperti a Commissioni, Gruppi di lavoro, anche al fine dell’emissione e dell’aggiornamento della normativa, in particolare nel settore degli emoderivati.

#### **Attività programmata**

Si prevede il proseguimento di questa attività anche per il triennio 2012-2014.

## **Programma annuale controllo emoderivati, farmacovigilanza e pareri sulla sicurezza e qualità di emoderivati**

Sulla base del DL.vo 219/2006 relativo a “Attuazione della direttiva 2001/83/CE relativa ad un codice comunitario concernente i medicinali per uso umano”, e del DM 31/3/2008 (GU n. 90 del 16/4/2008) riguardante “Prescrizioni e procedure tecniche per l’esecuzione dei controlli dei lotti di medicinali immunologici e di medicinali derivati dal sangue e dal plasma umani” il Dipartimento EOMM, Laboratorio ufficiale per il controllo degli emoderivati, partecipa al Programma annuale di controllo sulle composizioni dei medicinali predisposto dall’AIFA effettuando i controlli post marketing degli emoderivati di competenza. Inoltre il Dipartimento effettua la farmacovigilanza su segnalazione di inefficacia o reazioni avverse relative a farmaci emoderivati ed eparine e fornisce pareri tecnico-scientifici sulle problematiche di qualità e sicurezza degli emoderivati. Tale attività riguarda sia attività di routine su quesiti posti dalle Ditte produttrici di emoderivati e su richiesta dell’AIFA ma anche su problematiche emergenti e urgenti in caso di *rapid-alert* a livello nazionale e internazionale nell’ambito degli emoderivati.

### **Attività programmata**

Verrà effettuato il controllo post marketing dei farmaci emoderivati plasma virus inattivato e fattori della coagulazione e la farmacovigilanza di farmaci emoderivati ed eparine. Verranno espressi pareri tecnico-scientifici sulle problematiche di qualità e sicurezza degli emoderivati su richiesta dell’AIFA e delle Ditte produttrici di emoderivati in relazione a problematiche emergenti in Italia o su medicinali emoderivati rilasciati nella Comunità Europea e commercializzati in Italia.

## **Valutazione di documentazione relativa a Plasma Master File per la produzione di emoderivati**

Le Società titolari di Autorizzazione all’Immissione in Commercio (AIC) di medicinali a base di emoderivati (come principi attivi o eccipienti) sul territorio nazionale, devono presentare il documento di Plasma Master File (PMF) e i successivi documenti di aggiornamento. La Società titolare di AIC di medicinali emoderivati presenta la richiesta di approvazione del dossier di PMF all’EMA e allo stato (*Reference Member State*) che è stato designato dall’EMA per la preparazione dell’Assessment Report. L’ISS da anni effettua l’attività di valutazione del dossier di PMF della Società Kedrion. Tale attività consiste nella preparazione di un Assessment Report che valuti annualmente i dati presenti nel dossier di PMF. Inoltre nel caso in cui la ditta effettui aggiornamenti al dossier, deve essere presentata la documentazione per approvazione. Tale attività ha il rispetto di una *time table* rigorosa con il fine ultimo del certificato di PMF rilasciato dall’EMA. Una volta ottenuta la certificazione EMA, le Società titolari di AIC di medicinali emoderivati devono presentare domanda di *Second Step* nei Paesi dove commercializzano i medicinali per i quali il PMF si applica.

### **Attività programmata**

Verranno redatti su richiesta dell’EMA gli Assessment Report al fine del rilascio del certificato EMA per il PMF esaminato.

Nel caso in cui la ditta decida di non presentare richiesta di valutazione del dossier di PMF all’EMA, la richiesta di valutazione del dossier di PMF deve essere inoltrata all’AIFA che acquisisce il parere tecnico scientifico dell’ISS.

### **Valutazione di dossier di registrazione (AIC) e variazioni dell'AIC riguardanti farmaci emoderivati in relazione a procedure nazionali, procedure europee centralizzate e di mutuo riconoscimento**

Il Dipartimento svolge un'importante attività di valutazione della qualità e sicurezza dei farmaci emoderivati e di interesse ematologico, per uso umano.

Nell'ambito delle procedure nazionali, sono stati valutati i dossier presentati per l'approvazione delle nuove AIC e le documentazioni presentate per variazioni di tipo I e II dei dossier di registrazione.

Nell'ambito delle procedure europee di mutuo riconoscimento e delle procedure decentralizzate e centralizzate, gli esperti del Dipartimento hanno valutato i dossier e le documentazioni per l'autorizzazione alla commercializzazione e per le variazioni di tipo I e II, in cui il nostro Paese è stato coinvolto come *Concerned Member State* o, più importante, come *Reference Member State*.

Sono stati emessi pareri tecnico-scientifici relativamente agli aspetti di qualità e sicurezza dei farmaci emoderivati (Fattore VIII, Fattore IX, Complesso protrombinico, Antitrombina, Colla di fibrina, Albumina, ecc.) e dei farmaci di interesse ematologico di pertinenza del Dipartimento.

I pareri delle attività sopra citate sono state richieste dall'AIFA, in base al DL.vo del 24/4/2006, n. 219.

L'AIFA ha richiesto anche pareri per il rinnovo delle AIC nazionali e centralizzate o di mutuo riconoscimento di medicinali emoderivati e farmaci oncologici di competenza del Dipartimento.

Ai sensi del Decreto del Ministero della Sanità del 13/5/1999, sono stati espressi su richiesta delle Aziende Ospedaliere, pareri tecnico-scientifici sulla qualità e sicurezza dei medicinali emoderivati e dei farmaci di interesse ematologico destinati alla sperimentazione clinica di fase IV.

Il numero medio di pareri tecnico-scientifici redatti in base alla documentazione relativa alle AIC dei prodotti medicinali emoderivati di competenza del Dipartimento è di circa 60 l'anno.

#### **Attività programmata**

Tutte le attività di valutazione della documentazione relativa alle AIC dei prodotti medicinali emoderivati di competenza del Dipartimento proseguiranno per il prossimo triennio. Tale attività rientrerà tra quelle previste dalla nuova Convenzione tra ISS e AIFA.

### **Valutazione di innocuità di farmaci oncologici e di medicinali emoderivati o ricombinanti di nuova istituzione e di terapie innovative da utilizzare nella sperimentazione clinica**

L'attività include la partecipazione di un esperto del Dipartimento ai lavori della Commissione di Comma C in qualità di membro e di esperto per il settore oncologico, ematologico, terapia cellulare e terapia genica e la valutazione della qualità e sicurezza pre-clinica e della idoneità dei protocolli clinici da utilizzare nella sperimentazione di fase I/II di medicinali oncologici di varie tipologie ammessi alla sperimentazione di fase I, in accordo al decreto del Ministero della Salute del 21/12/2007 n. 51.

L'attività comprende anche la valutazione della qualità e sicurezza preclinica e della idoneità dei protocolli clinici di medicinali emoderivati o prodotti mediante tecnologia del DNA ricombinante, ammessi alla sperimentazione di fase I, in accordo al decreto sopra citato. Tale attività è svolta dagli esperti designati del Dipartimento su richiesta della Segreteria di Comma C del Dipartimento del FARM dell'ISS.

Ai sensi del DPR 439/2001, del DL.vo 211/2003 e del DL.vo 200/2007, viene espresso parere anche sulla qualità e sicurezza dei lotti di farmaci emoderivati (principalmente fattori della coagulazione) da utilizzare in studi clinici di fase II/III. Tale richiesta è inoltrata all'ISS dal Comitato etico della struttura che intende svolgere lo studio clinico.

***Attività programmata***

Le attività suddette proseguiranno per il triennio 2012-2014.



**Dipartimento  
Farmaco**

---

**Attività di ricerca**



### **Alternative terapeutiche nel trattamento di malattie neurologiche (dolore, ansia, epilessia): ruolo dei sistemi oppioide, nocicettinergico e cannabinergico**

Alterazioni dei sistemi endogeni implicati nel controllo dell'eccitabilità cerebrale sono responsabili nell'eziopatogenesi del dolore, dell'epilessia e dei disturbi dell'umore. Sebbene gli oppiacei siano i farmaci più potenti nel controllo del dolore, alcune sindromi algiche, resistenti alle terapie convenzionali, rispondono al trattamento con antiepilettici. Il fatto che i farmaci analgesici, antiepilettici e ansiolitici, causano effetti indesiderati anche gravi, incoraggia la ricerca preclinica all'identificazione di nuovi composti privi di effetti indesiderati. Saranno studiati i meccanismi implicati nell'eccitabilità cerebrale, al fine di individuare strategie terapeutiche innovative per il controllo del dolore, dell'epilessia e dei disturbi dell'umore. È stato evidenziato che i sistemi della nocicettina (Nc)/recettore *Nociceptive Opioid Receptor* (NOP) e dei cannabinoidi/recettori CB1, CB2 modulano numerose funzioni fisiologiche. L'Nc e i cannabinoidi sono implicati nel controllo di funzioni cardiovascolari, del dolore, dell'epilessia, e dell'ansia. I ligandi del recettore NOP e dei recettori CB1/CB2 mostrano effetti analgesici, ansiolitici e anticonvulsivanti. Alla luce di tali evidenze saranno studiati gli effetti: i) analgesici, antiepilettici e ansiolitici di nuovi ligandi dei recettori oppioidi, NOP, CB1/CB2 in modelli sperimentali di dolore, ansia ed epilessia; e su ii) i mediatori infiammatori nei perfusati o nei tessuti con metodi biochimici e immunochimici.

#### **Risultati attesi nel triennio**

In precedenti lavori abbiamo evidenziato che la somministrazione con antagonisti del recettore NOP, produce di per sé un effetto antinocicettivo, ma non tolleranza analgesica. Inoltre, sia l'agonista che l'antagonista del recettore NOP prevengono la tolleranza analgesica indotta dalla morfina, mostrando proprietà anti-oppioidi. La nocicettina inoltre, previene la comparsa di convulsioni tonico cloniche indotte da oppioidi e da pentilentetrazolo. Abbiamo inoltre rilevato che il trattamento con agonisti dei recettori CB1/CB2 dei cannabinoidi induce analgesia. Sulla base di questi risultati è auspicabile attendersi che i ligandi del recettore NOP e dei recettori CB1/CB2 dei cannabinoidi esibiscano proprietà analgesiche, antiepilettiche e prevengono la tolleranza analgesica di agonisti oppioidi. La valutazione degli effetti di agonisti antagonisti dei recettori NOP, CB1/CB2 potrebbe condurre all'identificazione di nuove molecole con proprietà farmacologiche intrinseche prive di effetti collaterali, potenzialmente utili nel trattamento del dolore e dell'epilessia e della tolleranza.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La caratterizzazione o lo studio delle proprietà farmacologiche di agonisti selettivi per i recettori dei cannabinoidi CB1 e CB2, per il recettore NOP della nocicettina e oppioidi, e l'identificazione di molecole con attività analgesica/antinfiammatoria anti-ansia-anticonvulsivante, prive di effetti collaterali potrebbe contribuire allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche finalizzate al trattamento del dolore cronico delle sindromi epilettiformi dei disturbi dell'umore non rispondenti alle terapie convenzionali.

### **Applicazione di metodi cromatografici enantioselettivi nella sintesi organica e in campo biologico**

Il presente programma si articola in tre linee di ricerca principali:

- Inibitori di demetilasi istoniche LSD1 e LSD2. Recentemente sono stati riportati in letteratura alcuni interessanti studi sull'attività inibitoria della tranilcipromina (TCP) nei confronti di entrambe le demetilasi istoniche LSD1 e LSD2. La TCP è stata

individuata come un interessante *scaffold* per progettare nuovi inibitori e studiare il loro meccanismo di azione a livello molecolare. Per valutare se il riconoscimento molecolare di derivati di TCP possa avvenire in modo enantio- e/o diastereoselettivo è necessario disporre degli enantiomeri delle forme cis e trans.

- Politiofeni chirali elettroattivi. Recentemente il nostro gruppo di ricerca ha cominciato a sviluppare e studiare nuovi monomeri chirali a base tiofenica per la produzione di polimeri conduttori che abbinano alle proprietà di conduzione la capacità di discriminare fra due enantiomeri. Gli scopi di questo lavoro non si limitano alla sintesi e allo studio del monomero e del polimero racemo, ma si estendono anche alla sintesi e caratterizzazione dei polimeri derivanti dal sintone chirale enantiopuro.
- Sintesi e attività biologica di stereoisomeri di derivati spiro tiadiazolici chirali. Un altro importante target dei nostri studi è rappresentato da composti chirali eterociclici di tipo spiro ottenuti per ciclizzazione di tiosemicarbazoni di alchilcicloesani chirali in presenza di anidride acetica.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Per le tre classi di sostanze sopra elencate il nostro gruppo di ricerca si propone di:

- sviluppare sistemi HPLC enantioselettivi basati su fasi stazionarie chirali (FSC) polisaccaridiche da applicare nella separazione enantiomerica su scala analitica e semipreparativa;
- determinare la configurazione assoluta degli enantiomeri isolati mediante tecniche spettroscopiche;
- valutarne la stabilità stereochimica in differenti condizioni sperimentali (temperatura, solvente, ecc.).

#### **Trasferibilità dei risultati**

Pubblicazioni.

### **Costruzione di una lista di sintomi correlati alla qualità della vita della popolazione italiana con infezione da HIV (ISS-HIV-Symptom-Scale)**

Se il giudizio del medico è stato per lungo tempo l'unico fattore in grado di influire sulle decisioni sanitarie, in questi ultimi anni si è sentita la necessità di valutare anche il giudizio del paziente. Gli "esiti riportati dal paziente", o come più frequentemente si trova in letteratura, i "*patient reported outcome*" (PRO), svolgono un ruolo fondamentale, sia nella ricerca che nella pratica clinica. I PRO possono essere utilizzati per misurare concetti come lo stato di salute generale, la presenza di specifici sintomi e concetti molto complessi, come la HRQoL, misura multidimensionale che fa riferimento a tutti gli aspetti dello stato di benessere o malessere fisico, psicologico e sociale della persona. Nel campo della malattia da HIV, la valutazione dei PRO ha acquisito un'importanza crescente, posta in rilievo dalle linee-guida internazionali, secondo le quali il miglioramento della HRQoL è uno dei principali obiettivi della terapia antiretrovirale. Numerosi studi hanno dimostrato che la HRQoL dei pazienti con HIV è strettamente correlata alla presenza e all'intensità dei sintomi. È pertanto ipotizzabile che un efficace controllo della sintomatologia possa avere un effetto sul miglioramento della HRQoL. Lo studio si propone di realizzare uno strumento specifico per la popolazione HIV-positiva, che possa facilmente e con efficacia valutare i sintomi che maggiormente incidono sulla HRQoL di questa popolazione.

#### **Risultati attesi nel triennio**

L'obiettivo dello studio è quello di contribuire al miglioramento della valutazione dell'impatto della terapia antiretrovirale, sulla popolazione con HIV/AIDS, attraverso la

costruzione e validazione di una lista di sintomi (ISS-HIV-Symptom-Scale) strettamente correlati alla HRQoL.

La lista riguarderà specificamente la popolazione con infezione da HIV, sarà direttamente compilabile dal paziente e utilizzabile sia nella pratica clinica che in ambito sperimentale. Sarà inoltre costruita in modo da risultare breve, completa e agile nella compilazione.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il controllo periodico della sintomatologia permetterà di identificare il trattamento a lungo termine più adeguato, accrescere l'aderenza alla terapia e migliorare la comunicazione tra paziente e medico, con prevedibile ricaduta positiva sull'efficacia complessiva del trattamento nella popolazione con infezione da HIV.

### **Differenze di genere in patologia e senescenza: individuazione dei meccanismi e di nuovi target terapeutici**

I processi degenerativi cellulari possono esitare in una serie di modificazioni che determinano la senescenza o la morte della cellula. Queste modificazioni possono implicare alterazioni di espressione di numerosi geni nonché di specifiche proteine che indirizzano la cellula verso un processo di invecchiamento, di trasformazione neoplastica o attivano i processi di morte cellulare programmata. Il presente progetto prevede due diversi approcci al problema: uno prevede l'impiego di cellule in coltura di diverso istotipo mentre, ove possibile, in un secondo approccio sperimentale, vengono analizzate cellule *ex vivo* ottenute da soggetti sani o da pazienti con patologie che hanno come marker comune una alterazione dei processi di longevità cellulare o di apoptosi. Particolare attenzione verrà posta allo studio dei meccanismi coinvolti e alla individuazione di biosensori di rilevanza clinica e alle differenze uomo/donna.

La ricerca verrà effettuata in collaborazione con numerosi gruppi di ricerca italiani e stranieri.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Finalità del progetto sono:

- la valutazione in diversi sistemi cellulari di senescenza *in vitro* (cellule di diverso istotipo invecchiate o ingegnerizzate o ottenute da pazienti e stabilizzate *in vitro*) delle relazioni tra redox *imbalance*, degenerazione e suscettibilità ad apoptosi, e delle differenze di genere in questi processi;
- l'analisi dei meccanismi chiave nella suscettibilità cellulare a degenerazione e determinazione di parametri di possibile longevità o di morte cellulare in differenti istotipi;
- l'individuazione di *marker* diagnostici e prognostici in patologie umane redox-associate. Particolare attenzione verrà posta allo studio dei farmaci capaci di influenzare questi processi. L'insieme di queste ricerche dovrebbe fornire criteri di valutazione innovativi per ciò che riguarda la suscettibilità cellulare a fenomeni degenerativi e di invecchiamento.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti potranno fornire utili indicazioni sia sui meccanismi patogenetici che determinano tutte quelle patologie che hanno come *hallmark* una alterazione dei processi di autofagia, senescenza e apoptosi. Inoltre, l'individuazione di biosensori *real-time* potrebbe fornire utili parametri per uso diagnostico e/o prognostico. Gli studi di tipo farmacologico potranno infine favorire lo sviluppo di strategie terapeutiche innovative che tengano conto delle differenze di genere. I prodotti previsti sono essenzialmente: attività formative, brevetti e pubblicazioni.

**Disegno e sviluppo di una immunoterapia basata su anticorpi specifici per una efficace eradicazione del Sarcoma di Ewing's. Rilascio selettivo di radionuclidi a carattere diagnostico e terapeutico mediante anticorpi monoclonali umani in forma *single chain fragment variable* (scFv) capaci di legare unicamente cellule di EW's**

La terapia farmacologica convenzionale per il trattamento dello EW's è fortemente limitata dalla mancanza di selettività compromettendo l'utilizzo di concentrazioni di farmaco più elevate che, a fronte di un ipotetico miglioramento curativo, sono di fatto impedita a causa del manifestarsi di effetti avversi. Pertanto lo sviluppo di strategie terapeutiche che siano al contempo efficaci e ben tollerate dal paziente rappresenta uno dei più importanti obiettivi per sconfiggere questa forma di cancro che aggredisce il giovane paziente con forme di estrema malignità.

Un modo per migliorare la selettività di molecole curative consiste nel direzionarle nella sede tumorale e risparmiare in questo modo gli effetti tossici sui tessuti sani. Il determinante CD99 è un antigene abbondantemente espresso su cellule di EW's ma anche su altri tipi di tumore che su tessuti e cellule normali. Negli ultimi decenni un discreto numero di *monoclonal antibody* (mAbs) diretti verso la frazione extracellulare sono stati prodotti e caratterizzati per il riconoscimento dell'epitopo e per funzioni effettrici. Comunque il direzionamento selettivo di componenti bioattive verso lo EW's utilizzando questa classe di anticorpi presenta limitazioni assai severe che includono lo sviluppo di anticorpi umani contro anticorpi murini (*human anti-mouse antibody*, HAMA). Diversamente il direzionamento specifico di componenti bioattive implica il riconoscimento del *marker* tumorale che sia esclusivamente presente su cellule di EW's.

**Risultati attesi nel triennio**

La praticità delle librerie anticorpali come mezzo per generare anticorpi monoclonali umani in forma di scFv (27 kDa) corredati di elevata specificità verso antigeni tumorali è stata largamente utilizzata in questi ultimo decennio e più di 50 anticorpi di questa generazione sono correntemente in fase di sperimentazione clinica per la terapia di diverse patologie. L'efficienza di questa strategia che si basa su frammenti anticorpali è stata confermata dai nostri studi che hanno mostrato come scFv isolati dalla libreria ETH2 sono capaci di riconoscere specificamente e con discreta affinità cellule di melanoma di carcinoma polmonare e mammario. Per l'isolamento di anticorpi monoclonali in forma scFv diretti verso il CD99 abbiamo utilizzato una consolidata piattaforma biotecnologica che consiste nella selezione attraverso *biopanning* della libreria ETH2 su CD99 ricombinante utilizzato come proteina target. Gli scFv isolati dopo caratterizzazione biochimica e genetica sono stati testati mediante citofluorimetria per il riconoscimento di epitopi del CD99 su un esteso pannello di cellule derivanti sia da cellule di EW's sia da diverse varietà di tumori e cellule normali. Per una varietà di criteri vari anticorpi umani in forma scFv da noi isolati e derivati dalla libreria fagica ETH-2 sono diversi per specificità e funzioni effettrici da tutti gli altri anticorpi anti CD99 fin qui isolati e originati dalla tecnologia degli ibridomi.

**Trasferibilità dei risultati**

In particolare il clone C7, (sottoposto a copertura brevettuale) riconosce un epitopo o un sito di legame presente esclusivamente su cellule di EW's e non mostra nessuna cross-reattività su altri tipi di cellule sia normali che tumorali esprimenti lo stesso tipo di determinante. Le caratteristiche chimico-fisiche e di specificità permettono dunque una terapia mirata dello EW's attraverso il direzionamento di una larga varietà di molecole bioattive. Abbiamo programmato l'ottimizzazione del legame chimico di questo anticorpo C7 con radionuclidi I124 e I131 e, dopo conferma sperimentale che l' immunoconiugato

risultati efficace in sistemi cellulari sia *in vitro* che in xenotrapianti murini, intendiamo condurre studi per determinare il profilo tossicologico e di sicurezza dei composti su primati non umani per poter disegnare un nuovo modello di cura che abbia la potenzialità di eradicare la *residual minimal disease* nel paziente affetto da EW's per la diagnosi e terapia dello EW's.

## **ESTHER ITALIA**

Il Programma europeo ESTHER è stato creato nel 2001. L'accordo fondante è stato firmato a Roma, dai Ministri della Sanità italiano e francese.

Il Progetto prevede che strutture sanitarie di Paesi europei possano "gemellarsi" con altrettante strutture sanitarie africane, per portare avanti progetti comuni di assistenza ai malati affetti da HIV nei Paesi del Sud del mondo.

Il Progetto si è esteso a diversi Paesi europei (Spagna, Portogallo, Grecia, Germania, Norvegia, Lussemburgo) oltre all'Italia che ha da subito partecipato attivamente, anche grazie ad un finanziamento del Ministero della Salute all'ISS, che ha coordinato l'impegno del nostro Paese.

### **Risultati attesi nel triennio**

Obiettivo generale del progetto, in linea con il sesto obiettivo di Sviluppo del Millennio, è quello di contribuire a fermare e invertire la diffusione dell'infezione da HIV attraverso la realizzazione di attività finalizzate ad un maggior controllo della malattia in termini di assistenza e cura.

Obiettivo specifico è il miglioramento globale della presa in carico del paziente con infezione da HIV.

Per il raggiungimento dell'obiettivo specifico del progetto sono previsti i seguenti risultati attesi:

- miglioramento delle conoscenze e competenze cliniche del personale sanitario locale;
- miglioramento di modelli di intervento sanitario mirati alla diagnosi precoce e alla somministrazione della terapia;
- miglioramento del monitoraggio clinico e laboratoristico dei pazienti in terapia antiretrovirale;
- aumento della consapevolezza dei pazienti con HIV/AIDS riguardo all'efficacia della cura e all'importanza dell'aderenza alla terapia.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati prodotti andranno a beneficio della popolazione con HIV/AIDS dei Paesi dell'Africa sub-sahariana attraverso il miglioramento dei programmi di diagnosi precoce e cura globale della persona, nell'ambito di un progetto sostenibile nel lungo periodo.

## **Fattori di virulenza batterici e cancro del colon retto**

Il cancro del colon-retto è una delle forme più comuni di cancro ed è importante trovare metodi di screening per diagnosticare precocemente la malattia. Numerose infezioni batteriche croniche sono state indicate come possibile causa di trasformazione e ciò potrebbe avvenire tramite fattori di virulenza che colpiscono vie intracellulari mimando i promotori tumorali. Alcuni fattori batterici che possono essere ipotizzati come fattori di rischio neoplastico sono rappresentati da tossine in grado di causare danni al DNA e di bloccare il ciclo cellulare come il Cif (*Cycle Inhibiting Factor*) e la CDT (*Cytolethal Distending Toxin*) e un prodotto dell'isola genomica PKS (*polyketide synthase*). La tossina del *B. fragilis* (*B. fragilis Toxin*, BFT), attivando fattori coinvolti nella proliferazione, rappresenta un ipotetico

fattore di rischio tumorale come anche la tossina CNF1 di *E. coli* implicata nella protezione dall'apoptosi, nell'attivazione di *Nuclear Factor-KappaB* (NF-kB) e nell'alterazione del ciclo cellulare.

La ricerca si propone di verificare la presenza del gene per tali fattori nei polipi coloretali a diversi stadi della malattia. A tale scopo verrà isolato il DNA da biopsie e tramite PCR verrà analizzata la presenza dei geni per tali fattori. Verrà analizzata anche la possibilità che variazioni genetiche predisponenti al cancro del colon-retto contribuiscano alla formazione di tumori in presenza dei fattori di virulenza (in collaborazione con il *Karolinska Institute*, Svezia).

#### **Risultati attesi nel triennio**

In seguito all'analisi della presenza dei fattori di virulenza tramite PCR, valuteremo se esiste una correlazione tra i geni trovati e la patologia diagnosticata. Considerati i risultati preliminari ottenuti fino ad ora su un numero ristretto di campioni, e tenendo in considerazione alcuni dati presenti in letteratura, ci aspettiamo di trovare una associazione significativa tra i fattori di virulenza all'esame e lo sviluppo e la progressione della malattia. Inoltre, ci attendiamo di trovare una correlazione tra la presenza dei fattori di virulenza in esame e le variazioni genetiche predisponenti e lo sviluppo cancro al colon-retto.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'importanza di tale ricerca consiste nell'identificazione di gruppi di pazienti a diverso grado di rischio in funzione della presenza dei fattori di virulenza e delle variazioni genetiche predisponenti. Tutto ciò può contribuire a identificare nuovi *marker* diagnostici precoci e ad aprire prospettive per lo sviluppo di nuove strategie preventive contro tali tipi di tumori.

### **Fattori immunologici e virologici predittivi della risposta al trattamento con i nuovi farmaci contro l'epatite virale di tipo C (HCV)**

L'infezione causata dall'HCV è la causa principale di epatite cronica, cirrosi ed epatocarcinoma. Attualmente si ritiene che l'evoluzione clinica dell'infezione sia fortemente influenzata dalla risposta immunitaria dell'ospite. Infatti, sebbene nella fase acuta dell'infezione si sviluppi una risposta immune di tipo cellulare, la maggior parte dei pazienti evolve verso l'infezione cronica, caratterizzata da una forte riduzione delle risposte immuni.

L'introduzione di nuovi farmaci diretti verso bersagli virali specifici (DAA), offre l'opportunità di studiare pazienti che sono o verranno trattati con tali agenti e valutare se i loro effetti terapeutici siano sostenuti anche dalla modulazione della risposta immunitaria.

Tale progetto prevede l'analisi longitudinale del profilo immunologico dei pazienti HCV-infetti. Verranno inoltre analizzati alcuni parametri genetici e immunologici utili nella personalizzazione della terapia, tra cui IL-28, KIR, TLR che potrebbero essere coinvolti nella progressione della malattia e/o nella risposta al trattamento. Tramite un approccio traslazionale verrà valutata la correlazione tra le risposte immunologiche innate e adattative, l'evoluzione dell'infezione da HCV e la risposta al trattamento.

Il principale obiettivo è quello di individuare nuovi marcatori predittivi dell'evoluzione dell'infezione da HCV e della risposta al trattamento, in modo da sviluppare le necessarie conoscenze di base per ottimizzare l'approccio terapeutico.

#### **Risultati attesi nel triennio**

La genetica dell'ospite e la risposta immunitaria influenzano sensibilmente il corso naturale dell'infezione da HCV e la risposta al trattamento. Tuttavia, i meccanismi di azione e il loro impatto nella pratica clinica non sono stati ancora chiariti.

Nell'ambito di questo progetto verrà valutata la progressione della malattia utilizzando parametri clinici, virologici e immunologici, con l'obiettivo di prevedere per ogni singolo paziente l'effetto dei nuovi protocolli terapeutici. Verrà valutato se l'effetto terapeutico dei nuovi farmaci DAA è sostenuto da un effetto immuno-modulante.

I dati relativi ai parametri immunologici deriveranno da una coorte ristretta di pazienti, per essere successivamente allargati a coorti più ampie e infine applicati alla pratica clinica.

La definizione di biomarcatori predittivi di evoluzione della malattia aiuterà a costruire nuovi modelli matematici di risposta alla terapia. Inoltre può essere utile per definire strategie terapeutiche innovative, volte a migliorare le risposte immuni anti-virali e permettere quindi la completa guarigione dall'infezione.

La previsione dell'efficacia terapeutica potrebbe aiutare a ridurre gli effetti collaterali associati al trattamento, migliorando le potenzialità curative delle attuali terapie ed eventualmente suggerendo nuove possibilità immunoterapeutiche.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'infezione cronica da HCV è un rilevante problema riguardante la salute pubblica. L'introduzione dei nuovi farmaci DAA aumenterà le opzioni terapeutiche per ogni paziente e l'efficacia del trattamento. Tuttavia, a causa dell'emergenza di nuovi effetti collaterali e dei costi supplementari è necessario definire le condizioni ottimali di trattamento per ciascun paziente.

I risultati del presente progetto forniranno informazioni utili per ottimizzare l'approccio clinico e terapeutico nei pazienti HCV infetti. I fattori genetici dell'ospite, così come i parametri immunologici e virologici saranno utili nella diagnosi, gestione e comprensione della patogenesi, migliorando così i risultati clinici e il beneficio economico.

L'identificazione e la caratterizzazione di mutazioni di resistenza sarà cruciale per una corretta gestione e monitoraggio dei pazienti infetti da HCV e per impostare strategie terapeutiche con una maggiore probabilità di efficacia a lungo termine.

### **Identificazione di biomarcatori immunologici e biochimici di valore diagnostico, prognostico e terapeutico nella gestione della malattia di Kawasaki**

La malattia di Kawasaki (*Kawasaki Disease*, KD) è una vasculite multisistemica che colpisce neonati e bambini. L'esatta causa della KD è sconosciuta tuttavia, aspetti clinici ed epidemiologici suggeriscono fortemente un trigger infettivo in soggetti geneticamente predisposti. I meccanismi immunologici giocano un ruolo chiave nella insorgenza, nella progressione e nelle complicanze della KD e coinvolgono sia l'immunità innata che l'adattativa. Molti dati suggeriscono un coinvolgimento dello stress ossidativo in KD. Le piastrine sono elementi chiave nella patogenesi di KD. Il *cross-talk* tra piastrine e linfociti giocare un ruolo fondamentale nella trombosi, infiammazione e aterogenesi.

Scopo del progetto è definire biomarcatori immunologici e biochimici di valore prognostico da trasferire nella pratica clinica, in particolare:

- competenza immunologica delle cellule mononucleate del sangue periferico (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*, PBMC) valutando il fenotipo e le funzioni delle cellule immuni;
- parametri redox;
- *cross-talk* piastrine/linfociti per definire il ruolo di queste due popolazioni nella KD.

I pazienti con diagnosi di KD saranno reclutati all'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma. Il protocollo di ricerca sarà sottoposto per l'approvazione al comitato etico e dai

genitori dei pazienti sarà ottenuto il consenso informato scritto. Saranno inclusi controlli per età e sesso.

**Risultati attesi nel triennio**

Gli obiettivi principali di questi studi sono migliorare la caratterizzazione fenotipica, biochimica e funzionale della KD, allo scopo di identificazione nuovi biomarcatori di valore prognostico da trasferire nella pratica clinica.

Questi biomarcatori potrebbero essere rilevanti per migliorare la diagnosi della KD e per selezionare i pazienti a rischio di complicanze o resistenti alla terapia standard.

**Trasferibilità dei risultati**

L'identificazione di biomarcatori coinvolti nella immunopatogenesi della malattia potrebbe essere rilevante per stabilire la loro possibile relazione con la progressione della malattia. Questo può essere importante nel monitoraggio e caratterizzazione dei processi della malattia al fine di chiarire l'immunopatogenesi della KD. La comprensione dei meccanismi cellulari responsabili dell'attivazione immunitaria e dell'infiammazione delle arterie coronariche, la disregolazione delle citochine e delle chemochine, così come l'interazione tra piastrine e linfociti, potrebbe supportare l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici per migliorare le terapie e ridurre la morbilità e la mortalità nei bambini con KD.

**Identificazione di nuovi bioindicatori genere associati in patologie con complicanze vascolari**

L'obesità addominale, l'ipertensione, l'insulino-resistenza e la dislipidemia sono un insieme di fattori ad alto rischio cardiovascolare.

È importante sottolineare che alcuni di questi fattori sono associati con una maggiore aggregazione dei globuli rossi, probabilmente legata all'espressione di alcune molecole quali la fosfatidilserina (fosfolipide di membrana coinvolto nella morte programmata del globulo rosso) e la Glicoforina A (proteina coinvolta nell'invecchiamento del globulo rosso) nonché alla presenza di molecole di adesione nel sangue. In uno studio precedente abbiamo dimostrato che, i radicali liberi e le specie reattive quali il perossinitrito sono in grado di alterare sia la plasticità eritrocitaria, fondamentale per il mantenimento della forma e della funzionalità di questa cellula, che l'espressione della fosfatidilserina e della glicoforina A.

Sulla base dei dati già ottenuti, ci proponiamo di individuare, nuovi bioindicatori plasmatici e cellulari, che possano essere predittivi sia della progressione di patologie con complicanze vascolari che della risposta ad un trattamento farmacologico.

Inoltre, considerando che le caratteristiche cliniche della donna differiscono da quelle dell'uomo, lo studio sarà focalizzato sull'individuazione di marker che sono alla base delle *gender difference*.

**Risultati attesi nel triennio**

Individuazione di molecole o cellule del sangue periferico da utilizzare come *marker* diagnostici o prognostici o di progressione di patologie con complicanze vascolari.

**Trasferibilità dei risultati**

Individuazione, nel caso in cui venisse confermata la differenza di genere sia in termini di caratteristiche biologiche che di evoluzione della patologia, di percorsi terapeutici che mirino ad un miglioramento dell'outcome clinico anche attraverso l'apporto di cure differenziali.

## **Il CNF1 come farmaco innovativo per la terapia di patologie del sistema nervoso centrale: dalla ricerca di base alla preclinica**

Difetti in processi cellulari dipendenti dalle Rho GTPasi sono alla base di diverse patologie umane, incluse alcune a carico del sistema nervoso centrale.

Abbiamo dimostrato che la proteina CNF1 di *E. coli*, attivando le Rho GTPasi, aumenta le capacità cognitive sia in topi *wild-type* (PNAS, 2007) che in modelli murini di una malattia rara, la sindrome di Rett (NPP, 2011). Inoltre, il CNF1 induce un aumento della plasticità sinaptica nella corteccia visiva di ratti adulti (*J Neurosci*, 2011) e un ripristino della struttura astrocitaria nell'ippocampo di topi Rett (NPP, 2011). Sulla base di tali premesse, abbiamo avviato i seguenti progetti:

- sviluppo di nuove terapie in:
  - modelli sperimentali del Morbo di Alzheimer e di epilessia, in collaborazione con l'Università "Alma Mater" di Bologna;
  - modelli sperimentali della sindrome dell'X-fragile, nell'ambito di un progetto E-rare;
  - modelli sperimentali *in vitro* di mitocondriopatie, in collaborazione con l'Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù" di Roma.
- studio dei meccanismi molecolari alla base:
  - dell'aumentata plasticità sinaptica indotta dal CNF1 in colture primarie di ratto, in collaborazione con il Dipartimento di BCN;
  - del ripristino dell'omeostasi metabolica indotta dal CNF1 in colture primarie di cellule provenienti dalle cripte intestinali di ratto (bersaglio naturale della tossina).

### **Risultati attesi nel triennio**

Per quanto riguarda gli studi condotti su colture primarie (di ratto o topo) trattate con il CNF1, ci attendiamo informazioni sul ruolo svolto dalle Rho GTPasi:

- sul differenziamento e lo sviluppo dell'albero dendritico,
- sulla formazione di sinapsi e sul *signalling* intracellulare,
- sui meccanismi fusione-fissione mitocondriale e aumento della produzione energetica cellulare (ATP).

Dagli studi su fibroblasti umani provenienti da pazienti con mitocondriopatie, ci attendiamo una valutazione del CNF1 come possibile farmacoterapia per recuperare l'omeostasi metabolica. Le mitocondriopatie in oggetto sono malattie rare da deplezione del DNA mitocondriale.

Dagli studi condotti su animali da esperimento ci attendiamo una possibile valutazione pre-clinica dell'efficacia del CNF1 nel contrastare:

- la neuro infiammazione e il deficit cognitivo del morbo di Alzheimer su modelli murini transgenici.
- i fenomeni epilettiformi in modelli murini di *petit mal* e di *gran mal*;
- almeno alcuni dei deficit dello spettro sindromico della sindrome dell'X-fragile. Tale sindrome è considerata paradigmatica per altri disordini del neurosviluppo, quindi un possibile effetto terapeutico del CNF1 potrebbe essere esteso ad altre sindromi accompagnate da ritardo mentale.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati prodotti da questi studi potrebbero rivelarsi utili per proporre il CNF1 come farmaco "innovativo" nel campo delle malattie neurodegenerative e del neurosviluppo, data la sua specificità d'azione e la sua comprovata capacità di modulare le Rho GTPasi cerebrali.

### **Il dolore cronico: studio di nuove entità chimiche a presunta attività analgesica e antinfiammatoria**

In Europa il dolore cronico e ricorrente rappresenta un problema sanitario specifico, considerato oramai uno stato patologico di per sé. Sebbene la sua eziopatogenesi sia ancora poco nota, nuove conoscenze scientifiche hanno condotto ad una continua evoluzione della terapia del dolore cronici. Tuttavia, l'evidenza che gli antinfiammatori e gli analgesici in uso inducono effetti indesiderati anche gravi e talvolta la loro scarsa efficacia, incoraggiano la ricerca pre-clinica all'identificazione di nuovi targets terapeutici specifici. A partire dai dati preliminari su nuove entità chimiche già oggetto di studio nel nostro laboratorio e utilizzando modelli di dolore cronico e di infiammazione, gli obiettivi del progetto saranno:

- definire gli effetti di ligandi dei recettori dei peptidi formilati non peptidici di sintesi originale;
- definire il meccanismo d'azione di molecole di sintesi originale a nucleo piridazinonico;
- definire gli effetti della somministrazione intratecale di peptidi ad attività oppioide di sintesi originale;
- definire l'efficacia di nuove preparazioni niosomiali;
- definire la tossicità delle molecole efficaci individuate negli studi 1-3.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Definire gli effetti e la tossicità di nuove entità chimiche permettendo di preconizzare eventuali studi clinici pilota. Definire una composizione niosomiale efficace a potenziare gli effetti dei farmaci analgesici e antinfiammatori in uso e la loro durata d'azione per applicazione topica.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Identificare nuove possibilità terapeutiche per il trattamento del dolore cronico.

### **Intervento operativo per il miglioramento della cura delle persone con infezione da HIV in Etiopia**

L'infezione da HIV continua ad essere una delle principali minacce alla salute delle persone che vivono nei Paesi del Sud del mondo. Secondo le stime della WHO nel 2009 33,3 milioni di persone erano portatrici del virus, di cui più di 30 milioni nei Paesi a basso e medio reddito. L'Africa sub sahariana, secondo le stime più recenti (anno 2009) rimane la regione maggiormente colpita dalla pandemia di HIV/AIDS con più di 22 milioni di persone (adulti e bambini) che vivono con l'HIV. Nella terza decade della pandemia, il divario esistente tra paesi ricchi e paesi poveri per quel che riguarda la qualità dell'assistenza alla cura rimane ancora enorme. In un contesto di estrema fragilità e povertà, come quello sub-sahariano, è centrale il ruolo assunto dalla ricerca operativa, il cui obiettivo è l'ottimale utilizzo delle risorse disponibili e una maggiore efficacia degli interventi. Il nostro progetto si propone di fornire un contributo al miglioramento della cura del paziente con HIV/AIDS attraverso un approccio olistico che comprenda la formazione del personale sanitario, il potenziamento delle strutture laboratoristiche, il coinvolgimento dei pazienti e l'utilizzo tempestivo ed efficace della terapia anti retrovirale (ARV). Il nostro intervento sarà esteso a diversi Paesi dell'Africa sub-sahariana. Il primo Paese ad essere coinvolto nel progetto sarà l'Etiopia, anche in virtù della storica relazione tra il nostro e questo Paese.

### **Risultati attesi nel triennio**

L'obiettivo generale del progetto è quello di contribuire a fermare e invertire la diffusione dell'infezione da HIV attraverso la realizzazione di attività finalizzate ad un maggior controllo della malattia in termini di assistenza e cura.

L'obiettivo specifico che il progetto intende conseguire al termine del terzo anno di attività, è quello di migliorare la cura del paziente con infezione da HIV e delle principali patologie associate (TB e altre infezioni opportunistiche) presso le strutture sanitarie partecipanti al progetto.

La strategia del progetto, prevede quattro risultati attesi da conseguire entro i tre anni di attività del progetto:

- miglioramento delle competenze cliniche del personale locale per la cura del paziente con HIV/AIDS;
- aumentata disponibilità e migliorata qualità delle attrezzature di base e della strumentazione laboratoristica;
- aumentata consapevolezza dei pazienti con HIV/AIDS riguardo all'efficacia della cura e all'importanza dell'aderenza alla terapia;
- ottimizzato utilizzo della terapia nei pazienti con HIV/AIDS nella pratica clinica.

### **Trasferibilità dei risultati**

Il conseguimento dei risultati attesi determinerà un miglioramento delle condizioni di diversi gruppi di beneficiari.

Beneficiari diretti del progetto saranno le figure sanitarie (medici, infermieri, tecnici di laboratorio e operatori sanitari) delle strutture sanitarie locali partecipanti al progetto che potranno acquisire una maggiore competenza per un una migliore presa in carico globale del paziente con HIV/AIDS in un *setting* di pratica clinica.

Beneficiari finali saranno le persone con HIV/AIDS afferenti alle strutture sanitarie partecipanti al progetto che trarranno vantaggio a medio e lungo termine dai risultati del progetto, sia in termini di riduzione della probabilità di eventi clinici (mortalità e morbidità), sia attraverso il miglioramento della qualità di vita.

## **La modulazione della connettività neuronale: una nuova strategia terapeutica nelle malattie neurologiche e psichiatriche**

La morfologia dei prolungamenti neuronali è significativamente alterata nella maggior parte delle malattie del sistema nervoso centrale. Ad esempio, le spine dendritiche, regioni specializzate della cellula nervosa sulle quali insistono il 90% delle sinapsi eccitatorie, sono ridotte in numero e/o strutturalmente alterate nelle demenze e virtualmente in tutte le forme di disabilità intellettiva, sia sporadiche che ereditarie. Oggi conosciamo i meccanismi molecolari che presiedono alla morfologia dei prolungamenti neuronali e ai suoi cambiamenti. In massima parte essi sono riconducibili allo stato di polimerizzazione delle proteine del citoscheletro, in particolare di quello actinico. In accordo con questi dati, in talune malattie neurologiche ereditarie sono presenti delle alterazioni della regolazione del citoscheletro su base genetica. Le proteine coinvolte, nella maggior parte dei casi, sono le Rho GTPasi o i loro regolatori/effettori. È stato dimostrato dal nostro gruppo che la modulazione farmacologica del segnale Rho GTPasico è associata a positive modificazioni comportamentali e funzionali. Lo scopo del presente progetto è di estendere tali osservazioni ad una serie di modelli sperimentali di malattie del sistema nervoso centrale. Il completamento della farmacologia preclinica della connettività neuronale potrebbe aprire una strada completamente nuova, e finora non ancora esplorata, nel trattamento delle malattie neurologiche e psichiatriche.

### **Risultati attesi nel triennio**

Saranno approfonditi i meccanismi di azione di molecole attive sull'arborizzazione dendritica, il numero delle spine e il trofismo dei processi cellulari attraverso studi comportamentali, elettrofisiologici, morfologici e biochimici.

Parallelamente, otterremo dati sulla tossicità preclinica degli stessi trattamenti.

Contiamo di valutare l'efficacia delle molecole in modelli animali di disabilità intellettiva. Al riguardo, sono in corso studi sul topo Fmr1 knockout, il quale modella la sindrome dell'X fragile, la più frequente causa di disabilità intellettiva ereditaria.

Uno dei risultati attesi di maggiore rilevanza è la caratterizzazione degli effetti dei modulatori della connettività in modelli di demenza, in particolare di morbo di Alzheimer. Quest'ultima patologia rappresenta un problema emergente per tutti i servizi sanitari a causa dell'invecchiamento della popolazione, dei costi sociali e della limitata efficacia delle terapie esistenti.

Lo studio comparativo delle diverse molecole permetterà di determinare quali di esse siano più efficaci e meno tossiche e di ottenere *insight* nei meccanismi che controllano il trofismo dell'albero dendritico. I risultati contribuiranno a migliorare la comprensione della fisiologia e della fisiopatologia della memoria. Le nuove conoscenze potranno essere trasferite alle altre patologie del sistema nervoso centrale nelle quali, secondo evidenze recenti, il deficit di connettività rappresenta un aspetto fondamentale.

### **Trasferibilità dei risultati**

Molecole modulanti il segnale Rho GTPasico sono già disponibili e alcune di esse sono state già autorizzate per l'uso umano. Esistono inoltre delle proteine naturali che mostrano notevole efficacia in questa azione farmacologica. Pertanto, la prospettiva di un impiego clinico non è remota. È opportuno osservare che per la maggior parte delle malattie oggetto del presente studio, ancorché frequenti e gravemente invalidanti, non esistono trattamenti realmente efficaci. Quindi i risultati della ricerca potrebbero avere una importante ricaduta terapeutica. Le nuove conoscenze sui meccanismi della plasticità strutturale indicheranno nuovi target nella diagnostica e nella terapia delle malattie dell'SNC, con evidenti prospettive traslazionali. Se anche le molecole in studio non dovessero essere direttamente impiegate nell'umano, il loro uso sperimentale potrebbe notevolmente migliorare la farmacologia previsionale delle malattie del sistema nervoso centrale.

## **La prevenzione della trasmissione materno-infantile dell'HIV nei Paesi con risorse limitate: impatto delle nuove linee guida della WHO in Malawi**

La WHO ha rilasciato nel 2010 le nuove linee guida per la prevenzione della trasmissione verticale dell'infezione da HIV nei contesti con risorse limitate. Una delle possibili strategie è rappresentata dall'utilizzo di una profilassi antiretrovirale con tenofovir, lamivudina ed efavirenz somministrata alle donne durante la gravidanza e dopo il parto, durante il corso dell'allattamento, la cui durata può variare da uno a due anni. Poche informazioni sono tuttavia disponibili sull'impatto di questa strategia preventiva sulla crescita e lo sviluppo dei bambini esposti. Sia l'efavirenz che il tenofovir non sono approvati per il trattamento di bambini sotto i tre anni di età. Sono noti gli effetti sul sistema nervoso centrale dell'efavirenz del quale è stato anche ipotizzato un ruolo teratogeno che ne sconsiglia l'uso nei primi tre mesi di gravidanza. Per il tenofovir ci sono potenziali eventi avversi a livello renale e sulla crescita ossea.

Questo studio si propone quindi di valutare la crescita e lo sviluppo di bambini nati da madri HIV-positive che ricevono un regime con tenofovir, lamivudina ed efavirenz e di confrontarli con un gruppo di controllo che riceve una terapia con zidovudina, lamivudina e nevirapina (il regime più largamente utilizzato ad oggi).

Lo studio verrà effettuato in collaborazione con il programma DREAM della Comunità di S. Egidio in Malawi.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio prevede l'arruolamento di 920 donne HIV-positivo in gravidanza e la loro assegnazione a uno dei due bracci di trattamento. Il follow-up della coppia madre/bambino verrà effettuato fino al compimento del secondo anno di vita del bambino.

##### *Endpoint primari:*

- Tasso di mortalità neonatale, infantile (a un anno) e a due anni di età.
- Tasso di trasmissione del virus HIV a 1, 12, 18 e 24 mesi.
- Crescita del bambino valutata ogni tre mesi con una misurazione di peso e altezza.
- Valutazione dello sviluppo psicomotorio mediante il *motor milestone assessment* ogni sei mesi.
- Valutazione dell'impatto sulla crescita ossea mediante determinazione della fosfatasi alcalina specifica per l'osso (*marker* di formazione dell'osso) e il peptide C-terminale del collagene di tipo I (CTX) come *marker* di riassorbimento osseo.
- Valutazione dell'impatto sulla funzione renale mediante la misurazione di creatinina, calcio, fosfato e albumina nel siero e nelle urine ogni sei mesi.
- Valutazione del tasso di malformazioni congenite.

##### *Endpoint secondari:*

- Tasso di mortalità materna.
- Tasso di abortività.
- Tasso di prematurità.
- Effetti collaterali nelle donne e nei bambini: anemia, tossicità epatica.
- Misurazione dei livelli dei farmaci nel latte materno delle donne in trattamento e nei bambini allattati

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le nuove linee guida della WHO rappresentano un importante passo avanti nella lotta all'infezione pediatrica da HIV. Tuttavia la stessa WHO indica alcune aree di ricerca prioritarie che possono contribuire a definire le strategie.

Tra queste sono incluse:

- sicurezza ed efficacia della profilassi materna somministrata dopo i primi sei mesi di allattamento;
- sicurezza dell'uso del tenofovir (sia in gravidanza che nel corso dell'allattamento);
- sicurezza dell'efavirenz (sia in gravidanza che durante l'allattamento);
- effetti sugli esiti di gravidanza e sugli effetti a lungo termine dell'esposizione prolungata di farmaci antiretrovirali (sia in utero che post partum);
- accettabilità dei regimi per la prevenzione;
- aderenza a regimi preventivi di lunga durata.

I dati raccolti in questo studio potranno contribuire a definire le strategie preventive ottimali nei Paesi con risorse limitate.

#### **La valutazione preclinica di nuove molecole ad attività analgesico-antinfiammatoria: studio di nuovi modelli e paradigmi sperimentali che consentano una maggiore predittività riducendo i tempi di sviluppo**

I farmacologi hanno dedicato sforzi considerevoli allo sviluppo di modelli sperimentali che identifichino molecole sviluppabili come nuovi farmaci, con risultati spesso positivi. Per gli analgesici e antinfiammatori sono descritti in letteratura oltre 50 modelli di dolore e di infiammazione, la maggior parte dei quali utilizza roditori. In tali modelli il dolore è dedotto

dal comportamento nocifensivo messo in opera dall'animale allo scopo di sottrarsi allo stimolo nocicettivo. Lo stimolo può essere termico, elettrico, meccanico o chimico e le risposte registrate variano da semplici riflessi spinali a comportamenti più complessi che derivano da un più alto livello di attivazione sia spinale che sovraspinale e che vengono influenzati dagli analgesici. Recentemente sono state dimostrate anche differenze di genere e caratterizzate le variazioni della risposta nocifensiva in relazione alla specie e al ceppo. Nonostante i modelli animali di dolore siano utili nel predire attività analgesico-antinfiammatorie confermate poi dalla pratica clinica come il caso dello ziconotide documenta, falsi positivi sono stati spesso documentati portando allo spreco di risorse economiche e alla delusione delle aspettative terapeutiche preconizzate, ad esempio, nei confronti di quelle patologie a base infiammatoria (artrite, neuropatie) verso cui non esiste ancora un trattamento specifico efficace. Ancora peggiore è il caso dei falsi negativi, che impediscono di fatto lo sviluppo a farmaco.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Allo scopo di definire un percorso di ottimizzazione dei modelli sperimentali correntemente utilizzati in studi di attività antinocicettiva/antiinfiammatoria si procederà allo studio comparato degli effetti di molecole standard in modelli di dolore acuto e/o infiammatorio dopo somministrazione centrale e sistemica, definendone vantaggi e criticità nella costruzione di un percorso di *discovery*. Questa indagine permetterà di individuare i principali effetti evocati dagli standard utilizzati permettendo di definire la modellistica più appropriata, da validare con nuove entità chimiche in via di sviluppo presso il nostro laboratorio, e la strategia sperimentale più opportuna per ridurre il numero degli animali coinvolti e quindi tempi e costi della sperimentazione pre-clinica dei potenziali nuovi farmaci analgesici e infiammatori

#### **Trasferibilità dei risultati**

Fornire linee-guida per un rapido sviluppo di nuovi farmaci analgesici e antinfiammatori da sottoporre alla comunità scientifica e alle realtà produttive allo scopo ridurre tempi e costi della sperimentazione preclinica.

### **Progetto per la sorveglianza nazionale sul trattamento antiretrovirale in gravidanza**

Il progetto, coordinato dall'ISS, è stato avviato alla fine del 2001 e ha come obiettivo primario la sorveglianza sul trattamento antiretrovirale in gravidanza e la valutazione dei suoi effetti sulla madre, sullo sviluppo prenatale e sul neonato. Lo studio è svolto in collaborazione con infettivologi, ginecologi e pediatri di oltre 35 centri universitari e ospedalieri su tutto il territorio nazionale.

Alla data odierna (gennaio 2012), le gravidanze segnalate al progetto sono oltre 2.800, con un ritmo costante di circa 250 segnalazioni/anno. I medici partecipanti e i membri dell'*advisory board* del progetto ricevono periodicamente un report aggiornato sui dati raccolti.

Lo studio rappresenta la principale coorte nazionale su HIV e gravidanza e una fra le maggiori casistiche in abito europeo, e ha già prodotto e diffuso, attraverso pubblicazioni internazionali, informazioni su aspetti epidemiologici, sicurezza farmacologica nella madre, andamento clinico-immunologico durante la gravidanza, aspetti virologici e di farmacocinetica, esiti e durata della gravidanza. I dati sono stati utilizzati in varie collaborazioni internazionali per la valutazione di aspetti di sicurezza e teratogenicità in studi multicoorte.

Si prevede di continuare la sorveglianza a lungo termine, con particolare riferimento alla definizione della sicurezza dei farmaci antiretrovirali di più recente introduzione, per i quali esistono dati limitati sia nelle madri che nei neonati esposti.

#### **Risultati attesi nel triennio**

L'ampia e crescente casistica verrà utilizzata per analisi che affiancheranno quelle già pubblicate, approfondendo la valutazione della sicurezza degli antiretrovirali e la definizione di aspetti epidemiologici, clinici, virologici e di farmacocinetica.

Le valutazioni previste per il prossimo triennio includono:

- lo studio delle relazioni fra terapia antiretrovirale ed esiti della gravidanza, con particolare riferimento a difetti congeniti, complicanze della gravidanza e del parto;
- la definizione di frequenza e determinanti di rischio per la trasmissione verticale dell'infezione (diagnosi e terapia tardiva, cesareo d'urgenza e parto vaginale, elevata carica virale);
- una ulteriore definizione della tossicità in corso di gravidanza, con particolare riferimento all'impatto delle terapie di più nuova introduzione su metabolismo glucidico e lipidico;
- la definizione dell'impatto di condizioni e co-morbidità (con riferimento particolare alle co-infezioni da virus dell'epatite B e C) sui principali esiti della gravidanza;
- la definizione di frequenza, caratteristiche e significato prognostico della farmacoresistenza agli antiretrovirali in gravidanza;
- la definizione di aspetti di farmacocinetica dei nuovi antiretrovirali in gravidanza.

La durata del progetto rimane aperta, allo scopo di eseguire un adeguato monitoraggio sui farmaci anti-HIV di nuova introduzione. Sono inoltre previste interazioni con altri network per studi e ricerche collaborative.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le ricadute principali di interesse per la sanità pubblica comprendono:

- definizione degli effetti collaterali sulla madre e sul bambino;
- definizione comparativa di efficacia e tossicità di diversi farmaci e regimi;
- definizione dell'impatto della gravidanza sulla storia naturale dell'infezione da HIV;
- analisi delle alterazioni del metabolismo glicidico e lipidico in gravidanza e sul ruolo favorente/aggravante degli antiretrovirali;
- definizione della frequenza e delle caratteristiche della resistenza agli antiretrovirali in gravidanza;
- informazioni sulla farmacocinetica degli antiretrovirali in gravidanza.
- potenziale contributo alla definizione di linee guida attraverso la definizione dei regimi più adeguati in termini di tossicità ed efficacia;
- allestimento di una rete significativa di collaborazioni nell'ambito della farmacovigilanza in gravidanza, nella gestione della gravidanza in donne con infezione da HIV, e nello studio degli effetti della terapia.

#### **Programma di ricerca per il triennio 2012-2014: studio di farmacovigilanza in area pediatrica**

L'uso degli psicofarmaci nei bambini e negli adolescenti è un argomento controverso che richiede un approccio complesso in cui entrano in gioco figure professionali diverse che intersecano interventi diagnostici e terapeutici multimodali all'interno di un modello diagnostico-terapeutico integrato.

L'Italia ha creato un registro dei trattamenti multimodali dell'ADHD che presuppone una presa in carico globale del bambino all'interno del suo contesto di vita.

Indagare i meccanismi di azione degli psicofarmaci per una stima ottimale del rapporto benefico/rischio. Il progetto si prefigge di valutare la tollerabilità e la sicurezza dei farmaci mediante:

- descrizione degli eventi sentinella che attivano il percorso diagnostico-terapeutico;
- verifica della omogeneità/affidabilità delle procedure diagnostiche e loro utilità per l'utilizzo appropriato dei farmaci;
- stima della tollerabilità dei farmaci per posologia e per età;
- incidenza degli eventi avversi per tipo e gravità;
- valutazione dell'effetto dei farmaci sulla crescita somatica, peso, altezza, *Body Mass Index* (BMI) dei soggetti trattati, stratificati per fascia d'età: pre-puberale (7-9), puberale (10-14), post-puberale (15-18) e tempo di esposizione al trattamento. Si valuterà l'impatto sulla statura finale del soggetto trattato e l'interferenza con la maturazione sessuale.

Lo studio è un WP del progetto FP VII "ADDUCE" acronimo per *Attention Deficit Hyperactivity Disorder Drugs Use Chronic Effects*.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Definizione del rischio/beneficio dei psicofarmaci utilizzati per il trattamento in bambini e adolescenti affetti da ADHD. Identificazione di indicatori predittivi della risposta terapeutica.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Stesura di raccomandazione nazionali per il trattamento dei bambini e adolescenti affetti da ADHD, con particolare riguardo alla crescita ponderale. Costituzione di una rete nazionale di farmacovigilanza attiva costituita dalle strutture di neuropsichiatria infantile

### **Proteine di fusione composte da anticorpi monoclonali umani in forma di *single chain fragment variable* (scFv) e IL2 per la terapia dei tumori non suscettibili al trattamento chemioterapico**

Le cellule dei tumori solidi sono caratterizzate da una elevata capacità di resistenza al trattamento chemioterapico. I farmaci antineoplastici correntemente in uso risultano efficaci solo in modo transiente e non di rado la crescita della neoplasia riprende, dopo una fase di stasi, in modo estremamente vigoroso. Al fallimento della chemioterapia vengono date diverse spiegazioni che includono l'insorgenza di cellule caratterizzate da una elevata capacità di ridurre la biodisponibilità dei farmaci mediante meccanismi di trasporto (proteine della famiglia delle ABC, P-glicoproteina, MRP1, BCRP ecc.) o la selezione (causata dai farmaci) di varianti di proteine bersaglio che eludono l'azione dei farmaci. Obiettivo di questo progetto è lo sviluppo di proteine di fusione composte da anticorpi monoclonali umani e linfocine con collaudata capacità curativa antitumorale. Questi composti di derivazione genetica ricombinante diretti verso cellule di melanoma (anticorpo DIATHIS1) e di Ewing sarcoma (anticorpo scFv C7) evitano la formazione di anticorpi anti-anticorpi non attenuando così con le proprietà curative di somministrazioni ripetute.

La presenza di reazioni avverse che possono limitare l'efficacia di IL2 per il trattamento dei tumori solidi possono essere dunque superate utilizzando proteine di fusione che, direzionando in modo specifico le linfocine in sede peritumorale, ne riducano le severe controindicazioni.

#### **Risultati attesi nel triennio**

IL-2 è stata la prima citochina che ha mostrato di possedere attività antitumorale. Proleukin® (aldesleukin), consistente in IL-2 di origine ricombinante, ha ottenuto nel 1992 l'autorizzazione dalla FDA per il trattamento del carcinoma metastatico renale estesa

successivamente (1998) per la cura del melanoma. Tuttavia, l'efficacia della IL2 come composto biologico anti cancro ha subito una notevole limitazione dalla sua tossicità sistemica e dalla incapacità di localizzarsi efficientemente in cellule bersaglio dei tumori solidi.

Gli obiettivi del progetto consistono nella selezione, produzione e caratterizzazione di una proteina di fusione costituita da un anticorpo monoclonale umano in forma scFv capaci di reagire in modo specifico con varianti CEACAM1, CEACAM3 e CEACAM5 del CEA e IL-2. Questa proteina di fusione possiede tutte quelle caratteristiche strutturali e funzionali per poter essere considerata un potenziale composto antitumorale: è di origine umana pertanto poco o nulla immunogenica; si lega con buona affinità ad epitopi distribuiti nella frazione extracellulare del CEA espressi su ben definite classi di tumori. Inoltre studi eseguiti con l'anticorpo in forma scFv da noi isolato dimostrano reattività con tessuti normali assente o trascurabile. Pertanto, utilizzando l'anticorpo monoclonale anti CEA si potrà direzionare la IL2 su cellule tumorali riducendo gli effetti avversi che limitano le capacità antineoplastiche di questa linfochina.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'utilizzo di anticorpi monoclonali (mAb) sta assumendo negli ultimi anni un ruolo di primo piano nel trattamento di tumori solidi metastatici prima considerati incurabili. Ciò è dovuto ad una serie di fattori che includono elevata efficacia e buona tollerabilità della immunoterapia se comparata con analoghi trattamenti anti-cancerosi. Prerequisito essenziale della applicazione clinica di queste proteine di fusione consiste nella loro origine umana che consente, insieme ad una azione antineoplastica, la riduzione degli effetti avversi dovuti alla somministrazione di proteine di fusione che non contengono elementi xenogenici. Alla luce di queste osservazioni e considerando la natura estremamente aggressiva e naturalmente farmaco resistente di molti tumori solidi emerge la necessità di verificare se proteine di fusione composte da anticorpi monoclonali umani e linfochine con riconosciute attività antineoplastiche come la IL2 possa essere una strategia di cura efficace e sicura

### **Ruolo degli estrogeni sull'espressione di $\beta$ -miosina nel tessuto cardiaco**

Le donne di età inferiore a 45 anni risultano meno esposte a patologie cardiocircolatorie. Tuttavia questa tendenza si attenua con gli anni, fino ad annullarsi dopo la menopausa.

Anche il rimodellamento cardiaco da sovraccarico pressorio presenta importanti differenze di genere. Infatti, le donne ipertese fertili presentano una più bassa incidenza di ipertrofia ventricolare sinistra (*Left Ventricular Hypertrophy*, LVH) con parametri di eiezione conservati, rispetto agli uomini di pari età.

Lo stimolo ipertrofico oltre a generare un aumento della massa cardiaca causa la riespressione di alcuni geni, quali ANP, skACT e  $\beta$ -MHC (*Major histocompatibility complex*), attivi nel feto e repressi nel miocardio adulto.

Attualmente si ritiene che la riespressione genica fetale faccia parte di un processo di compensazione e di adattamento che mette in atto il cuore per limitare il consumo energetico e per sostenere l'aumentato lavoro causato dal sovraccarico emodinamico. Sebbene le differenze di genere per quel che riguarda il rimodellamento cardiaco siano state ampiamente descritte, poco è noto circa l'espressione genica fetale in individui di diverso sesso. Inoltre i pochi dati disponibili riguardano individui con età media maggiore di 50 anni.

Nell'ipotesi di un ruolo benefico svolto dai geni fetali nell'evoluzione della cardiomiopatia ipertrofica riteniamo prezioso acquisire maggiori conoscenze sui meccanismi molecolari che regolano l'espressione di tali geni nei due sessi, sia in condizioni fisiologiche che di sovraccarico pressorio.

### **Risultati attesi nel triennio**

Abbiamo recentemente osservato che in topi femmine giovani adulte l'espressione di  $\beta$ -MHC risulta circa dieci volte maggiore di quella espressa nei maschi di pari età e che tale differenza si annulla in animali anziani non più fertili (8-12 mesi), suggerendo un possibile ruolo svolto dagli estrogeni. Per questo:

- Intendiamo misurare i livelli di  $\beta$ -MHC: i) in topi C57 maschi e femmine a differenti momenti dello sviluppo sessuale; ii) in topi in topi C57 femmine giovani adulte, sottoposte ad ovariectomia bilaterale e trattate o meno con terapia ormonale sostitutiva; iii) in topi in topi C57 femmine giovani adulte trattate o meno con antagonisti dei recettori per gli estrogeni; iv) in topi C57 maschi e femmine sottoposti a coartazione dell'arco aortico.
- Avendo precedentemente dimostrato come la via di segnalazione dell'adenosinmonofosfato ciclico (AMPC) è in grado di potenziare l'espressione genica fetale indotta da sovraccarico emodinamico *in vivo* (Patrizio *et al.*, 2007) e dall'attivazione dei recettori alfa1-adrenergici *in vitro* (Patrizio, 2008), valuteremo in tutte le condizioni suddette, l'espressione dei recettori  $\beta$ -adrenergici ( $\beta$ -AR) e approfondiremo il loro ruolo utilizzando topi C57BL/6 di entrambi i sessi geneticamente modificati ( $\beta$ 1KO,  $\beta$ 2KO,  $\beta$ 1 $\beta$ 2DKO)
- Studieremo la relazione molecolare tra presenza di estrogeni e recettori  $\beta$ -adrenergici, utilizzando una linea cellulare di cardiomioblasti adulti.

### **Trasferibilità dei risultati**

L'LVH è un processo maladattativo in quanto evolve verso l'insufficienza cardiaca. La  $\beta$ -MHC rispetto all'isoforma alfa consuma meno energia nel contrarsi, per questo si ritiene che la sua riespressione sia vantaggiosa in cuori che devono vincere resistenze periferiche maggiori. Quindi, nell'ipotesi di un suo ruolo benefico la maggior espressione di  $\beta$ -MHC già in condizioni basali dovuta alla presenza di estrogeni potrebbe avere un importante ruolo nella cardioprotezione femminile e nell'effetto cardioprotettivo svolto dalla terapia ormonale sostitutiva. Inoltre, l'eventuale ruolo della segnalazione  $\beta$ -adrenergica, potrebbe far luce sull'effetto benefico del  $\beta$ -blocco nell'insufficienza cardiaca e sull'effetto antiipertrofico della terapia antiipertensiva nelle donne postmenopausa, i cui meccanismi sono a tutt'oggi sconosciuti, contribuendo allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per prevenire la progressione dell'insufficienza cardiaca nelle donne non più fertili.

### **Ruolo della leptina nella patogenesi della sindrome metabolica: differenze di genere**

La sindrome metabolica che comprende obesità e iperinsulinemia rappresenta un fattore di rischio nello sviluppo di malattie cardiovascolari. Tra i fattori che concorrono alla sindrome metabolica la leptina, un ormone/citochina rappresenta un marcatore di suscettibilità per queste patologie.

La relazione tra massa grassa e concentrazioni plasmatiche di leptina è associata al sesso e i livelli plasmatici di leptina sono più elevati (cinque volte) nelle donne rispetto agli uomini. Questo si associa ad una maggiore frequenza di patologie cardiovascolari e autoimmuni nelle donne.

Recenti dati della letteratura indicano che le risposte Th-17 indotte dalle citochine infiammatorie, svolgono un ruolo critico nelle risposte infiammatorie associate alle patologie cardiovascolari e autoimmuni.

Il nostro gruppo ha dimostrato che la leptina induce la produzione delle citochine infiammatorie IL-1 $\beta$  e IL-6, coinvolte nello sviluppo della risposta Th17.

Sulla base di queste premesse il presente progetto si propone di: i) valutare l'influenza della leptina nell'induzione e nel mantenimento di una risposta Th17 in pazienti con malattie cardiovascolari allo scopo di definire la leptina un marcatore di suscettibilità *gender*-associato per lo sviluppo di tali malattie; ii) identificare nuovi target clinicamente rilevanti per la terapia delle patologie cardiovascolari; iii) definire in pazienti con sindrome metabolica le correlazioni tra differenti variabili metaboliche nei due sessi.

#### **Risultati attesi nel triennio**

In questo progetto ci proponiamo di studiare l'influenza della leptina nell'induzione e nel mantenimento di una risposta Th17 in pazienti con eventi cardiovascolari di diversa entità. In particolare, ci proponiamo di definire la leptina un marcatore di suscettibilità *gender*-associato per lo sviluppo di tali malattie.

I pazienti reclutati saranno valutati dal punto di vista immunologico per caratterizzarne il profilo immunologico dell'infiammazione, al fine di determinare similitudini e/o differenze e di individuare marcatori immunologici di rischio/protezione nei confronti di un'eventuale evoluzione delle complicazioni cardiovascolari.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati dello studio proposto, potranno contribuire a chiarire i meccanismi d'azione della leptina e potrebbero favorire un approccio terapeutico volto ad identificare nuovi target clinici associati a differenze di genere. In particolare, la comprensione del ruolo della leptina e del profilo immunologico, con particolare riferimento all'asse IL-23/Th17, è importante per pianificare nuove strategie terapeutiche potenzialmente rilevanti per mitigare patologie infiammatorie.

### **Sintesi e caratterizzazione di analoghi degli inibitori della fosfodiesterasi-5(PDE-5): uno strumento per l'analisi di medicinali per la terapia delle disfunzioni erettili potenzialmente contraffatti**

Negli ultimi anni le attività di contrasto alla contraffazione farmaceutica sono diventate prioritarie per gli OMCL europei. L'espansione del mercato in Internet e illegale dei medicinali ha creato una nuova emergenza sanitaria in Europa. I cittadini italiani e dell'UE, spesso indotti dalla facilità di reperimento attraverso Internet di prodotti per la terapia delle disfunzioni erettili (Viagra®, Cialis®, Levitra®) senza ricetta e a basso costo, acquistano tali prodotti inconsapevoli dei gravi rischi. Tali prodotti sono spesso contraffatti e pericolosi per la salute e possono contenere non il principio attivo dichiarato, ma un analogo avente attività farmacologica simile ma del quale non è nota la tossicità. Nuovi analoghi del sildenafil, tadalafil e vardenafil vengono quotidianamente sintetizzati in Paesi quali l'India e la Cina e utilizzati per la formulazione di prodotti che arrivano sul nostro mercato illegalmente o attraverso Internet con gravi rischi per la salute. L'analisi di tali prodotti da parte dei laboratori di controllo è spesso complessa a causa della presenza di nuove molecole sconosciute. Scopo di tale progetto è la sintesi chimica e caratterizzazione di nuovi analoghi degli inibitori della PDE-5 al fine di ottenere standard per l'analisi di medicinali potenzialmente contraffatti e acquisire informazioni utilizzabili per l'analisi di campioni incogniti.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Nella prima fase del progetto saranno sintetizzate molecole facenti parte di tre famiglie strutturali (sildenafil, acetildenafil e tiosildenafil) ma con sostituenti differenti. Tra questi saranno presenti composti già noti per essere impiegati nella contraffazione e nuovi composti. La caratterizzazione strutturale e chimico-fisica avverrà mediante tecniche spettroscopiche (NMR, *Mass Spectrometry* – MS, spettroscopia infrarossa – IR,

spettroscopia nel vicino infrarosso – NIR) e termocalorimetriche (*Differential Scanning Calorimetry* – DSC, Termogravimetria – *Hot-stage Microscopy*). La cromatografia liquida accoppiata allo spettrometria di massa (LC-MSQ-TOF) sarà utilizzata per la separazione cromatografica degli analoghi, la quantificazione delle impurità, la determinazione della massa esatta e del *pattern* di frammentazione. L'analisi del *pattern* di frammentazione sarà poi utilizzabile per la determinazione strutturale di molecole incognite mediante ricerca di frammenti diagnostici per la ricostruzione della struttura. Mediante gas cromatografia (GC) sarà determinato il contenuto di solventi residui. Tali dati costituiranno lo strumento conoscitivo per l'analisi di analoghi incogniti presenti in campioni illegali e contraffatti che saranno analizzati nel laboratorio. Nella seconda fase gli standard sintetizzati e caratterizzati e la base di dati acquisita saranno impiegati per l'analisi di campioni contraffatti provenienti da sequestri o da acquisti in Internet.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Raccolta di dati e spetti di riferimento utilizzabili per l'analisi di campioni contraffatti contenenti analoghi degli inibitori della PDE-5. Nuovi strumenti analitici diagnostici per la delucidazione della struttura di analoghi incogniti mediante lo studio dei frammenti di massa e segnali NMR. Metodi di sintesi utilizzabili dai laboratori di controllo per la sintesi *in house* di standard di riferimento di analoghi degli inibitori della PDE-5. Disponibilità di *standard* di riferimento caratterizzati. Trasferimento delle conoscenze alla rete europea degli OMCL e ad altri laboratori di controllo e non (es. Dogane) mediante pubblicazioni scientifiche, presentazione a convegni e ai meeting annuali degli OMCL. Applicazione dei nuovi strumenti analitici per le analisi di campioni contraffatti richieste dall'Autorità Garante della concorrenza e del mercato e dall'AIFA anche al fine di ottenere sempre maggiori informazioni sulla contraffazione e i rischi per la salute del cittadino utilizzabili per campagne di informazione sul fenomeno.

#### **Sostanze naturali vegetali da piante della medicina tradizionale: purificazione, caratterizzazione e valutazione bio-farmacologica**

Le sostanze naturali, molecole a basso peso molecolare prodotte dal metabolismo secondario delle piante, presentano una notevole diversità strutturale e funzionale. Data la loro selettività d'azione verso un ben limitato numero di macromolecole biologiche (Carlson. *ACS Chemical Biology* 2010;5:639-53) hanno permesso negli ultimi anni di chiarire fenomeni biochimici e di biologia molecolare, ma anche di offrire nuove possibilità alla terapia sia come tali sia come modelli molecolari per lo sviluppo di nuovi farmaci (Kuo-Hsiung Lee. *J.Nat.Prod* 2010;73:500-16; Kingston. *J.Nat.Prod* 2011;74:496-511). In riferimento a questo la medicina tradizionale, in particolare quella dei Paesi in via di sviluppo, rappresenta un utile pre-screening per la selezione di piante da cui isolare e identificare sostanze naturali per una valutazione bio-farmacologica il più ampia possibile in sistemi di screening rapido su un notevole numero di target molecolari detto *high-throughput screening*.

Obiettivo del progetto è quello di isolare, purificare e caratterizzare da un punto di vista strutturale e biologico le sostanze naturali prodotte da piante utilizzate nella medicina tradizionale in particolare afro-americana o nella medicina complementare.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Le piante per lo studio fitochimico e bio-farmacologico sono selezionate in base alle informazioni di etnofarmacologi locali e anche a relazioni chemotassonomiche con altre specie vegetali già studiate. Gli estratti delle piante e loro parti, identificate dal punto di vista botanico, sono progressivamente frazionati fino all'isolamento delle sostanze pure, poi

caratterizzate dal punto di vista chimico con metodi chimici e spettroscopici come NMR mono e bidimensionale, spettrometria di massa. Le sostanze purificate sono avviate ad una valutazione biologica *in vitro* come antimalarici, antitumorali, antimicrobici e cardiovascolari ed eventualmente anche saggi *in vivo*. Verranno prese in considerazione: *Lovanafia capuroniana*, *Gonioma malagasy* e *Vepris madagascariensis*, piante che contengono alcaloidi e che sono utilizzate in Madagascar come antimalarici. Oggetto di studio saranno poi la *Buettneria biloba* le cui foglie vengono utilizzate in Madagascar come infuso acquoso per il recupero della memoria, mentre il *Capuronianthus mahafalensis* è usato per la disfunzione erettile. Dalla *Peschiera fuchsiaeifolia*, pianta antimalarica del Brasile, da cui sono stati già da noi isolati 22 alcaloidi indolici, sarà purificata altra voacamina, alcaloide predominante, in quantità utile per gli ulteriori saggi biologici *in vivo*, poiché l'alcaloide da noi purificato dimostra una capacità di potenziare l'effetto citotossico della doxorubicina (DOX) su linee tumorali umane resistenti.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Gli studi fitochimici e i conseguenti studi bio-farmacologici delle sostanze isolate dalle piante della medicina tradizionale, in linea con i programmi della WHO (WHO 2001, WHO/EDM/TRM/2000.1; WHO 2005, TDR/GEN/Guidance/ 05.1), tendono alla valorizzazione di questi rimedi tradizionali specialmente nei Paesi dove questo tipo di terapia rappresenta il più importante e fondamentale sistema di cura a basso costo per le malattie delle popolazioni più povere. Lo studio fitochimico di queste medicine vegetali tradizionali può dare una validazione al rimedio stesso sia in termini di ricerca del componente responsabile dell'attività, sia in termini di ricerca di componenti caratteristici da poter utilizzare come *marker* molecolari per la standardizzazione delle stesse droghe vegetali, in accordo con il documento dell'EMA-Committee on Herbal Medicinal Products del 7 gennaio 2009 Ref. EMEA/HMPC/3626/2009.

#### **Studi preclinici relativi ad un anticorpo monoclonale umano in forma di *single chain fragment variable* (scFv) diretto in modo specifico e selettivo verso le molecole di adesione CEACAM1/3/5 per la diagnosi e terapia del melanoma e del carcinoma polmonare NSCLC (*non small cell lung cancer*)**

Le molecole di adesione cellulare di origine carcino-embriogenica (CEACAM) sono coinvolte in una serie di processi fisiologici che vanno dalla morfologia cellulare, alla neo-vascularizzazione, alla regolazione dell'omeostasi dell'insulina alla proliferazione di cellule T. L'espressione di CEACAM1 risulta spesso associata con l'abolizione della oncogenicità di linee cellulari trasformate e pertanto questa molecola di adesione è stata considerata alla stregua di un immunosoppressore tumorale. In contrasto con questa osservazione, in molti casi l'espressione de novo di CEACAM1 risulta essere associata con la progressione tumorale e la metastatizzazione di diverse forme di cancro. Antigeni tumore-associati appartenenti a questa classe di molecole di adesione come il CEACAM1, rappresentano dei bersagli ideali per la immunoterapia per la loro selettiva espressione su cellule cancerose che consente di risparmiare dall'azione distruttiva del farmaco cellule non trasformate. Attraverso metodologie di ingegneria genetica, che consentono la costruzione di frammenti anticorpali umani in forma di *single chain fragment variable* (scFv), oltre ad eliminare i problemi derivanti dall'immunogenicità possono essere facilmente manipolati geneticamente per migliorare aspetti farmacocinetici e farmacodinamici e aumentare in questo modo l'efficacia di eventuali complessi anticorpo/farmaco.

### **Risultati attesi nel triennio**

Questo progetto di ricerca si pone come obiettivo di caratterizzare sotto l'aspetto biochimico, strutturale e di specificità un anticorpo umano in forma scFv anti CEACAM1/3/5 denominato DIATHIS.1 derivato da una libreria fagica anticorpale e recentemente sottomesso alle procedure di copertura brevettuale da parte di un'agenzia europea che ne ha validato l'originalità e la potenziale applicazione industriale. In particolare intendiamo sviluppare una serie di studi che includono la formulazione e il disegno genetico/biochimico di immunoconiugati che includono:

- anticorpo DIATHIS-1 legato a radionuclidi quali I124 e I131 per la distruzione mirata e selettiva di cellule tumorali quali il melanoma metastatico e il carcinoma polmonare,
- forme anticorpali di DIATHIS-1 (*diabody*) legate mediante *linker* peptidici (valina-citrullina) con potenti citossici quali la Monometil Auristatin. Questo sistema è stato recentemente approvato dalla FDA per l'anticorpo anti CD30 Brentuximab vedotin.

In parallelo, intendiamo condurre studi per la verifica delle caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche di tali immunoconiugati che siano a corredo della documentazione necessaria per la richiesta della sperimentazione clinica di fase I.

### **Trasferibilità dei risultati**

Studi preliminari condotti su tre lotti di anticorpo DIATHIS-1 prodotti presso la ditta AVITEX e validati per stabilità, sterilità e potenza hanno dimostrato che il coniugato anticorpo DIATHIS-1/I124 (ACOM, Macerata) si lega preferenzialmente a melanoma xenotrapiantato in topi nudi mentre gli altri organi vengono risparmiati dal composto radioattivo. La ritenzione dell'anticorpo radiomarcato con I124 risulta stabile ed estesa temporalmente (4-24 ore) nella massa tumorale da poter permettere uno studio diagnostico accurato. Attualmente sono in corso studi sulla formulazione di DIATHIS1/I131 per lo sviluppo di un radiomarcato in grado di esercitare un'azione terapeutica. In questo periodo, mentre siamo impegnati nella costruzione dell' immunoconiugato, l'anticorpo DIATHIS-1/monometil Auristatina, sono in corso studi per identificare il primate non umano da utilizzare per investigazioni tossicologiche e di sicurezza per completare le informazioni sul prodotto da sperimentare clinicamente.

### **Studio clinico NEAT 001: “An open-label randomised comparative two-year trial comparing two first-line regimens in HIV-infected antiretroviral naïve subjects: tenofovir/emtricitabine + darunavir/r vs darunavir/r + raltegravir”**

Lo studio NEAT 001 è uno studio multinazionale, multicentrico, disegnato nell'ambito del progetto europeo NEAT (*European AIDS Treatment Network*), coordinato dal Dipartimento FARM dell'ISS. Il NEAT 001 rappresenta attualmente l'attività più importante del NEAT. Lo studio si propone di confrontare due regimi *Highly Active Antiretroviral Therapy* (HAART) innovativi in soggetti HIV+ mai trattati con antiretrovirali. I due regimi sono rappresentati da: darunavir + emtricitabina+ tenofovir e da darunavir+ raltegravir. Partecipano allo studio 15 Paesi europei, 82 centri clinici e 807 pazienti. L'ultimo paziente è stato arruolato nell'ottobre 2011, e quindi lo studio, che prevede un follow-up di 96 settimane/paziente, terminerà a fine 2013. Considerando i tempi per l'analisi statistica, il termine effettivo sarà nel 2014. ISS coordina i nove centri clinici italiani, nei quali sono stati arruolati 92 pazienti.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il NEAT 001 fornirà informazioni sul confronto tra due trattamenti, il primo basato su tre farmaci antiretrovirali e il secondo su due soli farmaci, somministrati per 96 settimane in soggetti HIV+ non precedentemente trattati con HAART. Il risultato atteso è di verificare

l'equivalenza dei due trattamenti e, quindi, la possibilità di utilizzare regimi HAART più semplici e presumibilmente più "convenienti" per il paziente. Tale equivalenza dovrà essere dimostrata non solo in base all'attività anti-HIV, cioè alla percentuale di risposte virologiche (HIV RNA plasmatico < 50 copie/ml) nei pazienti trattati con i due diversi regimi, ma anche in base all'andamento di parametri clinici AIDS e non-AIDS-relati. Lo studio fornirà informazioni su ulteriori aspetti come la qualità della vita associata ai due regimi HAART, la comparsa e l'andamento di disturbi cognitivo, le alterazioni del metabolismo osseo e della funzione renale

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati del NEAT 001 avranno una ricaduta immediata sulla pratica clinica, in quanto forniranno ai clinici informazioni su efficacia e tollerabilità a lungo termine di due regimi HAART contenenti farmaci innovativi. Se i due trattamenti si dimostreranno equivalenti, i clinici avranno a disposizione ulteriori opzioni terapeutiche per la terapia iniziale dei pazienti HIV+. Inoltre i risultati del NEAT 001 saranno presi in considerazione sia dagli esperti incaricati della stesura delle Linee Guida di terapia antiretrovirale che dalle autorità sanitarie per le loro decisioni in materia di politica sanitaria.

### **Studio degli effetti dell'inibitore dell'integrasi di HIV Raltegravir (RAL) sul sistema immunitario. Valutazione della comparsa di manifestazioni autoimmuni in corso di trattamento con RAL**

Gli inibitori dell'integrasi dell'HIV, oltre all'attività antiretrovirale, possono avere effetti sul sistema immunitario. Esistono infatti alcune analogie tra l'integrasi dei retrovirus e l'enzima RAG 1/2, che controlla il processo di riarrangiamento genico, fondamentale per la risposta immunitaria, sia B- che T-mediata. Inoltre, in animali predisposti geneticamente a malattie autoimmuni nelle quali è probabile il ruolo dei retrovirus, la somministrazione di RAL accelera la comparsa della malattia. Poiché il RAL è uno dei più recenti e potenti farmaci antiretrovirali, utilizzabile sia negli adulti che nei bambini, è importante valutare se la sua somministrazione protratta può produrre degli effetti sul sistema immunitario.

Lo studio in questione si propone di valutare la comparsa di manifestazioni autoimmuni in una coorte di soggetti HIV trattati con RAL, seguiti per almeno tre anni, e la comparsa di manifestazioni subcliniche negli stessi pazienti (presenza di autoanticorpi organo- e non organo-specifici, marcatori di attivazione policlonale delle cellule B e citochine infiammatorie).

Un secondo studio riguarderà l'allestimento di una coorte nazionale di pazienti affetti da malattie autoimmuni e infezione da HIV e trattati con RAL, nei quali l'andamento della condizione autoimmune sarà oggetto di uno stretto monitoraggio. Infine verrà esplorato l'eventuale effetto *in vitro* del RAL sulla differenziazione dei linfociti B.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Questo progetto fornirà informazioni attualmente non disponibili su effetti del RAL diversi dall'attività antiretrovirale. I risultati saranno importanti per la *safety* a lungo termine di questo farmaco ma anche per eventuali nuove prospettive sul suo uso in condizioni diverse dall'infezione da HIV.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le informazioni ottenute nei pazienti con HIV trattati con RAL saranno di immediata applicazione, in quanto arricchiranno quelle già note sulla *safety* a lungo termine del farmaco, e consentiranno una migliore selezione dei pazienti candidati a questa terapia.

Le informazioni aggiuntive ottenute negli studi *in vitro* rappresenteranno la base per intraprendere ulteriori ricerche su applicazioni innovative del RAL e di altri inibitori dell'integrasi di HIV.

### **Studio dell'effetto della gliadina e suoi peptidi sull'attivazione delle DC umane**

La malattia celiaca (MC) è una condizione infiammatoria cronica del piccolo intestino causata da una eccessiva risposta immunitaria che si manifesta nei soggetti geneticamente predisposti a seguito dell'ingestione del glutine, presente in alcuni cereali quali grano, segale e orzo. La MC è associata ad una mucosa duodenale atrofica e ad un elevato livello sierico di anticorpi (soprattutto IgA) contro la gliadina.

Al momento l'unica terapia adottata è una dieta priva di glutine (*Gluten Free Diet*, GFD). La dieta porta alla remissione del danno alla mucosa che riacquista così le sue caratteristiche fisiologiche e protegge dal rischio di sviluppare altre patologie autoimmuni associate alla MC.

Le DC svolgono un ruolo fondamentale nella generazione e nella regolazione delle risposte immunitarie e sono presenti in diversi compartimenti quali l'intestino. Le DC stabiliscono il bilancio tra l'immunità e l'induzione della tolleranza.

Lo scopo di questo progetto è quello di valutare l'effetto *in vitro* del digesto peptico-triptico della gliadina del grano sulla maturazione di DC umane ottenute dai monociti del sangue periferico di soggetti sani e l'impatto dei decapeptidi DAV e RPQ della gliadina nella modulazione della maturazione fenotipica e funzionale delle DC indotta dalla gliadina.

Questi studi potrebbero essere utili per supportare la massa a punto di strategie terapeutiche alternative per la cura della MC.

#### **Risultati attesi nel triennio**

L'obiettivo generale di questo studio è la valutazione dell'impatto dei decapeptidi della gliadina, DAV e RPQ, nella modulazione della maturazione fenotipica e funzionale delle DC indotta dalla gliadina. La gliadina infatti, determina una condizione infiammatoria cronica del piccolo intestino causata da una eccessiva risposta immunitaria.

Risulta, quindi, chiaro che l'identificazione di peptidi non tossici che inibiscono l'attività dei peptidi immunogenici della gliadina, riveste grande interesse per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche alternative alla dieta priva di glutine.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La MC è l'intolleranza alimentare più frequente in Italia e l'ultima Relazione al Parlamento italiano stima oltre 100.000 pazienti celiaci diagnosticati in Italia. L'onere della MC sull'SSN italiano è quindi rilevante.

L'unica terapia attualmente disponibile per i soggetti affetti da MC è la totale e permanente esclusione dalla dieta degli alimenti contenenti glutine. L'adesione alla terapia porta ad una totale remissione del danno alla mucosa intestinale e alla riduzione della morbilità e della mortalità della MC. Tuttavia, la GFD comporta una modificazione dello stile di vita, in quanto si devono eliminare dal proprio regime alimentare moltissimi cibi, senza contare l'attenzione che deve essere posta nella scelta di prodotti che, seppur naturalmente privi di glutine, potrebbero contenerlo sotto forma di additivo o conservante. Ne consegue che lo sviluppo di terapie alternative alla GFD è un obiettivo perseguito nell'ambito delle ricerche sulla MC.

## **Studio delle funzioni immunologiche delle forme episomali di HIV-1**

Il progetto ha come obiettivo primario la valutazione della capacità trascrizionale delle forme non integrate (episomali) di HIV-1 e la potenziale immunogenicità delle proteine trascritte da queste forme. In particolare il progetto si basa sull'ipotesi che le forme episomali di HIV-1 sono in grado di esprimere proteine virali che hanno funzione biologica, come è stato descritto per le proteine prodotte dalla controparte integrata. Quindi, le proteine prodotte dalle forme episomali, una volta processate endogenamente e presentate nel contesto delle molecole di istocompatibilità di classe I (sistema maggiore di istocompatibilità, MHC-I), permettono il riconoscimento delle cellule infette da parte del sistema immunitario e in particolare dalle cellule T CD8+ in assenza di provirus integrato. In questo contesto, e per valutare *in vivo* l'immunogenicità delle proteine prodotte dalle forme episomali utilizziamo vettori lentivirali nonintegranti basati su HIV-1 che producono solo forme episomali trascrizionalmente attive in assenza di provirus integrato.

Il riconoscimento immunologico di cellule contenenti forme episomali ma non provirus integrato, e quindi incapaci di produrre nuova progenie virale, ha quindi la funzione di stimolare in maniera continuata il sistema immunitario con forti implicazioni per la patogenesi dell'AIDS e per lo sviluppo di un vaccino.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il primo risultato rilevante che contiamo di ottenere consiste nella determinazione della stabilità delle forme episomali di HIV-1 *in vitro* in cellule replicanti come le cellule PBMC e in cellule terminalmente differenziate come i macrofagi e le DC, e *in vivo* nei topi Balb/c. Basandoci su dati preliminari ottenuti da noi e da altri gruppi ci aspettiamo che le forme episomali siano stabili in macrofagi e DC ma non in PBMC. I risultati di stabilità *in vitro* e *in vivo* ci consentiranno di proseguire con l'analisi funzionale delle forme episomali, per valutarne la funzione biologica. In particolare, ci aspettiamo di verificare che le proteine trascritte dagli episomi virali vengano prodotte in quantità sufficiente da indurre una risposta immunitaria. In questo senso utilizzeremo il modello dei vettori lentivirali Integrasi difettivi esprimenti antigeni di HIV-1. DC infettate con vettori lentivirali Integrasi difettivi ed esprimenti antigeni virali saranno quindi coltivate con linfociti T citotossici (CTL) antigene-specifici e utilizzate come cellule bersaglio. La capacità da parte delle proteine virali trascritte dagli episomi di venire riconosciute nel contesto dell'MHC di classe I indicherebbe che gli episomi rappresentano un serbatoio di produzione di proteine virali con implicazioni importanti per lo sviluppo di vaccini e la patogenesi dell'AIDS.

### **Trasferibilità dei risultati**

Le forme episomali di HIV-1 sono prodotte normalmente durante il corso dell'infezione nei pazienti infetti anche in assenza di plasmaviremia rilevabile. La loro presenza è quindi indice di replicazione criptica di HIV-1 in santuari di replicazione virale difficilmente raggiungibili dalla terapia antiretrovirale. La possibilità che le proteine virali trascritte dalle forme episomali siano riconosciute nel contesto dell'MHC-I indica che esse rappresentano un serbatoio di produzione di proteine virali, e quindi acquistano importanza per il riconoscimento immunologico durante il corso della malattia. Infine, le informazioni riguardanti i meccanismi molecolari che governano le funzioni delle forme episomali potranno essere utilizzate nel campo della terapia antivirale per lo sviluppo di farmaci anti-Integrasi, per la progettazione e lo sviluppo di vettori virali non integranti per la terapia genica nonché di un vaccino anti-HIV-1.

### **Studio dell'effetto immunomodulante di proteine virali e farmaci antiretrovirali**

La proteina Nef di HIV-1 è un determinante critico nella patogenesi dell'AIDS. A tutt'oggi, non sono stati del tutto chiariti i meccanismi utilizzati dal virus per evadere la risposta immune dell'ospite. In questo contesto, abbiamo dimostrato che Nef inibisce l'attività funzionale dei linfociti B e dei linfociti T CD8+, contribuendo probabilmente alla disfunzione della risposta umorale e cellulo-mediata. I pazienti infettati da HIV-1 sviluppano sintomi gastrointestinali e infezioni mucosali associate ad una disregolazione della risposta IgA agli antigeni del lumen intestinale. Il meccanismo di questa disregolazione potrebbe essere dovuto o ad un difetto intrinseco dei linfociti B o ad un difetto del *cross-talk* tra le cellule B e le cellule epiteliali, le DC e i linfociti T.

Scopo di questo progetto è:

- chiarire il ruolo di Nef nell'immunopatogenesi dell'AIDS, completando lo studio dei meccanismi di inibizione esercitati da Nef sui linfociti B. Inoltre, poiché le DC contribuiscono alle risposte innate contro i patogeni e regolano l'attivazione delle risposte immuni adattative, verrà valutata l'interferenza di Nef nel *cross-talk* DC/B;
- valutare l'effetto di Nef sul *cross-talk* tra le cellule epiteliali, che rappresentano la prima barriera che il virus incontra a livello mucosale e i linfociti B. Questo potrebbe essere utile nel disegno di vaccini preventivi o terapeutici contro l'HIV che potrebbero essere somministrati per via mucosale.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio è finalizzato a definire il ruolo di Nef nell'immunopatogenesi dell'AIDS valutando le interazioni di Nef con gli effettori dell'immunità innata e acquisita.

Questo potrebbe essere utile per identificare strategie terapeutiche che favoriscono l'attivazione dell'immunità anti-virale piuttosto che favorire la disseminazione del virus. Nef, anche se altamente variabile, è un ottimo candidato per un vaccino combinato in quanto viene precocemente espressa durante l'infezione, ha un ruolo chiave nella patogenesi dell'AIDS, ed è in grado di stimolare una efficiente risposta cellulare. Quindi, i risultati ottenuti nei nostri studi *in vitro*, possono contribuire a capire le funzioni, il meccanismo di azione e i partner cellulari e molecolari di Nef, al fine di sviluppare strategie terapeutiche volte sia ad esporre gli epitopi immunodominanti e a mascherare le sequenze responsabili degli effetti immunopatogenici di Nef, sia a supportare la messa a punto di farmaci anti-Nef.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati dello studio proposto, potranno contribuire a capire le funzioni, il meccanismo di azione e i partner cellulari e molecolari della proteina Nef nella interazione con la DC. Questo, al fine di definire il ruolo della proteina Nef nell'immunopatogenesi dell'AIDS e di supportare la messa a punto di costrutti codificanti versioni mutate di Nef che mantengono gli epitopi immunodominanti in grado di attivare le DC e i linfociti T citotossici, ma privi delle porzioni responsabili degli effetti immunopatogenici, ottenendo così la stimolazione di cloni T Nef-specifici. Quindi, gli studi proposti potrebbero essere utili per lo sviluppo di strategie terapeutiche, che favoriscano l'attivazione dell'immunità anti-virale e di farmaci anti-Nef.

### **Studio dell'impatto della terapia antiretrovirale sull'immunità mucosale**

L'obiettivo di questo studio è valutare l'ipotesi che negli eventi che portano a manifestarsi dell'AIDS nell'uomo, il ruolo dell'immunoattivazione mucosale e/o sistemica sia importante tanto quanto il ruolo della deplezione mucosale delle cellule T-CD4+ virus-mediata.

In aggiunta a questo obiettivo primario, l'attuale progetto si propone di studiare il ruolo delle cellule CD4 T *helper* che producono preferenzialmente la citochina pro infiammatoria denominata IL-17 (Th-17). Il razionale si basa sulla ipotesi che le differenze nei livelli e nella funzione delle cellule Th-17 circolanti siano coinvolti nel determinare le differenze nei livelli di immunoattivazione che distinguono l'infezione patogenica nell'uomo da quella non patogenica in ospiti naturali come le *Sooty Mangabeys*. A corollario il presente studio ipotizza che le modificazioni a livello mucosale dei livelli di cellule Th17 possano contribuire all'immunoattivazione e/o alla perdita dell'integrità mucosale nel contesto dell'infezione da HIV.

In questo studio verrà effettuata un'analisi indirizzata a comprendere le modificazioni dei livelli di attivazione delle cellule T mucosali e sistemiche nei pazienti HIV positivi in una fase precedente all'inizio della terapia antiretrovirale (*naïve*) e successivamente rispetto all'inizio della terapia.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio consentirà di comprendere le modificazioni dei livelli di attivazione delle cellule T mucosali e sistemiche nei pazienti HIV positivi in una fase precedente all'inizio della terapia antiretrovirale (*naïve*) e successivamente rispetto all'inizio della terapia.

Inoltre fornirà dati importanti circa: la presenza di correlazioni tra i livelli di immunoattivazione sistemici e mucosali; l'entità della deplezione linfocitaria delle cellule T CD4+ a livello mucosale; il ruolo dell'IL-17 prodotta dalle cellule T CD4+ attraverso un'analisi longitudinale dei livelli di IL-17 prodotti dalle cellule T CD4+ nel sangue periferico e nella mucosa intestinale dei soggetti HIV+ in fase pre e post-terapia (3-6 mesi); la potenziale correlazione tra IL-17 prodotta dalle cellule T CD4+ e i principali *marker* di progressione della malattia da HIV, inclusa la risposta immunologica alla terapia antiretrovirale.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questo studio fornirà nuove informazioni circa la patogenesi dell'infezione da HIV che potrebbero essere utili nel disegnare nuove e migliori strategie terapeutiche per il trattamento dell'infezione da HIV.

### **Studio di coorte NIA: Nuovi Inibitori Anti-HIV in pazienti HIV+, già trattati con farmaci appartenenti alle tre classi principali di antiretrovirali (IP, NRTI, NNRTI)**

Lo studio, coordinato dall'ISS, ha carattere osservazionale, e riguarda pazienti HIV già trattati con inibitori della proteasi e inibitori nucleosidici e non nucleosidici della trascrittasi inversa che iniziano, secondo indicazione del medico clinico curante, regimi con inibitori dell'integrasi (raltegravir) o antagonisti del co-recettore CCR5 (maraviroc). Lo studio prevede l'inserimento via web di comuni dati clinici e di laboratorio raccolti nell'ambito e con la tempistica della pratica clinica corrente. Sono anche raccolte informazioni sulla qualità della vita centrate sulla valutazione del paziente (questionari ISSQoL, EUROQoL, ABCD). Le principali misure di esito sono risposta immunologica (CD4) e virologica (HIV-RNA), sopravvivenza, progressione clinica della malattia, tossicità limitante il trattamento e tossicità a lungo termine. Sono previste valutazioni di qualità della vita, farmacoeconomia, farmacocinetica e virologia.

Lo studio ha chiuso gli arruolamenti con oltre 300 pazienti arruolati in 18 centri; al gennaio 2012 il follow-up triennale è in corso per la maggioranza dei pazienti, e alcune valutazioni preliminari su aspetti virologici sono state oggetto di presentazioni a congressi e pubblicate o in via di pubblicazione su riviste internazionali.

### **Risultati attesi nel triennio**

Si prevede il raggiungimento dei seguenti risultati:

- valutazione della risposta immunologica, clinica e virologica ai nuovi regimi di trattamento antiretrovirale;
- valutazione dell’impatto dei nuovi regimi di trattamento su misure di qualità della vita paziente-centrate;
- valutazione dell’impatto dei nuovi regimi di trattamento sulla lipodistrofia e sulle alterazioni metaboliche;
- identificazione di indici predittivi di interruzione della terapia con i farmaci di nuova generazione e dei motivi di interruzione;
- identificazione delle migliori strategie sequenziali di trattamento e delle migliori associazioni fra classi;
- identificazione di potenziali strategie “di risparmio” nell’ambito di un uso sequenziale dei nuovi antiretrovirali;
- valutazioni farmaco-economiche sull’impiego dei nuovi inibitori: analisi dei costi;
- valutazione dei livelli della carica virale associata a cellule (HIV-DNA) in associazione ai nuovi regimi di trattamento antivirale;
- definizione di modalità, tempi e caratteristiche dello sviluppo di resistenza agli antiretrovirali di nuova generazione;
- definizione del profilo genotipico di farmacoresistenza ai nuovi antiretrovirali;
- identificazione di marcatori di fallimento virologico;
- definizione del profilo farmacocinetico dei nuovi antiretrovirali in ambito di regimi di combinazione comprendenti altri farmaci di salvataggio.

### **Trasferibilità dei risultati**

Rispetto alla popolazione di studi clinici controllati, la casistica arruolata è caratterizzata da pazienti in condizioni più avanzate, con maggiore frequenza di terapie concomitanti multiple e condizioni cliniche importanti. Sono inoltre valutabili combinazioni di nuovi inibitori non previste dagli studi fin qui condotti. La definizione di sopravvivenza, tossicità, risposta viroimmunologica e durabilità del trattamento in queste situazioni ha quindi importanti presupposti di trasferibilità clinica.

Lo studio è inoltre articolato su vari piani di ricerca che permetteranno una definizione multidimensionale del profilo complessivo dei nuovi inibitori (qualità della vita e tossicità, resistenza, farmacocinetica, farmaco-economia). Si ritiene che da queste valutazioni e dalla possibilità di correlarne i relativi indici con elementi di comune valutazione clinica, si possa ottenere un contributo di informazione di sicuro interesse e di potenziale utilizzo in ambito di linee guida.

### **Studio di coorte NIAQOL (Nuovi Inibitori Anti-HIV / Quality of Life)**

Lo studio, di tipo osservazionale-longitudinale, si propone di analizzare in modo specifico informazioni derivanti da valutazioni espresse dello stesso paziente attraverso misurazioni della HRQoL.

Lo studio NIAQoL si inserisce all’interno di uno studio multicentrico di coorte NIA (Nuovi Inibitori Anti-HIV), coordinato dall’ISS. Lo studio NIA mira ad analizzare i dati raccolti nel corso della comune pratica clinica in pazienti con infezione da HIV già trattati con farmaci appartenenti alle tre classi (IP, *Nucleoside reverse transcriptase inhibitor* – NRTI, NNRTI), che iniziano una terapia di salvataggio con regimi contenenti i nuovi farmaci (inibitori della fusione, inibitori dell’integrasi, antagonisti del co-recettore CCR5).

### **Risultati attesi nel triennio**

L'obiettivo specifico del progetto è quello di migliorare la conoscenza dell'impatto sulla HRQoL dei nuovi regimi terapeutici su una popolazione con HIV/AIDS già trattata in precedenza.

Per il conseguimento dell'obiettivo specifico sono previsti i seguenti risultati attesi:

- migliorata conoscenza dell'impatto dei nuovi regimi di trattamento sulla lipodistrofia e sulle alterazioni metaboliche;
- migliorata conoscenza dell'impatto sulla qualità della vita di eventuali reazioni avverse correlabili al trattamento;
- migliorata conoscenza sul rapporto tra qualità della vita ed efficacia della terapia in termini di risposta immunologica-virologica;
- individuazione del gruppo di pazienti che maggiormente potrebbe beneficiare, in termini di miglioramento della qualità della vita, dell'utilizzo dei nuovi farmaci.

### **Trasferibilità dei risultati**

Il conseguimento dei risultati attesi dello studio permetterà di contribuire al miglioramento delle condizioni della popolazione con HIV/AIDS già trattata con i farmaci appartenenti alle tre classi (IP, NRTI, NNRTI) e sottoposta ad una terapia di salvataggio con regimi contenenti i nuovi farmaci (inibitori della fusione, inibitori dell'integrasi, antagonisti del co-recettore CCR5).

## **Sviluppo di anticorpi monoclonali umani specifici per antigeni virali e proteine implicate nella patogenesi dell'AIDS**

L'attività in corso consiste nello sviluppo di anticorpi umani in formato scFv specifici per antigeni implicati nella patogenesi dell'AIDS.

Parte del lavoro è incentrata sull'isolamento di nuovi anticorpi umani in grado di interferire con l'interazione tra proteine virali e cellule epiteliali, implicate nel processo di trascitosi, uno dei meccanismi principali di entrata dell'HIV a livello mucosale.

Un'area estremamente interessante è lo sviluppo di anticorpi monoclonali specifici per molecole immunoregolatriche. Anticorpi monoclonali diretti contro l'antigene PD1, (molecola coinvolta nel processo di *exhaustion* delle cellule immuni T) potrebbero essere impiegati per modulare efficacemente la risposta immune antivirale. Poiché recenti dati riportano una elevata espressione di PD1 su cellule T CD4 che contengono il DNA di HIV integrato, tale molecola può anche rivelarsi come un valido target per i serbatoi virali.

Inoltre, la metodologia del *phage display* rappresenta una versatile piattaforma per lo sviluppo di immunocitochine, costituite da scFvs fusi geneticamente con interleuchine, utili come terapeutici biologici per direzionare una particolare funzione su una specifica popolazione cellulare. Per esempio, lo sviluppo di una immunocitochina in grado di legarsi e di attivare selettivamente le cellule NK, potrebbe rivelarsi un'elegante strategia per ripristinare risposte immuni efficaci nel controllare l'infezione da HIV.

### **Risultati attesi nel triennio**

L'obiettivo principale di questa ricerca è quello di selezionare uno o più anticorpi monoclonali utilizzando un approccio biotecnologico basato sul *phage display* che consente di isolare frammenti anticorpali interamente umani e quindi predisposti per un utilizzo clinico. Gli anticorpi selezionati verranno analizzati geneticamente e caratterizzati per definirne le proprietà di legame e l'epitopo riconosciuto mediante ELISA, *Western Blot* e saggi di citofluorimetria. Gli scFv grazie alle loro modeste dimensioni molecolari potrebbero essere in grado di intercettare nuovi epitopi nascosti fondamentali per la replicazione virale inaccessibili alle immunoglobuline intere. Pertanto, gli anticorpi saranno

oggetto di indagine per verificare la loro capacità di interferire con il processo di infezione virale oppure di modulare le risposte immuni, singolarmente o come immunocitochine.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La gestione di persone con infezione da HIV prevede terapie antivirali per tutta la vita a causa della impossibilità di una completa eradicazione virale con i farmaci ad oggi disponibili, che si traduce in una tossicità cumulativa nei pazienti e in costi importanti per l'SSN. Inoltre l'insorgenza di varianti virali farmaco resistenti impone una continua ricerca di nuovi farmaci. Gli anticorpi rappresentano una nuova classe di farmaci biologici potenzialmente utili in combinazione con altri farmaci antivirali disponibili, ma i cui costi di produzione restano molto elevati. Gli anticorpi in formato di scFv sono generalmente meno costosi degli anticorpi monoclonali sviluppati in sistemi eucariotici perché necessitano di procedure di sicurezza semplificate. La metodologia da noi utilizzata fornisce anticorpi in scFv che possono essere prodotti in sistemi procariotici e rappresentano una piattaforma per lo sviluppo di nuovi immunoreagenti destinati ad un utilizzo clinico.

#### **Sviluppo di metodi cromatografici su strato sottile (HPTLC) rapidi ed efficaci per il controllo di qualità di prodotti a base di piante in grado di evidenziare possibili adulteranti rischiosi per la salute del consumatore**

La qualità di un prodotto di origine vegetale, sia come medicinale sia come integratore alimentare, è un requisito necessario anche se non sufficiente per garantire la sua sicurezza d'uso. I requisiti di qualità sono riferiti alla purezza, alla composizione quali-quantitativa e alle buone pratiche di fabbricazione sia della materia prima vegetale sia del prodotto finito.

Tali requisiti vengono garantiti quando il produttore assicura che i processi di raccolta, produzione e fabbricazione dei suoi prodotti avvengono secondo GMP (Direttiva 2001/95/CE) e il controllo qualità è assicurato con metodi standardizzati e convalidati o con metodi di analisi ufficiali descritti in Farmacopea.

Nelle WHO/EDM/TRM/2000.1 *Guideline* per definire la qualità di una pianta o di un prodotto a base di piante, la WHO suggerisce la possibilità di identificare una sostanza o una miscela di sostanze vegetali caratteristiche tramite il *fingerprint*, definito come impronta digitale specifica della pianta. La densitometria ottica accoppiata alla HPTLC consente di applicare la tecnica del *fingerprint*, per identificare velocemente e a basso costo eventuali adulterazioni e sofisticazioni di piante ad uso sia alimentare che farmaceutico.

Scopo di questo progetto sarà quello di verificare la qualità di preparati a base vegetale con la tecnica del *fingerprint*.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Le piante sono sempre state una fonte inesauribile di rimedi salutari e di alimenti salutistici per tale motivo in un momento in cui si assiste ad un incremento nel loro utilizzo la garanzia di qualità è una condizione imprescindibile.

Lo studio del profilo cromatografico, fornito dai costituenti chimici caratteristici e specifici di una droga vegetale, consente di individuare lo standard qualitativo del fitocomplesso al quale può essere attribuito l'effetto biologico, terapeutico e salutistico.

La caratterizzazione del fitocomplesso così ottenuta permette di individuare eventuali sofisticazioni o adulterazioni della droga vegetale in prodotti commerciali anche se non sono noti i costituenti attivi o i *marker* della stessa.

Perciò l'intento futuro del gruppo di Sostanze naturali, medicine tradizionali del FARM, all'interno dell'ISS, è quello di valutare la reale qualità di determinate piante presenti in commercio come tali o come preparati, molto spesso vendute e acquistate incautamente e capaci di dare reazioni avverse.

### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto ha lo scopo di elaborare nuovi metodi di analisi rapidi e qualitativamente riproducibili per caratterizzare piante di interesse commerciale emergente ancora non introdotte in Farmacopea Europea ma già utilizzate come materia prima in prodotti commerciali e individuare possibili sofisticazioni con altre piante o l'aggiunta di sostanze chimiche potenzialmente tossiche. Il metodo ufficialmente riconosciuto in Farmacopea Europea per l'identificazione qualitativa di una pianta è la PTLC) e tale progetto ha anche l'intento di ottimizzare analisi preesistenti al fine di migliorarne i risultati.

Il progetto è in linea con le WHO *Guideline* del 2004, e le linee guida EMEA del 2008, EMEA/HMPC/CHMP/CVMP/214869/2006 ed EMEA/HMPC/253629/2007 per il controllo della qualità dei prodotti a base di erbe.

### **Sviluppo e convalida di nuove procedure analitiche da utilizzare nei laboratori OMCL per il controllo post-marketing di gruppi di medicinali contenenti la medesima sostanza attiva**

L'ISS è il laboratorio ufficiale per il controllo dei medicinali per l'Italia, che esegue analisi per verificare, una volta sul mercato, che siano conformi alle specifiche approvate nella documentazione presentata per ottenere l'autorizzazione all'immissione in commercio. Tale attività viene effettuata sotto il coordinamento dell'EDQM, che verifica l'affidabilità dei dati prodotti attraverso ispezioni e confronti inter-laboratorio.

Nell'ambito di tale attività, il FARM si occupa del controllo di medicinali di origine chimica, effettuando controlli post-marketing a seguito di segnalazioni di potenziali difetti o attraverso un Programma di controllo annuale e accertamenti connessi con il commercio di medicinali contraffatti e/o illegali. L'attività svolta è principalmente di tipo non routinario, infatti i prodotti e i materiali da testare possono variare da un singolo medicinale a gruppi di medicinali con la stessa sostanza attiva. I metodi utilizzati sono principalmente quelli forniti dalle ditte produttrici, depositati al momento della registrazione e accettati dall'autorità regolatoria. Il Laboratorio può utilizzare anche metodi ufficiali, come quelli riportati nelle monografie di Farmacopea, qualora disponibili. L'obiettivo del progetto è quello di sviluppare procedure analitiche che possano essere utilizzate per il controllo di un gruppo di medicinali con la stessa sostanza attiva, ma provenienti da diverse officine e con diversi titolari dell'AIC.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il programma annuale di controllo dei medicinali prevede l'analisi di gruppi di medicinali contenenti la stessa sostanza attiva. Fino ad oggi è stato necessario utilizzare un numero considerevole di procedure analitiche sviluppate dai singoli produttori. L'obiettivo di questo progetto è quello di sviluppare delle nuove procedure analitiche per ottimizzare e facilitare l'analisi di più medicinali contenenti la stessa sostanza attiva.

Nell'ambito del Network OMCL, è stato istituito un database che permette di inserire i programmi di controllo dei medicinali dei singoli Paesi per far sì che non vengano ripetute le analisi sullo stesso medicinale, ma possano essere riconosciuti a livello nazionale i controlli effettuati da un altro Paese europeo aderente al Network. In questo modo si evita di duplicare le analisi sullo stesso prodotto nei diversi paesi europei e, a fronte di un impegno leggermente più gravoso per i singoli paesi, c'è un notevole incremento del controllo globale dei medicinali.

Lo scopo di questo progetto si integra perfettamente nell'ottica europea, puntando alla riduzione dei costi in termini di tempo, di risorse economiche e di personale. Questo porterebbe ad una maggiore efficienza che permetterebbe all'OMCL di partecipare più

attivamente all'MRP/DCP (*Material Requirement Planning / Product Testing Database*) e quindi di beneficiare della condivisione dei risultati con gli altri Paesi europei.

#### **Trasferibilità dei risultati**

In una prima fase i risultati ottenuti potranno essere condivisi con gli altri OMCL attraverso pubblicazioni e/o comunicazioni orali.

Successivamente la predisposizione di metodi analitici comuni a più medicinali provenienti da diversi produttori potrebbe fornire le basi per la stesura di monografie della Farmacopea europea relative a prodotti finiti, così come già sono presenti in Farmacopea britannica o in quella americana. In questo modo ci sarebbe il riconoscimento di uno standard comune europeo, utile sia per i laboratori di controllo, sia per garantire una migliore qualità dei medicinali commercializzati in Europa e sempre più prodotti da Paesi extraeuropei, principalmente asiatici.

#### **Sviluppo e ottimizzazione di metodi innovativi per l'analisi dei reservoir di HIV**

La quantificazione dei *reservoir* di HIV durante la terapia antiretrovirale è un *endpoint* cruciale e di fondamentale importanza nella valutazione di strategie che mirano alla eradicazione dell'infezione di HIV.

Anche se differenti test per quantificare l'HIV DNA totale e l'HIV-1 DNA integrato sono stati sviluppati, essi sono ancora complessi e mancano di riproducibilità.

Quando il DNA virale lineare non riesce ad integrarsi nei cromosomi cellulari genera i DNA extracromosomali (E-DNA): circoli 1-LTR, 2LTR e DNA lineare. Queste forme extracromosomali rappresentano la frazione più grande del DNA virale presente nel nucleo delle cellule recentemente infettate (Meyerhans, 2003). Finora, solo le forme circolari 2-LTR sono state rilevate e quantificate con tecniche di biologia molecolare (Sharkey, 2000). Si presume che le forme extracromosomali di HIV-DNA siano labili e la loro rivelazione in pazienti con soppressione virologica (Buzon, 2010) è considerato un *marker* di infezione recente (Sharkey, 2011); i saggi per la quantificazione dei circoli 2-LTR sono già descritte e utilizzando la PCR *Real time* basata su sonde; a causa della presenza di inserzioni e/o delezioni nella sequenza di giunzione dei circoli 2-LTR questi test possono sottostimare la quantità reale di tali circoli (Cara *et al.*, 2002). La quantificazione dei circoli 1-LTR può fornire un indicatore ancora più sensibile perché i circoli 1-LTR sono più rappresentati dei circoli 2-LTR (rapporto 9:1)

#### **Risultati attesi nel triennio**

Al fine di sviluppare un nuovo test per la quantificazione dell'HIV-DNA integrato svilupperemo sviluppare una nuova tecnica basata su due diverse preparazioni campione di DNA da cellule. In questo saggio, l'HIV-DNA totale e integrato saranno quantificati utilizzando una unica PCR *real time* e con lo stesso standard di quantificazione. Questo nuovo approccio permetterà di valutare e comparare con precisione la percentuale di cellule latentemente infette rispetto la quantità totale di HIV-DNA. Inoltre il numero globale di tutte le forme di non integrati di HIV-DNA (lineare e circoli) sarà stimata una semplice differenza. Nuovi metodi per l'estrazione del DNA totale saranno sviluppati e testati in parallelo per entrambi i marcatori. La quantificazione delle forme circolari extracromosomali può essere un *marker* putativo di infezione di nuove cellule *in vivo* e il nostro obiettivo è quello di sviluppare nuovi metodi per ottenere la quantificazione di entrambi i circoli 2-LTR circoli e 1-LTR. Useremo una tecnica basata su un SYBR *green real-time* PCR per dare conto della variabilità delle giunzioni 2-LTR.

### **Trasferibilità dei risultati**

Lo sviluppo e la validazione di queste tecniche permetterà di avere degli strumenti importanti necessari alla valutazione della efficacia di strategie terapeutiche basate sulla intensificazione e ancora di più sull'uso di farmaci innovativi che mirano alla eradicazione del virus. Questi metodi, una volta validati, saranno proposti come *marker* sensibili per valutare la persistenza dell'infezione di HIV in studi clinici.

### **Terapia sperimentale della cardiomiopatia da deficit di distrofina**

La terapia della distrofia muscolare di Duchenne dipende dallo sviluppo di strategie terapeutiche innovative che siano in grado di incrementare la sopravvivenza e migliorare la qualità di vita dei pazienti distrofici.

La perdita di distrofina è responsabile di gravi e irreversibili alterazioni di tipo degenerativo a carico della muscolatura scheletrica ma anche del muscolo cardiaco. Incrementare l'espressione tissutale di utrofina, un gene correlato alla distrofina, rappresenta una promettente strategia terapeutica grazie alla sua abilità di compensare la perdita di distrofina senza indurre una reazione immunologica.

Recentemente, è stato dimostrato che l'incrementata espressione di utrofina a livello del muscolo scheletrico ad opera di fattori trascrizionali sintetici è in grado di attenuare il fenotipo distrofico in topi che mancano di distrofina (topi MDX). Nel presente progetto intendiamo studiare se l'incrementata espressione di utrofina a livello cardiaco ad opera di fattori trascrizionali sintetici è in grado di prevenire l'insorgenza di disfunzione cardiaca in topi MDX.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono di due tipi: primo, migliorare le conoscenze sull'impiego dei fattori trascrizionali sintetici; secondo, prevenire la disfunzione cardiaca nel topo distrofico.

### **Trasferibilità dei risultati**

I fattori trascrizionali sintetici sono piccole molecole, attive a bassa concentrazione, che mimano i meccanismi regolatori naturali dell'organismo. Alcune di essi vengono già utilizzati come farmaci in diversi *trial* clinici. Tutti questi aspetti dovrebbero favorire una rapida trasferibilità dei risultati ottenuti in campo clinico.

### **Terapie combinate per la cura dell'epatite virale di tipo C (HCV): reclutamento dei pazienti basato sulla caratterizzazione genetica e virologica**

L'HCV infetta oltre 170 milioni di persone nel mondo e può condurre a gravi esiti. La terapia attuale consiste nella somministrazione di PEG-IFN e RBV, è efficace solo nel 50% dei casi ed è spesso associata ad effetti secondari significativi. Negli ultimi anni sono stati messi a punto farmaci diretti verso la proteasi NS3 e la RNA polimerasi NS5 (STAT-C: *specifically targeted antiviral therapies for HCV infection*). Il goal è di sviluppare terapie sicure ed efficaci altamente specifiche per ogni individuo infetto. I principali ostacoli sono rappresentati dalla insorgenza di farmaco-resistenze e dalla presenza di effetti secondari sia con la terapia tradizionale che con i nuovi farmaci. Per la messa a punto delle migliori strategie terapeutiche si rendono indispensabili lo studio della variabilità virale e la ricerca di biomarcatori quali ad esempio il polimorfismo all'interno dell'IFN-lambda/IL28B che correla fortemente sia con la risposta alla terapia tradizionale (PEG-IFN e RBV) che con la *clearance* virale spontanea dell'infezione. Lo scopo del progetto è costruire un algoritmo per indirizzare ogni paziente verso la terapia migliore. Dalla collaborazione con i reparti ospedalieri e i laboratori vogliamo implementare la pratica clinica nel reclutamento dei pazienti. Un approccio multidisciplinare è essenziale per l'eradicazione del virus, per

limitare gli effetti secondari della terapia, per aumentare la compliance e per ridurre i costi delle terapie.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Per ciascun paziente analizzeremo le caratteristiche genetiche e virologiche:

- Contesto genetico dell'ospite: l'analisi di pazienti HCV positivi permetterà di costruire una banca dati dei genotipi IL28B. Questa banca dati potrà permettere la futura pianificazione di protocolli standardizzati così come la costruzione di *trial* clinici *ad hoc*. Nella seconda fase del progetto queste conoscenze verranno trasferite alla pratica clinica.
- Dosaggio dei farmaci: il bilanciamento tra dose del farmaco (considerando gli effetti collaterali) e la scomparsa del virus (attraverso l'introduzione di una fortissima pressione selettiva rappresentata dalla terapia) dovrà essere analizzata in un approccio multidisciplinare che metta in correlazione laboratorio e clinica.
- Resistenza (genotipi e/o varianti virali resistenti alla terapia e loro tempo d'insorgenza): lo sviluppo e il successivo utilizzo dei farmaci STAT-C richiede l'identificazione precoce dei mutanti resistenti. La costruzione di un database delle sequenze nucleotidiche e amminoacidiche nonché della struttura della proteina coinvolta nella resistenza al farmaco sarà usata per la messa a punto di rapidi strumenti diagnostici e per verificare la presenza nella popolazione virale di varianti resistenti pre-esistenti alla terapia in modo da adattare i protocolli terapeutici.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questo progetto è basato sulla collaborazione tra ISS e la maggiore associazione epatologica italiana, l'Associazione Italiana per lo Studio del Fegato (AISF). Il numero e la qualità delle strutture ospedaliere, delle cliniche universitarie e degli IRCSS coinvolti nel reclutamento dei pazienti ne assicura il successo.

Il progetto darà ai clinici la possibilità di inserire il singolo paziente nel protocollo terapeutico più appropriato seguendo un algoritmo basato sulla genetica umana e sulle caratteristiche virologiche.

Questo progetto è costruito per essere applicato immediatamente alla clinica. La conoscenza acquisita sarà usata direttamente per migliorare i protocolli terapeutici durante l'intera durata del progetto.

#### **TM9SF4: una proteina associata al fenotipo metastatico dei tumori umani. Caratterizzazione di un nuovo potenziale bersaglio per strategie di lotta ai tumori umani**

TM9SF4 è una proteina transmembrana caratterizzata da un dominio idrofilico seguito da nove domini transmembrana, probabilmente un canale ionico o di un trasportatore di ioni. In un recente lavoro abbiamo dimostrato che TM9SF4 è altamente espressa in cellule metastatiche di melanoma, mentre nelle stesse condizioni sperimentali, la stessa non è individuabile nel tessuto sano corrispondente. Abbiamo inoltre dimostrato che TM9SF4 è associata al "cannibalismo" tumorale (un fenomeno correlato alla progressione maligna) e alla regolazione del pH intracellulare. Evidenze preliminari sembrano infine suggerire che TM9SF4 è altamente espressa vari tumori di diverso istotipo, dove sembra essere coinvolta nella resistenza ai farmaci (Cisplatino, 5-FU).

Gli obiettivi principali di questo studio possono essere qui riassunti: i) caratterizzare TM9SF4 come marcatore diagnostico o di prognosi nei tumori umani; ii) identificare le vie di segnale in cui questa proteina è coinvolta, ponendo particolare attenzione al suo ruolo nel traffico vescicolare e nei processi di autofagici; iii) studiare il ruolo di TM9SF4 nella

diffusione metastatica; iv) per analogia a quanto è descritto in letteratura per altre proteine coinvolte nella regolazione del pH, studiare il ruolo di TM9SF4 nella resistenza ai farmaci.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Al fine di ottenere i risultati ipotizzati, prima di tutto verranno clonate tumorali di diverso istotipo in cui TM9SF4 verrà silenziata o espressa in modo aberrante. Utilizzando questi modelli in esperimenti di biologia cellulare e molecolare e in esperimenti di analisi proteica e saggi *in vitro* di interazione proteina/proteina sarà possibile caratterizzare le vie di segnale che vedono coinvolta TM9SF4, identificandone le proteine interagenti.

Partendo dal presupposto che questa proteina coinvolta nei processi di endocitazione, esperimenti di invasività forniranno le evidenze necessarie alla comprensione del ruolo di TM9SF4 nella diffusione metastatica e in particolare nei processi di digestione della matrice extracellulare. Esperimenti *in vitro* e *in vivo* su modelli murini permetteranno infine di ottenere risultati necessari alla comprensione del ruolo di TM9SF4 nei meccanismi di resistenza ai farmaci che vedono coinvolto il traffico vescicolare e alterazioni di pH.

I risultati ottenuti verranno utilizzati per la redazione di manoscritti che verranno inviati per la pubblicazione a riviste ad alto *impact factor*.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Gli studi relativi alla caratterizzazione dei meccanismi molecolari che coinvolgono TM9SF4 potranno contribuire alla identificazione di nuovi strumenti di diagnosi e di monitoraggio clinico dei pazienti oncologici. Inoltre gli studi preclinici *in vitro* e *in vivo* svolti per questo progetto potrebbero rappresentare un importante punto di partenza per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche basate sull'utilizzo di anticorpi monoclonali o di molecole di sintesi aventi come bersaglio TM9SF4.

### **Uso della chemometria nell'analisi di farmaci contraffatti e generici illegali tramite spettrofotometria nell'infrarosso vicino**

La diffusione dell'*e-commerce* di farmaci di dubbia origine pone un problema di grande rilievo per la salute pubblica. Tale diffusione deriva dalla facilità con cui il paziente può procurarsi i farmaci tramite farmacie online (non si ha bisogno di prescrizione medica). Nella maggior parte dei casi si tratta di prodotti contraffatti veri e propri, oppure di medicinali illegali (che non imitano l'aspetto degli originali, ma non sono autorizzati al commercio in Europa). La WHO ha sancito la necessità per tutti i laboratori di controllo farmaceutico di dotarsi di metodi rapidi e a basso costo per lo screening di tali farmaci, per accertarne l'effettiva contraffazione e per stabilirne il grado di pericolosità. In tal senso questo progetto si propone di sviluppare un metodo di analisi NIR (*Near Infrared Spectroscopy*) che permetta di:

- Stabilire con analisi rapide e non distruttive se un dato campione è o meno un farmaco contraffatto.
- Costruire una banca dati di campioni originali e una di campioni contraffatti/illegali.
- Tramite il confronto con le suddette banche dati stabilire se il farmaco è contraffatto e se fa parte di un lotto eventualmente già analizzato in precedenza. In questo modo si otterranno due vantaggi: se il farmaco è identico ad altri già esaminati in passato non sarà necessario effettuare ulteriori analisi; stabilire se un farmaco appartiene a un determinato lotto esaminato durante indagini precedenti aiuterà le forze di polizia a tracciarne l'origine.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Nella prima fase del progetto verranno reperiti e analizzati tutti i campioni originali posseduti dal Reparto e altri forniti da terze parti, così da costruire una banca dati che includa

tutta la variabilità dovuta alle piccole differenze tra lotti diversi dello stesso farmaco. Si ripeterà lo stesso processo anche su tutti i campioni contraffatti e illegali analizzati in passato e ancora disponibili. Una volta accumulati in questo modo una serie considerevole di dati, verrà messo a punto un algoritmo chemometrico in grado di dividere tutti i campioni analizzati in famiglie. Nella terza fase del progetto si cominceranno ad analizzare i nuovi campioni che arriveranno al Reparto, stabilendo se appartengono a qualcuna delle famiglie suddette. Se l'algoritmo chemometrico sarà stato costruito in modo corretto, ci si attende che il metodo sia in grado di stabilire se un nuovo campione appartenga o meno alla famiglia degli originali, o se appartenga ad una famiglia di farmaci contraffatti/illegali già presente in banca dati, o se faccia parte di una nuova categoria mai incontrata in precedenza. Se il campione appartenesse ad una famiglia già nota, non sarà necessario sottoporlo ad ulteriori analisi, perché la sua natura e il suo contenuto sono già noti. Una volta che il metodo sarà validato e ne sarà confermata l'efficacia, sarà possibile ridurre in modo sostanziale il numero di analisi che il Reparto dovrà effettuare, con una significativa riduzione dei costi e dell'impegno del personale.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il metodo descritto potrà essere trasferito a tutti i laboratori che dispongano di uno spettrofotometro NIR. Sia l'algoritmo chemometrico che gli spettri presenti in banca dati potranno essere trasferiti per implementazione e sviluppo. In particolare il metodo potrà essere trasferito agli altri gruppi della rete europea degli OMCL e ad altri laboratori di controllo e non, mediante pubblicazioni scientifiche, presentazione a convegni e mediante i meetings annuali degli OMCL.

La metodica NIR sarà applicata per analisi di campioni contraffatti richieste dall'AIFA, dal Ministero della Salute e dall'Autorità Giudiziaria.

Si otterranno nuove informazioni sul fenomeno della contraffazione, in particolare si raccoglieranno dati che, nelle mani delle forze di polizia, potranno permettere di tracciare la provenienza dei farmaci sequestrati. Tali dati potranno poi essere utilizzati per campagne di informazione ai cittadini.

#### **Utilizzo di vettori lentivirali non integranti per una piattaforma vaccinale**

I vettori lentivirali sono usati per ottenere un'efficace espressione dei geni di interesse nell'ambito di strategie vaccinali e di terapia genica. Tuttavia, come la loro controparte parentale, i vettori lentivirali integrano in maniera non specifica nel genoma della cellula bersaglio. Di conseguenza, le preoccupazioni di bio-sicurezza rispetto all'uso di questi vettori per il trasferimento *in vivo* di geni terapeutici, includono l'integrazione del vettore con conseguente rischio di mutagenesi inserzionale. Per minimizzare questo rischio abbiamo progettato vettori lentivirali difettivi nella proteina integrasi, al fine di impedire l'integrazione del vettore lentivirale nella cellula bersaglio. I vettori lentivirali integrasi-difettivi (*Integrase Defective Lentiviral Vector*, IDLV), benché incapaci di integrarsi nel genoma, permettono la produzione di forme circolari non integrate di DNA virale episomale (E-DNA). Nel corso degli anni abbiamo dimostrato che l'E-DNA è competente per la produzione di proteine utili a scopo vaccinale. Il nostro gruppo di ricerca usa gli IDLV come piattaforma vaccinale per la veicolazione di antigeni importanti per le patologie umane, come gli oncogeni E6 ed E7 del virus del papilloma umano (*Human Papilloma Virus*, HPV), le proteine Env, Gag e Nef del virus dell'immunodeficienza acquisita umana (HIV-1), la proteina M1 del virus dell'influenza e l'antigene H56 del micobatterio tubercolare.

### **Risultati attesi nel triennio**

Gli IDLV esprimenti gli antigeni d'interesse verranno utilizzati in modelli preclinici murini d'immunizzazione. Ci aspettiamo che un singolo inoculo del vettore sia in grado di indurre una risposta duratura nel tempo in grado di stimolare la produzione di anticorpi e di cellule CD8 citotossiche antigene-specifico. Per dimostrare l'efficacia di questi vettori nell'uomo, utilizzeremo DC derivate da donatori sani o infetti con agenti patogeni per trasdurle *in vitro* con IDLV esprimenti gli antigeni di riferimento. Valuteremo quindi la capacità delle DC trasdotte con IDLV di indurre una risposta specifica nei confronti dell'antigene. Risultati preliminari indicano che DC trasdotte con IDLV esprimenti la proteina M1 e coltivate *in vitro* con PBMC autologhi, sono in grado di espandere efficacemente i linfociti T CD8+ autologhi M1-specifici, indicando che IDLV è un buon sistema per l'induzione di risposte immunitaria e per il trasferimento di antigeni nel contesto umano.

### **Trasferibilità dei risultati**

Nel nostro laboratorio abbiamo sviluppato un sicuro e innovativo sistema di veicolazione dei vaccini basato sull'utilizzo di IDLV che, opportunamente ingegnerizzati e in seguito immessi nella cellula ospite, risultano molto efficienti nel permettere la produzione di proteine immunogeniche. Questo sistema trova altresì un importante punto di forza nella maggiore sicurezza dovuta proprio alla mancanza di integrazione del DNA estraneo nel materiale genetico della cellula trasdotta, risultando quindi al contempo sicuro e molto efficace nell'indurre una forte risposta immunitaria dell'ospite, rendendo gli IDLV particolarmente attrattivi per protocolli di vaccinazione e terapia genica.

## **Valutazione della seconda linea di terapia per l'infezione da HIV nei Paesi con risorse limitate**

Il *trial* EARNEST (*Europe – Africa Research Network for Evaluation of Second-line Therapy*), sponsorizzato dall'*European Developing Countries Trials Partnership* (EDCTP), ha l'obiettivo di valutare diverse strategie per la seconda linea di terapia per i pazienti con infezione da HIV nei Paesi con risorse limitate.

Lo studio prevede la partecipazione di 13 istituzioni africane di cinque diversi Paesi (Uganda, Zimbabwe, Malawi, Zambia e Kenya) e di cinque istituzioni europee tra cui l'ISS.

Il *trial*, iniziato nell'aprile del 2010, ha arruolato 1.200 pazienti in fallimento (in base a criteri clinici e immunologici) che sono stati randomizzati a uno dei tre bracci dello studio:

- due inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa + un inibitore della proteasi (*Standard of care*)
- un inibitore della proteasi + un inibitore della integrasi (raltegravir)
- un inibitore della proteasi in monoterapia (dopo una induzione di 12 settimane in terapia di combinazione con il raltegravir)

I pazienti saranno seguiti per un minimo di 144 settimane. La fine del follow-up è prevista per marzo 2013.

Verrà inoltre condotto un sottostudio per la valutazione dell'impatto virologico (in termini di replicazione virale e profilo di resistenze) a livello delle secrezioni genitali di questi regimi terapeutici dopo due anni di trattamento.

### **Risultati attesi nel triennio**

In Africa ci sono due fattori che possono influenzare la definizione di regimi ottimali per la seconda linea di terapia: la diagnosi tardiva di fallimento con conseguente presenza di estesa resistenza agli NRTI al fallimento, e la possibilità limitata di individualizzare il *backbone* degli NRTI. Questo può far sì che il contributo in termini di efficacia degli NRTI

in un regime di seconda linea sia modesto. È anche possibile che sostituendo gli NRTI con una nuova classe di farmaci quali gli inibitori dell'integrasi, l'outcome di una seconda linea di terapia possa migliorare, sebbene se l'inibitore della proteasi con *booster* (b-PI) da solo desse una risposta quasi ottimale, gli ulteriori vantaggi dall'aggiungere una nuova classe di farmaci potrebbero essere modesti.

In questo contesto lo studio EARNEST ha i seguenti obiettivi principali:

- stabilire se l'uso di un b-PI + raltegravir in seconda linea è superiore allo *standard of care*;
- stabilire se un b-PI da solo (dopo un periodo di induzione di 12 settimane di terapia di combinazione con il raltegravir) è non-inferiore allo *standard of care*.

Inoltre, verranno arruolati 200 pazienti nel sottostudio delle secrezioni genitali, che è coordinato dall'ISS, che svolgerà le analisi virologiche previste, e dal centro collaborante di Kampala, Uganda, che svolgerà le attività cliniche e il coordinamento locale degli altri siti partecipanti.

### **Trasferibilità dei risultati**

La conduzione di studi strategici sulla seconda linea di terapia con finalità di sanità pubblica è una grande priorità della ricerca nei paesi in via di sviluppo. I costi considerevolmente più alti della terapia di seconda linea rappresentano un ulteriore stimolo all'ottimizzazione delle strategie in questo contesto. La maggior parte dei programmi nazionali di trattamento antiretrovirale già prevedono di fornire una nuova terapia ai pazienti che falliscono la prima linea di trattamento e studi che valutino un approccio semplificato sono pertanto particolarmente rilevanti.

Le ricadute locali della collaborazione dell'ISS con il centro di Kampala per l'effettuazione del sottostudio delle secrezioni genitali, comprendono l'aumentata capacità del team locale di coordinare centri satelliti in ambito di studi multicentrici e l'acquisizione di esperienza in tecniche per la raccolta di secrezioni genitali di applicabilità in possibili studi futuri o nella pratica clinica.

## **Valutazione preclinica dei farmaci e sperimentazioni cliniche di fase I**

L'attività del Reparto mira a potenziare la capacità *Scientific Based Drug Assessment* (SBDA) dei ricercatori, quale strumento di tutela della salute pubblica nella autorizzazione/registrazione dei farmaci.

L'accelerato sviluppo dei medicinali e il mercato globale, esigono l'applicazione nella valutazione di norme e linee guida internazionalmente codificate.

A livello nazionale, il potere decisionale delle Regioni nell'assistenza farmaceutica richiede esperti qualificati per la valutazione nonclinica e clinica dei farmaci. Ad oggi non c'è una struttura valutativa nazionale che fornisca valutazioni di standard europeo, procedure di buona prassi valutativa e formazione di valutatori.

I DL.vi 211/2003, 200/2007, DPR430/2001 che indicano l'ISS quale Autorità competente per l'autorizzazione delle sperimentazioni cliniche di fase I, hanno avuto un forte impatto regolatorio sulle sperimentazioni promosse da enti non commerciali. In particolare il DL.vo 211/2003, che recepisce la Direttiva 2001/20/EC, imponendo l'applicazione delle norme di buona pratica (GMP, *Good Laboratory Practice* – GLP e *Good Clinical Practice* – GCP) per ogni sperimentazione può rallentare lo sviluppo di prodotti non industriali anche per carenza di formazione regolatoria sulla preparazione/presentazione di dossier autorizzativi.

Anche i farmaci naturali di origine vegetale presentano criticità valutative, e richiedono un approccio "caso per caso", le loro proprietà "intrinseche" ne determinano la corretta collocazione sul mercato e sono oggetto di discussione

### **Risultati attesi nel triennio**

Si attendono i seguenti risultati:

- Creazione di un Programma nazionale di formazione di *Assessor*, attraverso una struttura interna al FARM, che interagisca direttamente con AIFA e Servizio Sanitario Regionale (SSR).
- Accordo di collaborazione con il Ministero della Salute per la realizzazione di un programma di formazione e ispezione relativo alla GLP.
- Attività di formazione e informazione sugli aspetti tecnici e regolatori, diretta agli IRCCS e istituti di ricerca pubblici per la promozione della ricerca clinica nel settore delle bioterapie dei tumori, con la partecipazione di rappresentanti di agenzie regolatorie.
- Sviluppo di uno sportello informatico sul territorio nazionale, con accesso interattivo alle informazioni su normativa e procedure di presentazione della documentazione necessaria per la richiesta di autorizzazione alla sperimentazione clinica di fase I.
- Realizzazione di attività di supporto regolatorio (es. audizioni *presubmission*) utili a favorire una più rapida interazione fra ricercatori clinici e autorità regolatorie.
- Analizzare la potenzialità di nuove molecole ad attività anticolinesterasica derivate da sostanze vegetali.
- Proporre protocolli per una corretta valutazione della sicurezza dei prodotti naturali di origine vegetale, al fine di un loro eventuale sviluppo come prodotti medicinali.

### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- Attività di segreteria tecnico-scientifica della “Commissione per valutazione dell’ammissibilità alla sperimentazione clinica di fase I”.
- Attività di consulenza, mediante audizioni *pre-submission* volta fornire un supporto regolatorio per la presentazione di richieste di autorizzazione per sperimentazioni cliniche di fase I.
- Valutazione del modulo IV di dossier registrativi in ambito europeo: procedure centralizzate, decentrate e di mutuo riconoscimento.
- Organizzazione di corsi di formazione per assessor non clinici, per promuovere e perfezionare la capacità di SBDA dei singoli ricercatori, consentendogli di elaborare rapporti valutativi di elevato standard internazionale.
- Organizzazione di corsi di aggiornamento per ispettori GLP.
- Riduzione dei tempi della ricerca traslazionale e più rapido trasferimento dei risultati dal laboratorio al letto del malato.



**Dipartimento  
Farmaco**

---

**Attività di controllo, valutazione, parere**



### **Accertamenti ispettivi relativi a BPL e GMP (sostanze farmacologicamente attive e medicinali finiti)**

In relazione all'attività GMP, il Dipartimento collabora con l'AIFA alle ispezioni di GMP. Quattro esperti del Dipartimento sono infatti inseriti nella lista di ispettori nazionali per la verifica della conformità alle normative EU GMP Parte I e II, in siti di produzione di sostanze farmacologicamente attive e prodotti medicinali finiti; uno degli esperti ha svolto attività anche in siti di produzione extraeuropei (India, Cina, Corea). Due ulteriori esperti partecipano inoltre alle ispezioni congiunte AIFA/ISS su siti produttivi di radiofarmaci, in quanto è richiesto espressamente dal DL.vo 219/2006 art. 53. comma 12, che la visita ispettiva venga condotta da un team misto AIFA-ISS. Di recente gli ispettori svolgono anche gli accertamenti ispettivi sui siti produttori/distributori di gas medicali precedentemente svolte dal NAS.

In relazione all'attività BPL il Dipartimento partecipa al coordinamento e all'attività ispettiva per la certificazione sul territorio nazionale dei centri di saggio che intendono condurre studi non clinici in conformità ai principi della BPL in accordo al DL.vo 50 del 2007 e del Decreto del Ministro della Salute del marzo 2008. Nell'ambito di questa attività, un esperto del Dipartimento partecipa a riunioni per la programmazione e l'assegnazione delle verifiche ispettive BPL e svolge attività di coordinamento delle ispezioni. Inoltre tre esperti, con la nomina di Ispettore, svolgono l'attività di controllo della conformità alle BPL nei centri di saggio italiani, ed eventualmente, su richiesta, anche in centri con sede in Paesi dell'OECD. Il numero di ispezioni medie-annue è dieci.

#### **Attività programmata**

GMP: Si prevede il proseguimento di queste attività con un impegno di circa dieci ispezioni annue/uomo per sostanze farmacologicamente attive e prodotti medicinali finiti e circa due ispezioni/anno/uomo per radiofarmaci.

BPL: Si prevede il proseguimento di queste attività con un impegno non variato rispetto a quanto descritto. Quindi un Dirigente Tecnologo del Dipartimento parteciperà a 11 riunioni di coordinamento/anno. Quattro Ispettori svolgeranno circa 20 ispezioni BPL/anno.

### **Aggiornamento tabelle DPR 309/90 relativamente a nuove sostanze psicoattive**

Il FARM è impegnato (accordo di collaborazione ISS-Dipartimento Politiche Antidroga – DPA) nei controlli e valutazioni su nuove sostanze psicoattive, specie di origine sintetica indicate come *Legal highs*. I controlli sono effettuati su prodotti provenienti da sequestri effettuati dalle forze dell'ordine; le valutazioni tecnico-scientifiche sono effettuate anche ai fini di eventuale tabellazione secondo la recentissima specifica procedura formalmente concordata tra DPA e Ministero della Salute. In base a tale procedura, il FARM ha fornito i seguenti contributi tecnico-scientifici di valutazione per Ordinanze del Ministro della Salute e per aggiornamento delle Tabelle ai sensi del DPR 309/90 e s.m.i.: JWH-018, JWH-073 e Mefedrone (Decreto 16/6/2010, GU n. 146 del 25/7/2010); JWH-250 (Ordinanza 3/12/2010; Decreto 11/5/2011, GU n. 112 del 16/5/2011); JWH-122 (Ordinanza 30/12/2010; Decreto 11/5/2011, GU n. 112 del 16/5/2011); MDPV (Decreto 11/5/2011, GU n. 112 del 16/5/2011); Analoghi strutturali derivanti dal 3-fenilacetilindolo e dal 3-(1-naftoil)indolo (Decreto 11/5/2011, GU n. 112 del 16/5/2011); Fendimetrazina, Fentermina, Mazindolo e Amfepramone (Decreto 2/8/2011, GU n. 180 del 4/8/2011); Butilone o bk-MBDB, analoghi di struttura derivanti dal 2-amino-1-fenil-1-propanone, AM-694 e analoghi di struttura derivanti dal 3-benzoilindolo (Decreto 29/12/2011, GU Serie Generale n. 3 del 4/1/2012).

### **Attività programmata**

Nel 2012-2014 proseguirà tale attività anche in ragione della funzione di responsabile istituzionale del settore bio-tossicologico del Sistema nazionale di allerta della Presidenza del Consiglio dei Ministri-DPA.

### **Aggiornamento tabelle stupefacenti ai sensi del DPR 309/90. Pareri per il Ministero della Salute, quesiti posti da Prefetture, ASL, altre Amministrazioni dello Stato**

Il DPR 309/90, o Testo Unico in materia di stupefacenti e tossicodipendenze, prevede espressamente che il Ministero della Salute, cui spetta il compito di aggiornare le tabelle delle sostanze stupefacenti e psicotrope, ogni volta acquisisca formalmente il parere dell'ISS. La formulazione di tali pareri e delle relazioni tecniche che li accompagnano, rientrano nelle competenze specifiche del FARM. Inoltre, sempre nel campo delle sostanze stupefacenti e psicotrope, è competenza del Dipartimento predisporre relazioni per pareri tecnici specifici. Nel corso dell'ultimo anno sono state evase circa 15 pratiche.

### **Attività programmata**

Si prevede di mantenere invariato il numero di pratiche fino ad ora evaso.

### **Attività come OMCL-EDQM**

La regolamentazione dell'UE relativa alle procedure di registrazione multistato dei farmaci ha aumentato il libero movimento dei farmaci rendendo necessario un approccio coordinato europeo alla farmacovigilanza, problematica prima gestita autonomamente da ciascun Paese. Allo scopo di raggiungere l'armonizzazione e il mutuo riconoscimento dei risultati ottenuti nel controllo della qualità dei medicinali a livello nazionale, nella metà degli anni '90 è stato istituito, sotto l'egida del Consiglio d'Europa, il Network degli OMCL, coordinato dall'EDQM, con lo scopo di creare un pool di risorse che fornisse le necessarie competenze tecniche e offrisse la possibilità di condivisione del lavoro nell'ambito di un comune Sistema di Assicurazione della Qualità. Gli OMCL sono pubbliche istituzioni che supportano le Autorità competenti e il sistema ispettivo nazionale nel controllo della qualità dei prodotti medicinali prima o dopo la loro immissione in commercio. In Italia solo l'ISS è inserito nel network europeo degli OMCL e svolge attività di controllo su farmaci per uso umano e veterinario di origine chimica, biologica e biotecnologica e su emoderivati e vaccini. In questo ambito il FARM si occupa delle attività di controllo e consulenza relative a farmaci di origine chimica sia sintetica che naturale, in linea con quanto previsto dalle attribuzioni di legge e in risposta alle richieste su problematiche di sanità pubblica. L'attività di controllo del Dipartimento viene espletata pertanto nell'ambito di un Sistema di Assicurazione della Qualità (SAQ) applicando procedure specifiche che sono indispensabili ai fini di un mutuo riconoscimento dei risultati derivanti dall'attività degli OMCL appartenenti al Network. La qualità delle prestazioni è garantita attraverso l'applicazione della normativa internazionale ISO/IEC 17025, relativa al mantenimento dei laboratori di prova e taratura. In ambito OMCL il Dipartimento svolge le seguenti attività di controllo: CAP (Prodotti approvati con procedura centralizzata), MRP (Prodotti approvati con procedura di mutuo riconoscimento), DCP (Prodotti approvati con procedura decentrata). Il Dipartimento partecipa agli studi di sorveglianza del mercato europeo (MSS) e ai *Proficiency Testing Study* (PTS), volti all'ottenimento del mutuo riconoscimento degli OMCL.

### **Attività programmata**

È prevista la prosecuzione delle attività di controllo e valutazione in ambito europeo, la cui numerosità è funzione soprattutto della programmazione da parte dell'EDQM, e la partecipazione ai meeting europei. L'OMCL del Dipartimento ha già incrementato l'attività relativa al controllo dei medicinali registrati con procedura centralizzata (CAP) e la partecipazione ai studi interlaboratorio volti all'ottenimento del mutuo riconoscimento (PTS).

Il Dipartimento continuerà a partecipare ai meeting annuali degli OMCL europei e trasmette annualmente all'EDQM un report delle attività.

L'OMCL è attualmente impegnato nella preparazione della visita ispettiva (*Mutual Joint Audit*, MJA) da parte dell'EDQM programmata per la fine del 2012. Nel 2013 e 2014, oltre all'implementazione delle eventuali richieste scaturite in corso di ispezione, continuerà il lavoro di aggiornamento del sistema di assicurazione della qualità.

### **Attività per l'attuazione dell'art. 186 e 187 del Codice della Strada (DL 285)**

Il FARM è impegnato nelle problematiche relative agli accertamenti di sostanze stupefacenti e psicotrope (alcol e droghe) per il Codice della Strada. Ha contribuito con le sue ricerche alla definizione del tasso alcolemico legale (Legge 111, 1988), alla valutazione ufficiale degli etilometri da utilizzare per la rilevazione del tasso alcolemico (Legge 111, 1988) e del protocollo attuativo per l'applicazione dell'art. 187 del C.d.S. (DL 285 del 30/4/1992). Al momento è ufficialmente impegnato nella valutazione delle procedure analitiche più idonee a rendere attuabile l'art. 187. Ha partecipato inoltre ai lavori preparatori per la revisione dei due articoli diventati normativa con il DL 151 del 27/6/2003 e alla predisposizione delle proposte di protocolli attuativi per l'art. 186 e art. 187 del febbraio 2005. L'Istituto ha infine contribuito alla predisposizione delle Tabelle che riproducono la descrizione dei sintomi correlati ai diversi livelli di concentrazione alcolemica nell'aria alveolare espirata, nonché le quantità, espresse in centimetri cubici, delle bevande alcoliche più comuni che determinano il superamento del tasso alcolemico per la guida in stato di ebbrezza (Decreto Ministero del Lavoro, Salute e Politiche Sociali del 30/7/2008, GU n. 210 dell'8/9/2008, "Disposizioni urgenti modificative del codice della strada per incrementare i livelli di sicurezza nella circolazione).

### **Attività programmata**

A seguito delle modifiche apportate al CdS con DL 30/12/2008 n. 207 convertito in L 27/2/2009 n.14, e nuove modifiche attualmente in valutazione, e a seguito dello sviluppo della tecnologia relativa a dispositivi *on site*, è possibile che all'ISS venga richiesta la valutazione di nuovi dispositivi diagnostici per la rilevazione di stupefacenti nei fluidi biologici di conducenti.

Si prevede infine che l'ISS sarà impegnato nella revisione e aggiornamento dei protocolli relativi alle procedure analitiche per l'attuazione dell'art. 187 del CdS.

### **Autorizzazione ai protocolli di sperimentazione animale (DL.vo 116/1992)**

Esame di protocolli di competenza del FARM, per il rilascio della deroga all'utilizzo di animali da laboratorio (primati non umani) a scopi sperimentali e valutazione della congruità del numero di animali da utilizzare e delle procedure con le finalità della ricerca, in accordo con il DL.vo 116/92. Tale attività consiste nella formulazione di pareri necessari alla Direzione Generale competente del Ministero della Salute per il rilascio dell'autorizzazione all'esecuzione della sperimentazione.

### **Attività programmata**

Si prevede, sulla base delle attività già svolte, di evadere circa 140 pareri/annui.

## **Consulenza per il Parlamento**

Esame della documentazione e preparazione di pareri per rispondere alle interrogazioni parlamentari su efficacia e sicurezza d'uso dei farmaci e su fumo, alcol e droga. Il numero medio di pareri/anno è cinque.

### **Attività programmata**

Trattandosi di una richiesta a cui esperti del Dipartimento debbono obbligatoriamente rispondere, non è facile programmare l'attività per il prossimo triennio. Si prevede comunque il mantenimento di quest'attività con un impegno non variato rispetto a quanto descritto.

## **Consulenza per l'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA)**

Il Dipartimento svolge una consistente attività di consulenza tecnico-scientifica altamente qualificata, per l'Agenzia Europea del Farmaco (EMA, Londra). Alcuni esperti del Dipartimento supportano i membri italiani del *Quality Working Party* e del *Pharmacovigilance Working Party*, nelle questioni che riguardano la qualità e la sicurezza post registrazione dei medicinali. In particolare, formulano pareri su argomenti specifici e intervengono durante la stesura delle linee guida. Un esperto del Dipartimento è stato nominato quale membro italiano al *Safety Working Party* (SWP). Inoltre, singoli esperti possono partecipare saltuariamente a riunioni relative ad approfondimenti di argomenti specifici (antitumorali, terapie genetiche, anticorpi monoclonali ecc.), in relazione alla sicurezza ed efficacia dell'uso dei farmaci.

### **Attività programmata**

Mantenimento dell'attività: numero di riunioni per i vari gruppi massimo quattro all'anno, possibili altre riunioni straordinarie non più di tre all'anno, numero di linee guida emanate circa due l'anno.

## **Consulenza per l'AIFA**

Il FARM svolge una continua attività di collaborazione con l'AIFA e garantisce, grazie a requisiti di esperienza, professionalità e capacità tecnologica, il contributo per la valutazione dei dossier relativi alla qualità, sicurezza ed efficacia dei medicinali farmacovigilanza attiva e gestione di Registri nazionali di farmacovigilanza tra i quali il Registro nazionale dell'ADHD. Per quest'ultimo Registro sono stati arruolati circa 2.100 bambini affetti da questa patologia e in trattamento con i farmaci dedicati (metilfenidato e atomoxetina).

Esperti del Dipartimento sono stati nominati membri della Sottocommissione UVA, Farmacovigilanza, Gruppo di Lavoro Radiofarmaci e del gruppo di lavoro IMPACT Italia per la lotta alla contraffazione farmaceutica.

Un Direttore di Reparto, su delega del Presidente dell'ISS, partecipa alle Riunioni della Commissione Tecnico-Scientifica dell'AIFA (CTS) contribuendo alla finalizzazione dei lavori della stessa.

### **Attività programmata**

Si prevede di mantenere e implementare tale attività:

- Riunioni Sottocommissione UVACTS: 11/anno, un Primo Ricercatore
- Riunioni Farmacovigilanza CTS: 11/anno, un Dirigente di Ricerca
- Riunioni CTS: 11/anno, un Dirigente di Ricerca

- Riunione Gruppo radiofarmaci: 11/anno, tre Primi Ricercatori e un Ricercatore; 11/anno, un Dirigente Tecnologo
- Riunione Gruppo IMPACT Italia: una riunione plenaria/anno, un Dirigente di ricerca; due Primi Ricercatori e tre Ricercatori. Sei riunioni/anno segreteria operativa, un Dirigente di Ricerca.

Si prevede di valutare circa 50 dossier di qualità/anno dieci di non clinica/anno e dieci/anno dossier di radiofarmaci.

Per quanto concerne il Registro nazionale ADHD si prevede di mantenere aperto il Registro e di continuare a monitorarne gli aspetti di sicurezza, in particolare sul profilo cardiovascolare, metabolico e psichiatrico.

### **Consulenza per organismi internazionali**

Alcuni ricercatori del Dipartimento sono inseriti da tempo nelle liste di esperti dell'OECD (Parigi), *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM, Ispra), e partecipano alla formulazione di pareri e valutazioni su documentazione inerente le linee guida OECD per la sperimentazione animale e per la validazione di metodi di sperimentazione alternativi ECVAM, all'aggiornamento di linee guida e all formulazione di documenti tecnici di indirizzo per l'esecuzione di prove di tossicità.

Nell'ambito di questa attività tali esperti possono essere chiamati a partecipare a riunioni internazionali, che si possono stimare in due-quattro riunioni l'anno.

Due esperti del Dipartimento partecipano a riunioni della WHO che si tengono a Copenhagen, relative alla valutazione di medicinali per Paesi terzi. Tre settimane/anno/uomo.

Un esperto del Dipartimento partecipa annualmente ad una media di cinque riunioni alla CE di Bruxelles nell'ambito del Sottogruppo "Pemsac" per i metodi analitici in prodotti cosmetici.

#### **Attività programmata**

Tutte le attività suddette proseguiranno per il prossimo triennio e il numero di interventi sarà superiore a quelli già effettuati, visto l'andamento di crescita delle richieste agli esperti del Dipartimento.

### **Consulenza per organismi nazionali**

Numerosi esperti del Dipartimento partecipano a commissioni, gruppi di lavoro tecnici e riunioni (CSS, Ministero della Salute, Ministero dello Sviluppo Economico, Ministero degli Affari Esteri e altri Ministeri, se richiesto). Nell'ambito di tale attività vengono in genere emessi pareri, valutazioni e formulazione/revisione di linee guida.

Numero di interventi anno circa 200.

Quattro esperti del Dipartimento partecipano alla Commissione Farmaci Veterinari del Ministero della Salute, circa sei riunioni/anno

Numero di valutazioni/anno/uomo circa 30 per un totale di circa 120.

#### **Attività programmata**

Si prevede di mantenere ed eventualmente incrementare tale attività.

### **Controlli/pareri sulla qualità dei medicinali**

Il Dipartimento svolge attività di controllo e valutazione sulla qualità dei medicinali, affiancando l'Autorità regolatoria nazionale rappresentata dall'AIFA. Per la loro criticità e in accordo con le linee guida europee, tutte le attività di controllo vengono svolte nell'ambito di un SAQ sulla base del Manuale della Qualità del Dipartimento e di Procedure Operative Standard che permettono una conduzione controllata dei processi analitici e documentali. La

qualità delle prestazioni è garantita dall'applicazione della normativa internazionale ISO/IEC 17025 e dalla esecuzione di audit interni periodici.

Le attività comprendono sia accertamenti di tipo sperimentale (corpi estranei, difetti, inefficacia, procedimenti penali, contraffazione) sia l'emissione di pareri/valutazioni in ambito nazionale ed europeo (AIC, Procedure centralizzate, Procedure di mutuo riconoscimento e Procedure decentrate).

Il Dipartimento svolge attività di farmacovigilanza nazionale attraverso l'esecuzione del Programma annuale di controllo delle composizioni dei medicinali, concertato con l'AIFA (DL 24/4/2006, n. 219). In linea con la politica europea, e a seguito dell'apertura del mercato ai medicinali generici, da alcuni anni il programma annuale di controllo è orientato principalmente alla verifica della qualità dei medicinali generici/equivalenti, anche allo scopo di valutare l'effettiva similarità tra tali prodotti e i corrispondenti farmaci originatori.

Il Dipartimento svolge inoltre attività di controllo e valutazione sui farmaci contraffatti sia a seguito di richieste della Magistratura sia nell'ambito del Gruppo nazionale per la lotta alla contraffazione farmaceutica (IMPACT Italia) di cui è membro.

#### **Attività programmata**

È prevista la prosecuzione delle attività di controllo e valutazione della qualità dei medicinali in funzione delle richieste dell'AIFA, la cui numerosità viene stabilita annualmente nell'ambito della convenzione AIFA/ISS, e delle richieste di altre istituzioni (Ministero della Salute e Magistratura), la cui numerosità non è prevedibile. È previsto un incremento delle attività di controllo e valutazione nell'ambito dell'IMPACT Italia, in particolare in relazione al campionamento e analisi di medicinali sospetti da reti illegali.

### **Controlli/pareri su Presidi Medico-Chirurgici (PMC) disinfettanti**

Dal 1/1/2010 le attività di controllo e valutazione relative ai PMC disinfettanti per uso umano, veterinario e ambientale (prime registrazioni, variazioni e revisioni) sono state trasferite di competenza al CSC.

Il Dipartimento del Farmaco continua ad occuparsi della valutazione dei PMC disinfettanti fino a completo espletamento delle pratiche protocollate al Dipartimento fino al 31/12/2009, verificando la conformità di tale documentazione alla normativa in vigore. Se necessario il Dipartimento richiede parere di competenza al MIPI (documentazione relativa all'attività disinfettante) e al CSC (accettabilità principi attivi sulla base della normativa biocidi e conformità etichettatura alla normativa sui preparati pericolosi). Nel 2011 sono stati espressi circa 80 pareri sui PMC disinfettanti. L'unità che si occupa dei PMC disinfettanti appartiene al Reparto Qualità dei farmaci chimici – Unità anticontraffazione.

#### **Attività programmata**

Il Dipartimento si propone di continuare l'attività di valutazione della documentazione relativa ai PMC disinfettanti attraverso la verifica della conformità della stessa ai requisiti del DPR n. 392, favorendo la transizione dalla normativa nazionale alla Direttiva europea Biocidi (Direttiva 98/8/EC).

### **Controllo e valutazione di prodotti provenienti da sequestri e dalla Magistratura nel settore delle sostanze stupefacenti e psicotrope**

A questo Istituto pervengono richieste di accertamenti su prodotti sequestrati dai NAS e provenienti da Procure. La ricerca della eventuale presenza di sostanze tabellate, su prodotti destinati ad uso farmacologico, alimentare o altro, rientra nelle specifiche competenze del FARM.

Il Dipartimento effettua circa 35-40 pratiche l'anno.

#### **Attività programmata**

Per il prossimo triennio si prevede di mantenere invariato il numero di pratiche fino ad ora evaso.

### **Farmacopea Italiana e Farmacopea Europea**

Nel Dipartimento del FARM ha sede il Segretariato della Farmacopea Ufficiale Italiana, che è anche il punto di riferimento nazionale per il Segretariato della Farmacopea Europea.

La Farmacopea, mediante la definizione di specifiche di qualità dei medicinali, ha come obiettivo fondamentale quello della salvaguardia della salute pubblica.

Il Segretariato della Farmacopea Ufficiale italiana (SFU) è il punto di riferimento per lo svolgimento e l'attuazione di quell'insieme di attività, internazionali e nazionali, connesse con l'elaborazione e pubblicazione della Farmacopea Europea, in seno al Consiglio d'Europa, e della Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana.

Nel contesto internazionale lo SFU è l'unica struttura nazionale ufficialmente in contatto con l'EDQM nel quale ha sede il Segretariato tecnico della Commissione della Farmacopea Europea. L'adesione dell'Italia alla Convenzione per l'elaborazione di una Farmacopea Europea richiede infatti la presenza di un punto di riferimento nazionale in quotidiana interazione con il Segretariato europeo e con i segretariati delle Farmacopee degli altri Stati firmatari della Convenzione stessa.

Al riguardo si sottolineano alcune delle attività più significative: acquisizioni degli elementi e relativa formulazione dei pareri richiesti dall'EDQM, supporto ai delegati nazionali in seno alla Commissione e ai gruppi di lavoro della Farmacopea Europea, richiesta di commenti su testi pubblicati in Pharmeuropa, archivio della documentazione europea.

A livello nazionale lo SFU costituisce la Segreteria della Commissione permanente per la revisione e la pubblicazione della Farmacopea Ufficiale.

Nell'ambito delle Commissioni e Gruppi di esperti nazionali ed europei della Farmacopea sono coinvolti esperti appartenenti al FARM. In particolare, sette esperti per la Commissione permanente e gruppi di lavoro nazionali, quattro esperti per i gruppi di lavoro della Farmacopea Europea.

#### **Attività programmata**

Si intende continuare con il lavoro di revisione della parte nazionale della FU con la revisione delle monografie di principi attivi, che necessitano di tale opera; in particolare si tratta di materie prime non descritte nella Farmacopea Europea prodotte in Italia. Va inoltre continuata l'opera di revisione di monografie di preparazioni farmaceutiche specifiche (in particolare compresse). Queste monografie sono infatti utilizzate nella domanda di Autorizzazione all'immissione in commercio di medicinali fuori brevetto, per quanto attiene alla parte qualità del *Common Technical Document*.

### **Procedure europee (emissione di Assessment)**

Gli esperti del Dipartimento svolgono da anni un'attività di valutazione del dossier di registrazione europea dei farmaci (*Common Technical Document*, CTD). Nell'ambito del programma di collaborazione ISS-AIFA, gli esperti del Dipartimento del Farmaco valutano dossier di registrazione per procedure di mutuo riconoscimento e decentrate, in cui l'Italia agisce sia come Stato membro di riferimento o come Stato membro ricevente, e procedure centralizzate, in cui l'Italia agisce come Stato membro *Rapporteur* o *Co-Rapporteur*.

Tale attività si svolge in particolare mediante analisi della documentazione di qualità, per prodotti derivati da sintesi chimica e analisi della documentazione non clinica e clinica per prodotti sia di derivazione chimica che biologica (es. vaccini) e da tecnologia ricombinante (es. anticorpi monoclonali).

**Attività programmata**

L'attività prosegue e si può quantificare in circa 50/pareri/anno.

### **Sicurezza dei Prodotti cosmetici**

Nel Dipartimento nell'ambito dei prodotti cosmetici viene espletata l'attività di valutazione e controllo per garantire la sicurezza e la qualità dei prodotti cosmetici in commercio sia a livello nazionale che europeo. Sono definite nuove strategie per la verifica della qualità dei cosmetici mediante messa a punto di metodiche analitiche aggiornate per l'individuazione di ingredienti vietati e/o presenti in quantità superiori a quanto previsto dalla legge 713/86. Il Dipartimento ha il fondamentale compito di assicurare la sicurezza dei prodotti cosmetici presenti sul mercato, in base a quanto definito dalla L. 713/86 e dalle disposizioni del nuovo regolamento, 1223/2009, in parte già in vigore. In base a tali regolamentazioni le attività svolte sono: i) analisi di revisione di seconda istanza relative a prodotti cosmetici come da legge n. 713, 11/10/1986; ii) indagini analitiche provenienti da Ministero della Salute, Magistratura, NAS, correlate a fenomeni di contraffazione cosmetica; iii) pareri, su richiesta del Ministero della Salute, relativamente agli elenchi delle sostanze e dei prodotti impiegati nella preparazione dei cosmetici; iv) valutazioni tecniche, su richiesta del Ministero della Salute, per l'adozione di metodi di analisi necessari per controllare la composizione chimica dei prodotti cosmetici e, se del caso, sulle particolari prescrizioni per la loro conservazione. Sempre in tema di sicurezza dei prodotti, il Dipartimento partecipa al sistema di allerta rapido dell'UE (RAPEX) che, come previsto nella Direttiva 2001/95/CE, recepita nel nostro Paese dal DL.vo 6/9/2005, n. 206 è attivo anche per la sicurezza dei prodotti cosmetici.

Il sistema si basa sulla segnalazione del rischio relativo ad un determinato prodotto che viene fatta circolare in tempo reale in tutti i Paesi dell'UE, affinché gli Stati membri, verificata l'eventuale presenza sul proprio territorio del prodotto in questione, possano adottare gli opportuni provvedimenti (richiamo volontario, ritiro, sequestro) in relazione alla gravità del rischio segnalato. Parimenti ogni Stato informa, poi, tutti gli altri Stati dei provvedimenti adottati nel proprio territorio. Le segnalazioni RAPEX riguardano nella maggior parte dei casi prodotti irregolari. Il Dipartimento partecipa con un esperto ai lavori della Commissione PEMSAC (Piattaforma delle autorità preposte alla sorveglianza del mercato dei prodotti cosmetici negli Stati dell'UE) a Bruxelles relativamente a nuove metodiche analitiche da applicare ai prodotti cosmetici. Numero medio di riunioni/anno cinque.

**Attività programmata**

È prevista la prosecuzione delle attività di controllo e valutazione.

### **Vigilanza sui laboratori preposti al controllo sanitario dell'attività sportiva**

L'ISS, come previsto dal DM 13/4/2001, GU n. 105 dell'8/5/2001, è l'organo responsabile della vigilanza sui laboratori che effettuano i controlli anti-doping. Per l'espletamento della suddetta attività, il Dipartimento del FARM organizzerà programmi di valutazione esterna di qualità; procederà a verifiche ispettive sui laboratori; controllerà la fase pre- e post-analitica delle analisi e la validità della catena di custodia.

**Attività programmata**

Questa attività verrà mantenuta per il prossimo triennio 2012-2014.

**Dipartimento**  
**Malattie infettive, parassitarie e immunomediate**

---

**Attività di ricerca**



**Multi-centric study on the natural history of HIV disease among injecting drug users, homosexual men and heterosexuals: the Italian HIV-Seroconversion Study Italian (IHSS)**

Lo studio IHSS “Italian HIV-Seroconversion Study” è uno studio longitudinale di tipo prospettico che ha lo scopo di descrivere la storia naturale dell’HIV. Si tratta in particolare di una coorte incidente e aperta, ovverosia che prevede l’arruolamento annuale di nuove sier conversionsi. A partire dal 1987, questa coorte ha studiato il decorso dell’HIV nei pazienti dall’infezione alla diagnosi di AIDS e/o alla morte. In particolare l’”*Italian HIV-Seroconversion Study*” ha dato un contributo a livello nazionale, studiando i pazienti provenienti da centri clinici distribuiti in tutta Italia e con data di sier conversione nota, stimata come punto centrale tra l’ultimo test HIV-negativo e il primo test HIV-positivo. I dati richiesti prevedono un follow-up sia prima che dopo aver ricevuto le terapie antiretrovirali; ciò ha permesso di fare analisi sull’effetto delle terapie nella pratica clinica specie stimando l’effetto calendario dei diversi regimi terapeutici. Lo studio ha dato un contributo anche a livello europeo: lo studio infatti, fa parte dal 1997 di uno studio europeo denominato CASCADE (*Concerted Action on Seroconversion to AIDS and Death in Europe*), che consiste nella collaborazione di più di 20 coorti, provenienti da tutta Europa. Tramite CASCADE si è aperta recentemente l’ulteriore collaborazione europea con il progetto COHERE (*Collaboration of Observational HIV Epidemiological Research in Europe*).

**Risultati attesi nel triennio**

Il disegno dello studio permetterà di studiare e monitorare le caratteristiche delle nuove infezioni da HIV, effettuando un confronto di tipo temporale dall’inizio dell’epidemia ad oggi. Particolari studi saranno effettuati per stimare l’effetto del declino del numero di CD4 pre-terapia sulla speranza di vita dei pazienti. Un altro obiettivo sarà quello di studiare l’effetto prognostico della terapie combinate (cART), dando particolare attenzione all’eventuale associazione tra risposta iniziale in termini di CD4 e la successiva normalizzazione di tale parametro a parità di soppressione della carica virale. Particolare attenzione verrà data anche ai pazienti che presentano all’arruolamento o durante il follow-up l’acquisizione di altre infezioni come l’epatite C e B o la TB. Su questo sottoinsieme di pazienti verrà valutato l’effetto di popolazione delle nuove terapie cART confrontando i coinfezti con coloro che hanno acquisito solo l’HIV.

**Trasferibilità dei risultati**

I risultati dell’IHSS implicano un’ampia trasferibilità sia alla realtà clinica che a quella di sanità pubblica italiana. A livello nazionale è l’unico studio di coorte italiano che da più di 20 anni arruola e segue i pazienti con nuove sier conversionsi da HIV. Tale studio ha dato in questi anni un contributo alla conoscenza della storia naturale dell’HIV. In particolare dopo l’introduzione delle terapie combinate (cART) nel 1996 il progetto ha permesso di stimare i cambiamenti nel tempo di incubazione verso l’AIDS nonché sulla speranza di vita. Attualmente permetterà anche di monitorare le patologie diverse da quelle che definiscono l’AIDS, con particolare riferimento ai tumori non-HIV e alle malattie cardiovascolari. Il progetto permette, inoltre, di monitorare i cambiamenti di tipo virologico dell’HIV nel corso del tempo. In particolare, nello studio dei sottotipi virali e nell’identificazione di ceppi resistenti ai farmaci antiretrovirali.

## **Valutazione delle disuguaglianze nell'accesso ai programmi di prevenzione per HIV – Me.Di.**

Il *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS* (UNAIDS) raccomanda che le nuove sfide nella lotta contro l'AIDS dovrebbero essere focalizzate alla riduzione del numero dei nuovi infetti acquisendo dati che permettano di studiare l'epidemia da HIV. Sapere come l'epidemia si sta diffondendo in ciascuna nazione significa anche identificare le persone che non hanno accesso ai servizi per l'HIV, che non possono essere testati o che non hanno accesso alla cura o ai servizi assistenziali. La popolazione che non ha accesso al test si compone in maggior parte da individui che frequentano i poliambulatori per altri motivi assistenziali ma che non si sottopongono al test per HIV perché non ritengono di essere a rischio. Intercettare questa popolazione in occasione di una sua domanda per un altro bisogno assistenziale potrebbe risultare utile ai fini di misurare gli indicatori della sua posizione sociale e le sue caratteristiche economiche e comportamentali. L'obiettivo principale del progetto è quello di identificare le popolazioni che non hanno accesso al test per l'HIV e che potrebbero essere infette con HIV non sapendolo. A tal fine uomini e donne con età compresa tra i 18 e i 59 anni e che frequentano sei poliambulatori nell'area metropolitana di Roma saranno invitati a compilare un questionario anonimo in cui verranno richieste delle informazioni riguardanti le loro caratteristiche socio-economiche e comportamentali.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati ottenuti permetteranno di:

- studiare le caratteristiche socio-economiche e comportamentali degli individui che si sottopongono al test e confrontarli con quelle degli individui che non si sottopongono al test;
- identificare un set di fattori di rischio di sieropositività (sulla base delle caratteristiche socio-economiche e comportamentali) tra i soggetti testati per HIV;
- fornire un prima stima della prevalenza dell'HIV tra i soggetti che non si sottopongono al test per HIV.

I risultati ottenuti saranno oggetto di pubblicazioni internazionali e nazionali, che vedranno come coautori tutti i partecipanti al progetto riportati in questo protocollo.

L'applicazione di misure di disuguaglianza di accesso ai programmi di prevenzione e cura HIV e legate alle caratteristiche sociali e comportamentali indagate (livello di istruzione, occupazione, sesso, gruppo etnico, età e orientamento sessuale), saranno utilizzate in questo studio per:

- identificare quali strategie di intervento potrebbero migliorare il tasso di partecipazione allo screening HIV di alcune fasce di popolazione;
- promuovere politiche sanitarie anche in altri settori delle malattie infettive che riducano le disuguaglianze in termini di salute;
- facilitare l'allocazione delle risorse;
- migliorare la qualità dell'assistenza sanitaria nell'area HIV in modo tale da ridurre le disparità negli individui a rischio.

### **Trasferibilità dei risultati**

Misurare le disuguaglianze nell'accesso ai servizi potrebbe essere utile per l'identificazione delle caratteristiche degli individui che non hanno accesso ai servizi sanitari e non si sottopongono al test per l'HIV. Questo potrebbe contribuire alla stima delle persone a rischio che non si sottopongono al test e comprendere le loro caratteristiche socio-economiche e comportamentali. Queste informazioni potrebbero essere utilizzate per identificare, quali di queste caratteristiche potrebbero essere un fattore di rischio per

l'infezione da HIV. Gruppi e categorie di persone che sono vittime di disuguaglianze sanitarie potrebbero essere individuate e incluse in futuri programmi di prevenzione, costituendo un ovvio aumento dell'efficacia nell'uso delle risorse. I risultati dello studio permetteranno di identificare strategie di intervento per migliorare l'accessibilità al test per l'HIV e l'equità dei servizi di *counselling* e di trattamento.

### **A hydrogel nanoparticle based platform for the diagnosis of infectious disease activity through specific biomarkers detection**

Gli attuali metodi per la diagnostica delle malattie infettive sono basati sull'identificazione dell'agente eziologico, sulla risposta immunitaria dell'ospite, o sull'amplificazione di materiale genetico del patogeno stesso. Ognuno di questi metodi ha dei limiti che sono particolarmente evidenti per patologie quali la TB.

#### **Risultati attesi nel triennio**

In questi casi potrebbe essere utile un test basato sulla determinazione della presenza nei liquidi biologici di *biomarker* rilasciati dal patogeno. Tali metodi sono già stati valutati per la diagnosi di alcune malattie infettive, come l'epatite B (ricerca dell'antigene S) mentre per altri il problema è costituito dalla bassa concentrazione dei biomarkers nei liquidi biologici. Per tale motivo si propone di utilizzare delle nanoparticelle formate da un nucleo in idrogel con delle esche chimiche capaci di concentrare *biomarker* dai liquidi biologici in base alla natura del *biomarker* stesso. Una volta concentrati i *biomarker* potrebbero essere svelati con metodiche immunochimiche o con spettrometria di massa.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Risultati preliminari suggeriscono la fattibilità del progetto i cui risultati potrebbero essere facilmente trasferiti all'SSN.

### **Adjuvanti e immunomodulatori per lo sviluppo di vaccini mucosali e sistemici in patologie infettive e immunomediate**

La maggior parte di patogeni invadono o causano malattia a livello delle mucose, quindi, lo sviluppo di vaccini mucosali è fortemente auspicato. Tuttavia, attualmente sono disponibili solo pochi vaccini mucosali per uso umano e nessuno di essi è costituito da proteine ricombinanti o subunità purificate e questo per la mancanza di adjuvanti mucosali potenti e sicuri. Quindi nuovi approcci per indurre risposte immunitarie a livello delle mucose sono fortemente necessari. Dato il ruolo cruciale dei metaboliti della vitamina A di indurre l'*homing* delle cellule del sistema immunitario a livello delle mucose, così come data la loro capacità di promuovere il differenziamento di plasmacellule che producono IgA, tali molecole costituiscono dei buoni candidati per migliorare le vaccinazioni mucosali. È noto che in assenza di vitamina A, le risposte immunitarie verso le infezioni e le vaccinazioni sono compromesse, e cosa più importante recentemente è stato riportato che la somministrazione di acido retinoico ripristina le risposte sia alle infezioni che alle vaccinazioni. In questo studio, saranno analizzate nuove strategie di immunizzazione con lo scopo di amplificare le risposte immunitarie sistemiche e mucosali in presenza e in assenza di metaboliti della vitamina A. Le risposte immunitarie mucosali e sistemiche verso antigeni vaccinali verranno caratterizzate in termini di qualità, persistenza e induzione di memoria immunologica.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Scopo del progetto è quello di indurre risposte immunitarie sia a livello mucosale che sistemico mediante l'utilizzo di metaboliti della vitamina A. La somministrazione di tali

sostanze in combinazione con immunizzazioni sistemiche determinerà l'espansione, l'attivazione e promuoverà l'*homing* delle cellule del sistema immunitario nei distretti mucosali, inducendo, a nostro avviso, una buona immunizzazione in grado di conferire protezione verso le infezioni. Questo approccio può contribuire a far progredire lo stato dell'arte della ricerca sugli adiuvanti attraverso l'induzione di risposte immunitarie mucosali e migliorare l'efficacia dei vaccini.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La validazione dell'uso di metaboliti della vitamina A come adiuvanti vaccinali nel promuovere sia risposte sistemiche che mucosali può portare ad un miglioramento dei vaccini contro le infezioni. Il progetto potrà fornire nuove conoscenze relative ai meccanismi di azione di tali composti e a quelli di regolazione della risposta immune in corso di infezioni. La conoscenza di tali meccanismi sarebbe di sicura utilità per la ricerca applicata dell'intera comunità scientifica, non solo per lo sviluppo delle sostanze testate, ma anche perché permetterà di individuare, sulla base dei meccanismi identificati, nuove sostanze con funzione adiuvante/immunomodulatoria. Tale studio favorirà lo sviluppo di opportune strategie vaccinali atte a ripristinare una adeguata risposta immune in patologie di estrema importanza per la salute pubblica.

### **Ampliamento e consolidamento della rete italiana dei servizi di *counselling* telefonico per la messa a punto di interventi di prevenzione dell'infezione da HIV**

In Italia, l'incidenza delle nuove diagnosi di infezioni da HIV si è stabilizzata. Nel 2008 sono state rilevate 3.900-4.100 nuove diagnosi (principale modalità di trasmissione sessuale). Tale situazione richiede la programmazione di interventi di prevenzione. Strumento elettivo è l'intervento di *counselling* telefonico. Nel nostro Paese, nel 1987, è stato istituito il Telefono Verde AIDS. Sono stati attivati anche altri Servizi telefonici, 22 dei quali hanno partecipato, nel 2008, al progetto Creazione e Coordinamento di una Rete tra Servizi Telefonici italiani governativi e non, impegnati nella prevenzione dell'infezione da HIV e dell'AIDS promosso dal Ministero della Salute. Il Progetto ha focalizzato l'attenzione sull'intervento di *counselling* telefonico, sono stati condivisi contenuti scientifici, aspetti comunicativo-relazioni e strumenti di raccolta dati.

Tali risultati rappresentano la base del presente Progetto finanziato dal Ministero della Salute.

Obiettivi sono:

- promuovere strategie di prevenzione dell'infezione da HIV attraverso il contributo della Rete dei Servizi di *Counselling* Telefonici (Re.Te.AIDS);
- consolidare la Re.Te.AIDS;
- analizzare le caratteristiche anagrafiche-socio-comportamentali delle persone che accedono ai Servizi di *Counselling* Telefonici al fine di individuare correlazioni tra percezione del rischio, comportamenti, uso del preservativo e accesso al test HIV;
- individuare indicatori per la predisposizione di interventi di prevenzione dell'infezione da HIV.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Sono previsti i seguenti risultati:

- individuazione di indicatori socio-anagrafici utili per la messa a punto di interventi di prevenzione dell'infezione da HIV. Tali indicatori potranno essere identificati attraverso una rilevazione sistematica delle caratteristiche anagrafiche di coloro i quali

prediligano il mezzo telefonico per soddisfare i propri bisogni informativi sull'infezione da HIV e sull'AIDS;

- conduzione di un'*Anonymous Cross-sectional telephone survey* nazionale per consentire di rilevare gli aspetti socio-comportamentali, le cause che sottendono il non uso di metodi di barriera, nonché le motivazioni favorenti o ostacolanti l'accesso al test HIV delle persone/utenti che si rivolgono ai Servizi telefonici.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati conseguiti e le conoscenze acquisite potranno fornire indicatori utili per la predisposizione di interventi preventivi dell'infezione da HIV. Inoltre, l'ISS potrà diffondere, attraverso la Re.Te. AIDS, la metodologia del *Counselling* telefonico messa a punto in oltre 24 anni di attività e rivelatasi estremamente efficace per poter erogare alla persona/utente un'informazione scientificamente corretta, aggiornata e personalizzata.

### **Ampliamento e gestione del sistema di assicurazione della qualità del Reparto di Malattie parassitarie gastroenteriche e tissutali nell'ambito delle attività condotte in qualità di Laboratorio Europeo di Riferimento per i Parassiti (EURLP)**

Il Reparto di Malattie parassitarie gastroenteriche e tissutali ha ottenuto l'accreditamento nel luglio 2006, rinnovato nel luglio 2011, in conformità alla norma internazionale ISO/IEC 17025:2005 dal SINAL, ora ACCREDIA, ente italiano di accreditamento dei laboratori di prova. Al fine di mantenere l'accreditamento, confermato fino ad oggi a seguito di visite ispettive di sorveglianza condotte da ACCREDIA con cadenza annuale, il Reparto deve garantire che il SAQ sia gestito, mantenuto e migliorato secondo quanto previsto dalla norma succitata. Il Reparto, inoltre, designato nel 2006 quale Laboratorio Europeo di Riferimento per i Parassiti (*European Reference Laboratory for Parasites*, EURLP), ha l'incarico di condurre attività specifiche e di fornire una serie di servizi ai Laboratori Nazionali di Riferimento (LNR) per i parassiti degli stati membri, alla CE e ai Paesi in via di sviluppo. Fra le attività condotte annualmente, l'organizzazione di circuiti interlaboratorio, volti a verificare la competenza dei laboratori nazionali ed europei ad applicare specifici metodi diagnostici, ricopre particolare importanza. Pertanto si provvederà a sviluppare ulteriormente il SAQ del Reparto, integrandone i documenti per conformarlo anche alla norma internazionale ISO/IEC 17043:2010: *Conformity assessment – General requirements for proficiency testing*, al fine di ottenere da ACCREDIA l'accreditamento in qualità di fornitore di circuiti interlaboratorio.

#### **Risultati attesi nel triennio**

La convenzione stipulata tra ACCREDIA e il Reparto di Malattie parassitarie gastroenteriche e tissutali, è stata rinnovata nel 2011 per un periodo di quattro anni, durante i quali il Reparto garantirà la gestione, il mantenimento e il miglioramento del SAQ, secondo quanto previsto dalla norma internazionale ISO/IEC 17025:2005. Inoltre, l'accreditamento del Reparto in qualità di fornitore di schemi di prove interlaboratorio in conformità alla norma ISO/IEC 17043:2010, consentirà di fornire ai laboratori nazionali e internazionali un servizio in un ambito per il quale non sono disponibili circuiti commerciali, garantendo agli utenti un livello qualitativo di eccellenza.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tutte le attività condotte nell'ambito delle funzioni generali e i compiti assegnati all'EURLP (ricerca sui parassiti trasmessi con gli alimenti e infezioni animali correlate, *proficiency test*, studi collaborativi, sviluppo, validazione e standardizzazione di metodi analitici, produzione e raccolta di materiale di riferimento, ecc.) verranno messe a

disposizione della comunità scientifica internazionale e delle istituzioni di controllo degli Stati membri della UE.

### **Analisi Filogeografica Avanzata e studio dell'evoluzione Molecolare dei Sottotipi di HIV in immigrati in Italia (progetto FAMOSOH)**

Gli immigrati extracomunitari in Italia, che rappresentano circa l'8% della popolazione totale, costituiscono un gruppo di popolazione maggiormente a rischio per l'infezione da HIV. Si registra un progressivo aumento della proporzione di casi notificati in cittadini stranieri, dal 4,7% nel 1995 al 24% nel 2010. L'applicazione dei metodi di analisi filogenetica allo studio dell'infezione da HIV è importante per ottenere informazioni clinico ed epidemiologico della malattia. In Italia, sono stati effettuati pochi e sporadici studi sull'evoluzione filogenetica dell'infezione da HIV, comprendenti soprattutto campioni numericamente ridotti di soggetti autoctoni, mentre gli immigrati non sono stati inclusi. In questa ottica e per una migliore gestione clinica dei pazienti immigrati affetti da HIV, appare importante conoscere la presenza e la distribuzione, in questa popolazione, di varianti di HIV-1 distinte dal sottotipo B, per le implicazioni che possono avere dal punto di vista patogenetico e diagnostico-terapeutico. L'analisi filogenetica nei pazienti immigrati, potranno definire le dinamiche epidemiologiche dell'infezione (origine ed evoluzione dei sottotipi di HIV in Italia) e risalire al luogo di infezione tramite l'analisi dei flussi genetici di HIV-1 tra differenti aree geografiche e/o differenti gruppi a rischio. L'analisi filogenetica permetterà inoltre di individuare possibili network di trasmissione nell'ambito dello studio delle resistenze ai farmaci antiretrovirali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

L'analisi dei network di trasmissione sarà importante per una parametrizzazione dei modelli epidemiologici e per implementare interventi mirati; l'analisi filogeografica sarà essenziale nel determinare i flussi virali in entrata e in uscita dalla popolazione migrante e per disegnare strategie di intervento ad hoc; la valutazione dei sottotipi e delle forme ricombinanti di HIV-1 tra gli immigrati sieropositivi può rappresentare una base per lo studio dell'impatto di questi sulla storia naturale della malattia e sulla risposta alla terapia antiretrovirale.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati di questo studio ci permetteranno di ottenere importanti informazioni per la gestione clinica e a livello di salute pubblica dell'infezione da HIV in Italia e avranno un impatto immediato a livello non solo di prevenzione ma anche di approccio terapeutico.

### **Applicazione del modello operativo per favorire interventi di prevenzione dell'infezione da HIV e della tubercolosi in fasce di popolazioni migranti**

Nell'ambito dello studio Promozione e tutela della salute della persona straniera attraverso l'individuazione e la sperimentazione di una metodologia di intervento nell'ambito delle malattie infettive, i ricercatori dell'Unità Operativa RCF del Dipartimento MIPI dell'ISS hanno messo a punto un Modello Operativo (MO) in collaborazione con alcuni componenti del *National Focal Point Italiano* (NFP), relativo alla comunicazione della diagnosi e alla presa in carico dei migranti con patologia infettiva. È stato realizzato un percorso di formazione (tre edizioni) rivolto a operatori socio-sanitari.

Il MO costituisce un protocollo di riferimento per una relazione professionale efficace con il migrante.

Alla luce dei risultati conseguiti è emersa la necessità di proseguire l'azione di prevenzione dell'HIV e della TB, nonché di identificare strategie di intervento per diagnosi tempestive e cure appropriate. Il Progetto rappresenta l'applicazione sul campo del MO e vede la partecipazione di alcune strutture sanitarie di Roma e Latina.

Gli obiettivi sono:

- applicazione del MO per interventi di prevenzione dell'infezione da HIV e della TB nei migranti, per la diagnosi e la presa in carico di coloro che accedano ai servizi sanitari di Roma e di Latina;
- realizzazione di un'indagine per identificare le caratteristiche socio-demografiche-comportamentali dei migranti;
- attivazione di percorsi di formazione rivolti agli operatori socio-sanitari dei servizi sanitari di Roma e Latina.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati conseguiti forniranno utili elementi per l'assessment di un piano di valutazione di processo e di esito relativamente alla comunicazione della diagnosi e alla presa in carico della persona migrante con patologia infettiva.

Il presente Progetto si struttura, inoltre, come azione pilota in quanto l'applicazione operativa del Modello consentirà di sperimentare sul campo l'efficacia di un protocollo all'interno del quale organizzare interventi di prevenzione, comunicare la diagnosi, prescrivere accertamenti, proporre interventi di cura e assistenza.

I criteri e gli indicatori per la verifica dei risultati raggiunti sono i seguenti:

- definizione di un set di aspetti socio-demografici favorevoli alla vulnerabilità di gruppi di popolazione (migranti) relativamente a patologie evitabili quali HIV e TB;
- formazione/aggiornamento di almeno il 90% degli operatori socio-sanitari presenti nelle quattro strutture sanitarie di Roma e Latina coinvolte nel Progetto;
- partecipazione ai percorsi formativi di tutte le figure professionali presenti nelle équipe individuate;
- attuazione per almeno sei mesi delle linee operative del MO alle persone-utenti che accedono alle quattro strutture coinvolte nel Progetto;
- applicazione del percorso diagnostico-terapeutico, individuato nel MO, ad almeno l'80% delle persone-utenti immigrate che accedano ai servizi di prevenzione, diagnosi e cura dell'HIV e della TB partecipanti alla ricerca.

### **Trasferibilità dei risultati**

Al termine del Progetto l'ISS potrà disporre di un MO per sviluppare interventi di prevenzione, mirati alla comunicazione della diagnosi e alla presa in carico della persona immigrata con patologia infettiva, nonché fornire agli organi di Governo della sanità pubblica indicatori per la definizione di percorsi preventivi e diagnostico-terapeutici (PDT) applicabili in altre aree della medicina, come indicato nel Piano Sanitario Nazionale 2011-2013.

### **Aspetti immunologici legati a situazione di benessere o stress. UO del progetto: Benessere umano: uno studio sulla relazione tra stato psicologico e biologico ottimale condotto su gemelli**

Il benessere psicologico è recentemente divenuto un obiettivo di importanza primaria nella ricerca biomedica e di epidemiologia genetica. Studi condotti su gemelli hanno rilevato una sostanziale componente ereditaria per alcuni tratti di personalità come l'autostima, la soddisfazione e l'ottimismo, tre aspetti fondamentali del benessere. D'altra parte, pochi studi hanno esplorato i correlati biologici del benessere. Per esempio, per gli aspetti immunologici,

è stato dimostrato che uno stile di vita positivo è associato con livelli minori di cortisolo e citochine pro-infiammatorie e risposte anticorpali più efficaci alla vaccinazione per influenza. Al contrario, lo stress altera l'omeostasi immunitaria Th1/Th2 verso la componente Th2, aumentando la suscettibilità ad infezioni e la propensione a sviluppare malattie da ipersensibilità.

Nell'ambito del progetto generale basato su un ampio studio epidemiologico su una coorte di gemelli italiani, questa UO si occuperà dello studio di parametri immunologici che verranno trasmessi alle altre UO per la valutazione delle eventuali associazioni con lo stato e la dimensione di benessere. In particolare, verranno considerate risposte immunitarie sia innate (livelli di citochine e chemochine pro- e anti-infiammatorie) che acquisite (risposta anticorpale a vaccinazioni). L'omeostasi immunitaria verrà valutata studiando la frequenza delle sottopopolazioni linfocitarie e del loro bilancio (linfociti NK, Th1/Th2, T regolatori).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto esplorerà simultaneamente le basi genetiche e ambientali delle dimensioni del benessere, di parametri biologici rilevanti per la funzione fisica, e del legame tra benessere e parametri biologici. Questi risultati verranno conseguiti grazie ad un pannello completo di valutazioni biologiche che include gli aspetti immunologici, e consentiranno di indagare su nuovi meccanismi potenzialmente rilevanti per la salute umana e per l'invecchiamento. Inoltre, i risultati contribuiranno ad identificare fattori che possono costituire obiettivi di intervento per la promozione del benessere sia fisico che psicologico.

Come ulteriore risultato, grazie alla raccolta di campioni necessari alle analisi biologiche e immunologiche, sarà disponibile una banca biologica da una coorte di gemelli ben caratterizzata, che può costituire una preziosa risorsa per ulteriori e futuri studi mirati ad investigare le relazioni tra benessere e parametri biologici.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Esplorando l'associazione tra stato psicologico e biologico da una prospettiva di epidemiologia genetica, il progetto fornirà informazioni quantitative sul contributo di fattori ambientali e genetici a tale associazione, che a loro volta consentiranno di valutare la fattibilità di interventi ambientali per promuovere il benessere e la salute, e daranno le basi per la ricerca di varianti genetiche di rilevanza per i tratti correlati al benessere.

La conoscenza dei meccanismi psicobiologici è fondamentale per la progettazione di strategie di salute pubblica mirate alla promozione della salute sia fisica che mentale, individuando eventualmente sottogruppi di popolazione in cui esse siano più fattibili ed efficaci. Questi interventi contribuiranno alla riduzione degli stati di sofferenza in entrambe le aree.

#### **Attribuzione delle fonti d'infezioni umane causate da *Salmonella Typhimurium* e dalla sua variante monofasica S. 4,[5],12:i:- lungo la catena alimentare**

L'efficace controllo delle infezioni trasmesse da alimenti richiede la conoscenza delle principali fonti e vie di trasmissione dei patogeni all'uomo. Tra i diversi approcci impiegati al fine di caratterizzare le fonti di infezioni alimentari nell'uomo, quello microbiologico mira all'isolamento, identificazione e caratterizzazione del microrganismo responsabile dell'infezione. L'analisi dei dati relativi alla presenza del patogeno nelle potenziali fonti d'infezione e la comparazione dei sottotipi dell'agente isolati dall'uomo con quelli isolati nei serbatoi animali e nei veicoli alimentari rappresentano un valido strumento per individuare le fonti d'infezione più probabili.

Nell'ambito del presente progetto l'approccio microbiologico, basato sulla subtipizzazione microbica, sarà impiegato per approfondire l'epidemiologia di due sierotipi

che, in Italia, sono responsabili della grande maggioranza delle infezioni da *Salmonella* nell'uomo, ovvero *Salmonella Typhimurium* (STM) e S. 4,[5],12:i:-. L'utilizzo di diverse metodologie di subtipizzazione molecolare consentirà di raccogliere informazioni sui ceppi appartenenti a questi due sierotipi isolati a diversi livelli della catena alimentare e tali dati verranno elaborati per formulare ipotesi relative alle potenziali vie di infezione per l'uomo.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- sviluppo di metodi di indagine di laboratorio mirati all'identificazione della variante monofasica di STM. Attualmente non è disponibile un protocollo condiviso e quindi questo potrebbe essere alla base della sottotifica degli isolati appartenenti a tale sierotipo emergente;
- valutazione delle potenzialità dei differenti approcci di subtipizzazione fenotipica e molecolare per la caratterizzazione di questi due sierotipi, che in Italia rivestono un ruolo centrale nelle infezioni da *Salmonella*. In questo modo sarà possibile acquisire i metodi più discriminanti e utilizzarli per supportare e integrare le indagini epidemiologiche sugli episodi di tossinfezione alimentare.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti saranno trasferiti a tutti i laboratori diagnostici sia in ambito umano che veterinario che in questo modo acquisiranno strumenti per l'identificazione e la successiva caratterizzazione degli isolati appartenenti a tali sierotipi, come ad altri sierotipi di *Salmonella*.

Inoltre i risultati saranno portati a conoscenza dell'SSN e alla comunità scientifica nazionale utilizzando veicoli ad ampia diffusione quali congressi nazionali e pubblicazioni affinché le conoscenze acquisite siano largamente fruibili.

#### **Autofagia nel controllo dell'infezione da *Mycobacterium tuberculosis*: identificazione di nuovi target sensibili alla rapamicina (induttore del processo autofagico) per potenziare l'immunogenicità di nuovi ceppi vaccinali**

Recentemente è stato descritto che l'autofagia svolge un ruolo importante nel contenimento dell'infezione da *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) consentendo la degradazione degli autofagosomi contenenti il patogeno attraverso la fusione con i lisosomi. Tale degradazione, oltre a contenere l'infezione da Mtb, è importante per la generazione di peptidi, la cui presentazione nel contesto MHC è cruciale per l'induzione della risposta protettiva mediata dai linfociti T. In considerazione di queste evidenze, il nostro studio ha come obiettivo principale la caratterizzazione del processo autofagico in DC umane infettate con Mtb e dal ceppo vaccinale BCG (Bacillo di Calmette e Guérin). Tale analisi comparativa ha evidenziato che mentre Mtb blocca il processo autofagico, il BCG non altera questo processo. Un'analisi condotta con ceppi di Mtb ricombinanti (in collaborazione con l'Istituto Pasteur, Parigi) per il sistema ESX-1 (deleto in BCG) ha mostrato che l'eterodimero ESAT6/CFP10 risulta essere il principale artefice di tale blocco. Inoltre in collaborazione con l'Istituto Spallanzani di Roma abbiamo osservato che specifici induttori dell'autofagia, come la rapamicina, sono in grado di rimuovere il blocco indotto da Mtb promuovendo un aumento della risposta Th1.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Sulla base di questi risultati il progetto di ricerca si propone di:

- definire i meccanismi attraverso cui il complesso ESAT6/CFP10 blocca l'autofagia nelle DC;

- analizzare se l'utilizzo di induttori dell'autofagia possano agire come adiuvanti potenziando l'immunogenicità di nuovi ceppi vaccinali ingegnerizzati con il complesso antigenico ESAT6/CFP10;
- caratterizzare il ruolo del processo autofagico nel controllo dell'infezione da Mtb. A tale scopo verrà analizzata l'impatto del processo autofagico sulla maturazione e attivazione delle DC al fine di comprendere gli effetti sull'espressione di marcatori specifici, sulla produzione di citochine e chemochine e sulla capacità di espandere linfociti T produttori IFN- $\gamma$ .

Verranno inoltre testati differenti composti con caratteristiche analoghe alla rapamicina ma con minori effetti collaterali, al fine di identificare nuove molecole capaci di potenziare l'immunogenicità di nuovi ceppi vaccinali diretti contro Mtb.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il vaccino attualmente usato, il ceppo attenuato di *Mycobacterium bovis* BCG, è efficiente contro le forme di TB sistemica nei bambini, ma non protegge gli adulti dalla TB polmonare la forma più diffusa e trasmissibile della malattia. Per questo motivo lo sviluppo di un nuovo vaccino contro la TB è alla base della strategia globale per sconfiggere questa malattia.

L'obiettivo di questo progetto è quello di utilizzare le nuove conoscenze scientifiche di immunologia, biologia molecolare e genomica per ingegnerizzare nuovi vaccini o per aumentare l'efficienza del vaccino esistente e disegnare un vaccino di seconda generazione che sia più sicuro ed efficace di BCG. A tale scopo, il nostro progetto potrà anche fornire un modello sperimentale utilizzabile per la valutazione di farmaci o terapia capaci di modulare il processo autofagico nelle DC.

#### **Batteri probiotici per prevenire la sensibilizzazione allergica nella fase pre- e peri-natale: uno studio preclinico su un modello murino**

Nella popolazione infantile le patologie allergiche sono in costante aumento. Lo sviluppo di nuove e appropriate strategie preventive per le malattie allergiche sono necessarie. Misure di prevenzione volte ad indurre uno stato di tolleranza immunologica, dovrebbero essere intraprese fin dall'infanzia e forse anche prima della nascita.

L'utilizzo di miscele di batteri probiotici sembra avere un potenziale sia terapeutico che profilattico nei confronti delle malattie allergiche grazie alla capacità di questi batteri di modulare le risposte immunitarie a livello delle mucose.

A tale proposito si cercherà di indurre uno stato di refrattarietà alla sensibilizzazione allergica attraverso la messa a punto di un protocollo sperimentale nel quale topi femmine gravide e topi neonati, ottenuti e selezionati attraverso una procedura di randomizzazione, vengono sottoposti ad un trattamento orale con miscele di otto batteri probiotici, prima di essere sottoposti ad un trattamento di sensibilizzazione allergica.

Si esaminerà la capacità immunomodulatoria del trattamento sulla risposta allergica indotta nella prima generazione della progenie e se una possibile tolleranza indotta durante la gravidanza influenzi il sistema immune della progenie proteggendola da una successiva sensibilizzazione allergica.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- L'evidenza della presenza nella fase pre- e peri-natale di un periodo "finestra" durante il quale è possibile modulare la risposta immunologica e quindi la possibilità di intraprendere una prevenzione primaria prima della nascita.
- Studio della attività immunomodulatoria esercitata da miscele di batteri probiotici su diverse componenti del sistema immunitario immaturo.

Il ruolo dell'allattamento al seno nel prevenire l'allergia rappresenta una questione importante e controversa. Alcuni studi dimostrano un ruolo protettivo e altri riportano un aumento delle malattie allergiche e asma nei bambini allattati al seno. Trarremo vantaggio dal nostro modello murino per valutare se l'allattamento al seno da madri trattate con probiotici gioca un ruolo cruciale nel trasferimento della tolleranza alla progenie e per identificare le eventuali componenti responsabili.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il modello murino su femmine gravide, appositamente sviluppato, offrirà la possibilità di ottenere conoscenze di tipo applicativo ai fini di una valutazione dell'efficacia e della sicurezza preclinica di un trattamento profilattico. Sulla base dei risultati preclinici ottenuti al termine del presente progetto sarà valutata la possibilità di trasferire le evidenze scientifiche ottenute, in un disegno di trattamento profilattico in trials clinici, tenendo in considerazione la possibilità che l'assunzione di miscele di probiotici durante la gravidanza può rappresentare un'efficace e sicura strategia di prevenzione delle malattie allergiche, soprattutto nel caso di madri con una predisposizione verso le malattie allergiche.

### **Biomarcatori dello stress ossidativo associati alla progressione della malattia aterosclerotica: differenze di genere**

L'aterosclerosi è una malattia infiammatoria cronica delle arterie. L'infiltrato infiammatorio presente nella lesione aterosclerotica contiene cellule del sistema immunitario responsabili dell'infiammazione. Tra i fattori coinvolti nell'attivazione di tali cellule vi è il CD40L, una molecola co-stimolatoria i cui livelli di espressione sono stati associati all'aterosclerosi. Tale molecola è anche coinvolta nei processi molecolari legati allo stress ossidativo, anch'esso coinvolto nello sviluppo dell'aterosclerosi.

Un altro fattore determinante nella progressione dell'aterosclerosi è il genere. In Europa il numero di decessi causati dalle malattie cardiovascolari è maggiore tra le donne rispetto agli uomini. Tuttavia gli studi svolti per individuare strategie diagnostiche e terapeutiche più efficaci sono generalmente condotti in popolazioni che non tengono conto di tali differenze. La disponibilità di biomarcatori per l'aterosclerosi che tengano conto delle differenze di genere sarebbe utile per migliorare la gestione clinica dei pazienti affetti da tale patologia. Scopo del presente progetto sarà quello di identificare biomarcatori immunologici e di stress ossidativo associati al rischio cardiovascolare in pazienti con patologia aterosclerotica, valutati in relazione alle differenze di genere, e di chiarire se le reazioni ossidative sono almeno in parte responsabili di tali differenze.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il primo risultato atteso è l'identificazione di marcatori immunologici e di stress ossidativo associati ad aumentato rischio cardiovascolare in relazione alle differenze di genere nell'aterosclerosi carotidea. Un altro risultato atteso è l'acquisizione di nuove informazioni relative ai meccanismi coinvolti nelle differenze di genere che caratterizzano la patologia aterosclerotica. Le nuove conoscenze acquisite potrebbero essere utili per lo sviluppo di nuovi strumenti che permetterebbero di migliorare le strategie preventive e terapeutiche applicate alla gestione dei pazienti con aterosclerosi.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le conoscenze acquisite porterebbero allo sviluppo di nuovi strumenti di intervento da utilizzare in concomitanza con quelli già disponibili per migliorare l'identificazione dei pazienti, in particolare le donne, a rischio di eventi cardiovascolari. Tali informazioni permetterebbero la validazione di biomarcatori circolanti da inserire nei protocolli di valutazione clinica dei pazienti per la determinazione del rischio, tenendo conto delle differenze di genere. Ciò

permetterebbe di migliorare la gestione clinica di tali pazienti, con conseguente riduzione dell'incidenza degli eventi clinici e miglioramento della qualità della vita.

### **VII FP. Capacities specific programme INFRAVEC research infrastructures research capacity for the implementation of genetic control of mosquitoes**

INFRAVEC è un progetto che si propone sostanzialmente di studiare nei particolari nuove tecniche di controllo dei Culicidi vettori di agenti patogeni per l'uomo. I 32 partner afferenti al progetto provengono da buona parte dei Paesi europei dove rappresentano gruppi che conducono ricerche di punta. La condivisione di tecniche e di esperienze dovrebbero portare alla conoscenza di tutte le abitudini e potenzialità necessarie a implementare nuovi metodi di controllo, in vista di possibili epidemie virali trasmesse da zanzare. In particolare, gli studi saranno accentrati su due vettori tra i più importanti: *Anopheles gambiae*, potente vettore di malaria nell'Africa sub-sahariana e di *Aedes albopictus*, vettore di Chikungunya e Dengue virus.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Saranno realizzate due strutture *ex novo*, una in Italia per l'allevamento massivo di larve di *Aedes albopictus* per la produzione di maschi sterili.

L'altra a Londra per continuare gli studi su femmine di Anophele geneticamente modificate.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La pubblicazione di metodiche standardizzate, affidabili e riproducibili, sotto forma di protocolli operativi e linee guida

### **Capacity building in combining targeted prevention with meaningful HIV surveillance among men who have sex with men (MSM) (Sialon II)**

Progetto europeo con la partecipazione di 15 Nazioni europee. Raccogliere informazioni sulla prevalenza di HIV, Sifilide, HBV, HCV e sui comportamenti a rischio tra MSM mediante l'utilizzo di metodi non invasivi (test HIV su fluido orale) e di un questionario comportamentale. Lo studio verrà condotto su un campione di MSM in varie città italiane, selezionati attraverso i metodi del *Respondent Driven Sample* (RDS) e del *Time Location Sampling* (TLS).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Stimare la prevalenza di HIV, HBV, HCV e Sifilide tra gli MSM; stimare la quota di infezioni recenti da HIV; analizzare i comportamenti a rischio per le suddette infezioni; ottenere dati sugli indicatori dell'*United Nations General Assembly Special Session* (UNGASS) confrontabili con quelli di altri Paesi europei.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Conoscenza della diffusione di HIV, HBV, HCV e Sifilide tra gli MSM; identificare le priorità e le inadeguatezze delle strategie di prevenzione finora adottate; ottenere dati epidemiologici e comportamentali sulla popolazione MSM comparabili con quelli di altre Nazioni europee.

### **Caratteristiche delle persone con infezione da HIV in Italia**

Studio trasversale condotto in un campione rappresentativo di centri clinici di malattie infettive per raccogliere informazioni sulle caratteristiche socio-demografiche, comportamentali, cliniche, viro-immunologiche e terapeutiche delle persone con infezione da HIV attualmente in carico nei centri partecipanti.

### **Risultati attesi nel triennio**

Conoscere il numero di centri clinici che somministrano terapia antiretrovirale, ottenere un profilo completo delle persone con infezione da HIV in Italia, valutare le popolazioni maggiormente colpite dall'infezione da HIV.

### **Trasferibilità dei risultati**

Stimare il numero delle persone viventi con infezione da HIV in Italia, calcolare i costi dell'assistenza per infezione da HIV includendo le terapie, indirizzare la spesa sanitaria pubblica e programmare in modo appropriato strategie assistenziali mirate.

## **Caratterizzazione degli elementi genetici mobili di resistenza in streptococchi ed enterococchi**

Nei batteri i geni di resistenza agli antibiotici sono frequentemente portati da elementi genetici mobili, come ICE e plasmidi, che contribuiscono alla diffusione della multiresistenza. A differenza dei geni di resistenza, gli elementi di resistenza raramente sono studiati in ceppi clinici. Scopo del progetto è l'identificazione, la caratterizzazione e l'epidemiologia molecolare di questi elementi in streptococchi ed enterococchi vancomicina-resistenti (VRE). Saranno esaminati ceppi clinici sia da collezioni presenti in ISS che raccolti nell'ambito di sorveglianze nazionali. I ceppi saranno tipizzati e sarà esaminata l'associazione fisica tra i geni di resistenza. Se saranno individuate le stesse associazioni di geni riportate in letteratura, si potrà definire l'organizzazione genetica degli ICE mediante saggi di PCR specifici per gli elementi noti. Per l'epidemiologia dei plasmidi, nei VRE sarà utilizzato un sistema di classificazione basato sulle *rep-family*, mediante PCR *multiple*. Nuove associazioni di geni e non corrispondenza con ICE già descritti o mancata classificazione dei plasmidi indicheranno potenziali nuovi elementi di resistenza che saranno sequenziati con strategia *high-throughput*, su piattaforma tecnologica 454. Per definire il potenziale contributo alla diffusione intraspecie e interspecie dell'antibiotico-resistenza, sarà esaminata la trasferibilità degli elementi genetici di resistenza mediante saggi di coniugazione.

### **Risultati attesi nel triennio**

La realizzazione del progetto consentirà di avere indicazioni sia dei geni di resistenza agli antibiotici che degli elementi genetici e dei plasmidi presenti in ceppi clinici multiresistenti, rispettivamente di streptococchi e di enterococchi circolanti in Italia. La tipizzazione molecolare dei ceppi mediante *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST) e l'analisi mediante eBURST consentirà di identificare i cloni di appartenenza delle diverse specie batteriche e metterli in relazione ai cloni antibiotico-resistenti a diffusione globale. Specifiche associazioni tra gli elementi di resistenza e i cloni identificati potranno spiegare se e quando la diffusione degli elementi di resistenza è dovuta alla diffusione dei rispettivi cloni. Sulla base delle possibili associazioni fisiche dei geni di resistenza presenti negli elementi genetici, sarà possibile allestire saggi di PCR specifici per la determinazione dell'organizzazione genetica degli elementi. La tipizzazione plasmidica negli enterococchi VRE consentirà di esaminare la predominanza dei diversi plasmidi in rapporto ai cloni identificati. Potenziali nuovi ICE e plasmidi, che non presentano le caratteristiche di quelli già noti, potranno essere identificati. I risultati, essendo ottenuti dallo studio di un'ampia collezione di ceppi clinici, consentiranno di creare un catalogo dei geni, degli elementi genetici e dei plasmidi di resistenza presenti in streptococchi ed enterococchi.

### **Trasferibilità dei risultati**

Le sequenze dei nuovi elementi genetici e plasmidi di resistenza identificati saranno depositate in banca dati di sequenze nucleotidiche. Le sequenze saranno quindi rese disponibili per l'utilizzo in analoghi studi effettuati in altri laboratori. Anche l'allestimento di

nuovi saggi di PCR mirati all'analisi dell'associazione fisica dei geni di resistenza permetterà una rapida identificazione degli elementi genetici portati dai ceppi circolanti. Nel complesso i risultati ottenuti saranno trasferiti alla comunità scientifica mediante pubblicazioni su riviste nazionali e internazionali, rappresentando un utile contributo agli studi sulla diffusione dell'antibiotico-resistenza e della multiresistenza in particolare nei ceppi di *Streptococcus pneumoniae* e di *Enterococcus spp.* circolanti.

### **Caratterizzazione della risposta di cellule dendritiche umane per definire l'immunogenicità di nuovi vaccini contro l'Mtb**

La TB è una malattia infettiva, contagiosa a decorso cronico, che uccide ogni anno milioni di persone. La WHO ha stimato che circa due miliardi di persone in tutto il mondo possano essere infettati con Mtb e a rischio di sviluppare la malattia. Inoltre l'emergenza di ceppi *multidrug resistant* (MDR) ed *extensively drug resistant* (XDR) mettono a rischio la capacità di trattare questa infezione. Il vaccino attualmente usato, il ceppo attenuato di *Mycobacterium bovis* BCG, è efficiente contro le forme di TB sistemica nei bambini, ma non protegge gli adulti dalla TB polmonare la forma più diffusa e trasmissibile della malattia. Inoltre, un secondo aspetto fortemente dibattuto e controverso in merito alla vaccinazione con BCG, si riferisce al rapporto tra efficacia e pericolosità di questa vaccinazione (alta frequenza di BCGosi post-vaccinazione) nelle regioni del mondo ad altissima incidenza di AIDS, che sono poi gli stessi paesi dov'è tutt'ora obbligatoria la vaccinazione con BCG durante i primi giorni di vita del neonato. Per questo motivo lo sviluppo di un nuovo vaccino contro la TB è alla base della strategia globale per sconfiggere questa malattia. Tra i vaccini attualmente in studio ci sono alcuni ceppi ingegnerizzati a livello del locus RD1 codificante per proteine di secrezione con un alto potere immunogenico a cui, però, è associata anche un elevato grado di patogenicità.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Nell'ambito del progetto europeo NewTBVAC il contributo del nostro gruppo ha come obiettivo principale l'analisi della risposta delle DC umane all'infezione con nuovi ceppi vaccinali di Mtb e BCG al fine di testare la loro immunogenicità in studi preclinici.

In particolare, i ceppi vaccinali ottenuti all'interno del progetto europeo NewTBVAC, che dimostreranno una migliore efficacia protettiva nei topi, saranno avviati allo sviluppo per una loro ulteriore valutazione in studi preclinici basati sulla capacità di indurre protezione in modelli animali e di promuovere le proprietà immunostimolatorie delle DC umane. A tale scopo verranno studiate la maturazione fenotipica, il rilascio di citochine regolatorie e la capacità di promuovere una risposta adattativa protettiva. Verranno analizzate con particolare attenzione le interazioni ospite-parassita capaci di evocare la stimolazione dell'Interferone (IFN) di tipo I, una citochina chiave per la stimolazione della risposta Th1, in modo da identificare le molecole del micobatterio capaci di promuovere l'espressione di queste citochine. Il rationale di questo studio si basa su recenti osservazioni ottenute dal nostro gruppo in cui è stato dimostrato che l'IFN di tipo I può fungere da adiuvante naturale rinforzando le capacità immunostimolatorie del ceppo vaccinale BCG.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La TB è un importante problema sociale a livello mondiale. Il trattamento dei casi attivi è estremamente costoso per la sanità pubblica dato che i pazienti necessitano di isolamento e sono soggetti a trattamenti terapeutici molto lunghi. Dato che la mancanza di compliance è il maggior problema sia per ottenere un trattamento di successo sia per evitare la selezione di ceppi farmaco-resistenti, è richiesto un grosso sforzo dell'SSN per il controllo e la gestione

dei pazienti. Per questo motivo lo sviluppo di un nuovo vaccino contro la TB è alla base della strategia globale per sconfiggere questa malattia.

L'obiettivo di questo progetto è quello di utilizzare le nuove conoscenze scientifiche di immunologia e biologia molecolare per selezionare nuovi vaccini o per aumentare l'efficienza del vaccino esistente e disegnare un vaccino di seconda generazione che sia più sicuro ed efficace di BCG.

### **Caratterizzazione epidemiologico-molecolare delle forme cliniche associate a virus trasmessi da artropodi con particolare riferimento a *West Nile (WN)*, Dengue e Chikungunya**

I virus trasmessi da Artropodi (arbovirus) sono responsabili di importanti patologie umane in quasi tutto il mondo. Gli Arbovirus circolano tra gli animali selvatici e causano malattie nell'uomo, che rappresenta spesso un ospite a fondo cieco, a seguito di puntura accidentale da parte del vettore infetto. Virus come la Dengue, il Chikungunya e il WN sono responsabili di estese epidemie in continenti come Africa e Asia e recentemente il virus Chikungunya e il virus WN hanno causato epidemie anche nel nostro Paese. L'espansione dell'urbanizzazione ha portato all'aumento della concentrazione di ospiti umani suscettibili e il riscaldamento climatico ha favorito la diffusione della popolazione di vettori come le zanzare *Culex* portatrici del virus WN e le zanzare *Aedes aegypti* responsabili della diffusione del virus Chikungunya, e del virus Dengue. Assieme alla diffusione del vettore aumentano i focolai di infezione e la possibilità di nuova introduzione di malattie trasmesse dagli arbovirus.

Ne sono esempi il virus WN oramai divenuto endemico in Italia, il Chikungunya responsabile della prima epidemia europea verificata nell'estate del 2007 e del virus Dengue per il quale esistono tutte le condizioni per una nuova introduzione e in casi importati hanno nel corso degli anni subito un notevole incremento. In questo quadro la diagnosi molecolare e l'analisi filogenetica dei ceppi isolati rivestono particolare rilevanza.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Caratterizzazione dei focolai naturali e analisi molecolare degli isolati.
- Allestimento di metodi quantitativi e qualitativi elaborati *in house* sulla base dei dati di letteratura o di esperienza originale, che utilizzano PCR (DNA) e RT-PCR (RNA) in formato classico e *real time*.
- Sequenziamento dei prodotti di PCR, e analisi filogenetica dei ceppi identificati al fine di identificare le catene di trasmissione e identificare nuove varianti.
- Associazioni tra nuove varianti e patogenesi.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- Nuove tecniche di indagine molecolare per singolo agente e in multiplex.
- Mappe di circolazione delle varianti isolate.
- Divulgazione e diffusione dei risultati ottenuti attraverso pubblicazioni su riviste scientifiche, seminari e partecipazione a convegni e/o congressi.

### **CD38, ectoenzima e recettore multifunzionale, ruolo nella regolazione e/o disregolazione della risposta immunitaria**

I recettori cellulari svolgono un ruolo importante nell'attivazione e nella regolazione delle risposte immunitarie in quanto interfaccia con il microambiente circostante. CD38 è un ectoenzima multifunzionale, espresso in molti tipi cellulari del sistema ematopoietico la cui

espressione è spesso associata ai diversi stadi di maturazione e attivazione. CD38 inoltre esplica una specifica attività recettoriale, in particolare induce attivazione e sintesi di citochine infiammatorie e regolatorie in linfociti T e B, monociti e cellule NK. CD38, inoltre, protegge dall'apoptosi i linfociti B ed è coinvolto in processi di migrazione. Abbiamo dimostrato che il CD38 è un marcatore delle DC mature di derivazione monocitaria (Fedele *et al.*, *EJI*. 2004), e ha un ruolo centrale nella produzione di IL-12, nella sopravvivenza cellulare, nella capacità di migrare verso il linfonodo e nel promuovere una polarizzazione Th1 della risposta immunitaria (Frasca *et al.*, *Jl*. 2006).

Tra i processi patologici nei quali il CD38 è coinvolto, è rilevante il ruolo nella leucemia linfoide cronica (CLL). CD38, infatti, non solo è un marcatore prognostico negativo, ma anche un elemento chiave nel promuovere il progredire della malattia. Un aspetto centrale da chiarire è il ruolo di CD38 espresso sui linfociti T attivati nei pazienti affetti da CLL. I linfociti T, infatti, non sono in grado di montare una risposta efficace contro le cellule B maligne né verso antigeni di altra natura.

### **Risultati attesi nel triennio**

Questa linea di ricerca si pone un duplice obiettivo: da un lato approfondire ulteriormente il contributo fornito da CD38 alle attività funzionali delle DC, dall'altro definirne il ruolo recettoriale in linfociti T e B di pazienti affetti da CLL.

Per quanto riguarda il primo aspetto intendiamo caratterizzare le vie intracellulari attivate da CD38 nelle DC. Concentreremo i nostri studi sull'attivazione delle MAP chinasi, dei membri della famiglia delle STAT e del fattore trascrizionale NF- $\kappa$ B. Punto focale sarà inoltre lo studio del coinvolgimento del CD38 nella regolazione di IL-12, citochina chiave nel differenziamento delle cellule Th1.

Per quanto riguarda il secondo obiettivo, il nostro gruppo di ricerca ha già dimostrato che la stimolazione di linfociti T con anticorpi anti-CD38 agonisti determina proliferazione cellulare e produzione di citochine (AusIELlo *et al.*, *Cell Imm.* 1996). I segnali di attivazione cellulare mediati da CD38 in linfociti T di pazienti affetti da CLL saranno analizzati e posti in relazione allo stadio di severità della malattia. In particolare, sarà valutata la risposta proliferativa e la capacità di indurre citochine prodotte specificamente dalle sottopopolazioni Th1, Th2, Th17 e Tregs. Negli stessi pazienti intendiamo inoltre analizzare il ruolo di CD38, espresso sui linfociti B attivati nell'espansione di linfociti B della memoria.

### **Trasferibilità dei risultati**

Il raggiungimento degli obiettivi permetterà una comprensione più approfondita del ruolo del CD38 quale recettore espresso da DC mature, le uniche cellule presentanti l'antigene (APC) in grado di attivare risposte immuni primarie.

Lo studio del ruolo di CD38 nei meccanismi responsabili del deficit di funzionalità dei linfociti T proprio dei pazienti affetti da CLL, permetterà lo sviluppo di strategie atte a migliorare e ottimizzare la risposta immunitaria.

La pubblicazione dei risultati su riviste internazionali di forte impatto, l'invio di abstract a congressi nazionali e internazionali, sono gli indicatori che si intende raggiungere. L'ottenimento d'ulteriori finanziamenti, soprattutto a livello europeo, rappresenta un punto focale della progettualità.

## **Cellule dendritiche plasmacitoidi nella sclerosi multipla (SM): valutazione del loro ruolo patogenetico e modulazione della loro funzione durante il trattamento con IFN-beta**

L'interferone- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) è il trattamento di scelta per i pazienti con SM. Tuttavia, il meccanismo esatto mediante il quale questo farmaco esercita i suoi effetti terapeutici rimane

ancora non completamente chiaro. Nei nostri precedenti progetti abbiamo mostrato che cellule dendritiche plasmacitoidi (pDC), una sotto-popolazione di DC implicate in diverse malattie autoimmuni, sono reclutate e si attivano nel tessuto cerebrale di pazienti con SM e che la loro maturazione è influenzata dal trattamento con IFN- $\beta$  sia *in vivo* che *in vitro*. In particolare, abbiamo osservato che l'IFN- $\beta$  interferisce con l'espressione di marcatori di maturazione, con la capacità di rilasciare gli IFN di tipo I e altre citochine proinfiammatorie, di stimolare le cellule T. Perciò si può immaginare che le pDC, dopo essere venute a contatto con IFN- $\beta$  nel sangue periferico, diventano *iporesponsive* verso gli stimoli maturativi che possono incontrare nel tessuto cerebrale infiammato. A sua volta l'induzione nelle pDC trattate con l'IFN- $\beta$  di uno stato di refrattarietà agli stimoli maturativi, quali i ligandi del *toll like receptor* (TLR)-9, CD-40L e citochine pro-infiammatorie, si concretizza in una ridotta capacità di presentazione dell'antigene e di attivazione dei linfociti T.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Basandoci su queste premesse, vorremmo estendere i nostri studi:

- all'identificazione dei meccanismi mediante i quali l'IFN- $\beta$  agisce sulla capacità immunoregolatoria delle pDC;
- alla caratterizzazione degli effetti indotti da queste pDC *iporesponsive* sul differenziamento e attivazione dei linfociti B.

Le modificazioni indotte dall'IFN- $\beta$  sul fenotipo e sulle funzioni delle pDC verranno analizzate attraverso l'analisi fenotipica e delle capacità immunoregolarie delle pDC presenti nei PBMC di pazienti con SM prima e dopo terapia con IFN. Pensiamo inoltre di condurre uno studio analogo nei linfociti B, in quanto anche questa popolazione leucocitaria esprime in modo selettivo i recettori TLR-7 e TLR-9. Verrà pertanto analizzata la risposta alla stimolazione dei recettori TLR7 e TLR-9 in pazienti con SM in trattamento con IFN- $\beta$ . Risultati preliminari ottenuti in quest'ultimo anno suggeriscono l'esistenza di una risposta differenziale a questi agonisti in termini di produzione di immunoglobuline G (IgG) e immunoglobuline M (IgM) da parte dei linfociti B. Intendiamo pertanto definire se questi meccanismi sono indotti direttamente nei linfociti B dalla stimolazione con i TLR o se sono in parte mediati dall'attivazione delle pDC. Questo studio è di particolare importanza anche alla luce di alcune nostre evidenze sperimentali che stabiliscono la presenza di un difetto nell'espressione genica del TLR-7 negli individui affetti da SM a confronto con i sani.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La SM è una malattia neurologica cronica, infiammatoria e progressivamente invalidante, con un costo sociale molto elevato. In Italia è colpita circa una persona su mille, in prevalenza donne, con esordio di malattia compreso tra 20 e 35 anni.

Se finora la ricerca dei *biomarker* si è mossa nell'ambito generico dell'infiammazione immunomediata, la crescente mole di dati a sostegno di un ruolo patogenetico di EBV nella SM apre la strada a indirizzi di ricerca più specificamente orientati da nuovi meccanismi patogenetici. Pertanto i risultati di questo progetto consentiranno una migliore valutazione del ruolo di agenti infettivi e di meccanismi di disregolazione della risposta immunitaria nei pazienti con SM al fine di comprendere l'associazione esistente tra questi eventi e decorso clinico della SM.

Questo studio è condotto in collaborazione con l'Ospedale Sant'Andrea di Roma.

### **Cloni batterici di *Escherichia coli* causa di infezioni extra-intestinali nell'uomo con particolari profili di antibiotico resistenza di possibile origine zoonosica**

*Escherichia coli* causa d'infezioni extra-intestinali (definito ExPEC), rappresenta un problema emergente nell'ambito della salute pubblica, essendo la principale causa delle

infezioni del tratto urinario nonché delle sepsi, nell'uomo. Il trattamento terapeutico di tali infezioni si è recentemente complicato in seguito all'emergenza di resistenza a farmaci considerati di prima scelta, quali fluorochinoloni, beta-lattamici, incluse cefalosporine di nuova generazione, e trimetoprin-sulfametossazolo. Spesso queste resistenze sono concomitanti e ceppi multi-resistenti appaiono in costante incremento. In ambito veterinario, si assiste a un analogo aumento della frequenza d'isolamento di ceppi di *E. coli* portatori di resistenza multipla. Recenti indagini svolte dal nostro gruppo di lavoro hanno evidenziato come alcuni gruppi specifici di ceppi di origine umana e aviaria (appartenenti al gruppo filogenetico A) condividano non solo i medesimi profili di resistenza ma anche il medesimo genotipo, ovvero appartengano ai medesimi cloni o gruppi clonali (CC10 e CC23), suggerendo l'esistenza di un possibile serbatoio aviario. L'eventuale presenza di varianti di virulenza nell'ambito di uno stesso clone appartenente al gruppo filogenetico A non è al momento nota.

Il presente progetto si propone di continuare il monitoraggio della circolazione di cloni ExPEC multi-resistenti e di investigare la presenza di eventuali varianti di virulenza nei cloni condivisi da uomo e specie aviaria.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Implementazione del sistema pilota di sorveglianza organizzato negli anni 2009-2011, al fine di continuare il monitoraggio della circolazione di ceppi di *E. coli* multi-resistenti sia tra isolati da infezioni extra-intestinali nell'uomo sia tra isolati da animali, in particolare da specie aviaria.
- Caratterizzazione fenotipica e genotipica di cloni multi-resistenti di *E. coli* di origine umana e aviaria.
- Caratterizzazione di fattori di virulenza in cloni multi-resistenti (CC10 e CC23) appartenenti al gruppo filogenetico A e condivisi dall'uomo e da specie aviaria.
- Identificazione di possibili varianti di virulenza associate a origine umana e/o aviaria.
- Identificazione di *marker* molecolari appropriati utilizzabili come strumenti epidemiologici per lo studio della tracciabilità dei principali cloni multi-resistenti in ambito umano, veterinario e ambientale.
- Valutazione del rischio per la salute dell'uomo associato all'esposizione a *E. coli* multi-resistente di possibile origine zoonosica mediante la catena alimentare.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti saranno trasferiti all'SSN e alla comunità scientifica nazionale utilizzando veicoli ad ampia diffusione quali congressi nazionali e pubblicazioni affinché le conoscenze acquisite siano largamente fruibili da un'ampia platea scientifica. I laboratori facenti parte del sistema di sorveglianza pilota su *E. coli* parteciperanno dei risultati prodotti in workshop e incontri periodici. La pubblicazione su riviste internazionali che utilizzano un sistema di *peer-review* permetterà la diffusione dei risultati raggiunti anche a livello della comunità scientifica internazionale.

### **CLOSTNET – A Clostridial Biology Network to Facilitate European-wide Medical Countermeasures and Commercial Exploitation**

I principali scopi del progetto sono di stabilire i meccanismi mediante i quali i prodotti extracellulari di *Clostridium difficile* (enzimi idrolitici, proteine di superficie, fattori di virulenza) interagiscono con l'ospite e di definire i meccanismi che influenzano la plasticità del genoma di questo microorganismo facilitando il suo adattamento a nuovi ospiti (animali) e/o ambienti esterni.

Una particolare attenzione sarà data alla composizione e ruolo delle spore.

Il Progetto comprende 11 partner europei (UO) e ogni UO è responsabile di due studenti stranieri che svolgeranno nei tre anni il loro dottorato (*Philosophiae Doctor*, PhD) europeo.

#### **Risultati attesi nel triennio**

All'interno di questo progetto, l'attività sperimentale della UO dell'ISS produrrà risultati riguardanti:

- il ruolo delle proteine di superficie di *C. difficile* sull'immunità dell'ospite;
- i meccanismi dell'antibioticoresistenza in *C. difficile*, in particolare verso fluorochinoloni, macrolidi e metronidazolo;
- l'influenza dell'antibioticoresistenza sulla virulenza e sulla fitness di *C. difficile*.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- pubblicazioni su riviste internazionali *peer-reviewed*;
- organizzazione di workshop;
- presentazioni in congressi scientifici nazionali e internazionali.

### **Controllo di qualità nazionale delle tecniche immunogenetiche**

La qualità della tipizzazione HLA (*Human Leucocyte Antigen*), effettuata sia con tecniche sierologiche che con tecniche genomiche, viene valutata annualmente sui laboratori italiani che funzionano da centri regionali di riferimento per i trapianti di organo e/o da registri per il trapianto di midollo osseo, più quelli che hanno ottenuto un accreditamento internazionale e alcuni laboratori stranieri. Altri schemi del programma includono la prova di compatibilità pre-trapianto di organi solidi (*crossmatching*), la ricerca di anticorpi anti-HLA nei pazienti in lista di attesa di trapianto e il monitoraggio del chimerismo nei trapianti di cellule ematopoietiche. Il programma nasce da una collaborazione tra l'ISS e il CNT in base all'art. 8 della legge 91/99 sui trapianti e segue gli standard della *European Foundation for Immunogenetics*, società scientifica che redige le linee-guida dei controlli di qualità e fornisce gli accreditamenti internazionali ai laboratori. Il progetto si propone di proseguire e sviluppare il programma dei controlli di qualità in immunogenetica in modo da monitorare e migliorare la qualità delle prestazioni dei laboratori che operano nel settore.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi consistono nel rilevare un miglioramento della qualità delle analisi eseguite dai partecipanti e una maggiore uniformità tra i risultati ottenuti dai laboratori italiani (con un elevato standard qualitativo) e quelli ottenuti dai laboratori stranieri dell'Europa dell'Est, le cui tecniche necessitano ancora di completa standardizzazione.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questo programma rientra nelle attività del CNT e quindi in quelle del Ministero della Salute. Risulta di fondamentale importanza per il sistema sanitario nazionale in quanto opera un controllo sui laboratori che operano nel campo dei trapianti. I risultati sono pubblici e se la prestazione di un laboratorio non è conforme agli standard nazionali ed europei, tale laboratorio è tenuto a effettuare manovre correttive e sottostare a ulteriore controllo. In caso di valutazione negativa per due anni consecutivi, il laboratorio dovrà sospendere l'attività. Tutto questo è garanzia di qualità e tutela della salute pubblica.

### **Diagnosi avanzata delle epatiti virali: un'emergenza sanitaria globale**

Le epatiti virali rappresentano una priorità sanitaria mondiale. Il messaggio è contenuto nella risoluzione della WHO del 21/5/2010. In risposta alla risoluzione, numerosi Paesi

hanno pianificato campagne di screening diagnostico sia di individui a rischio di infezione che di migranti provenienti da paesi ad elevata endemia.

L'attenzione globale pone in prima linea le diverse problematiche e innovazioni connesse alla diagnosi delle epatiti virali quali il continuo sviluppo di saggi di rilevamento della viremia (per i virus C, B, E), la minore efficienza dei saggi di rilevamento dell'antigene di superficie del virus dell'epatite B (*Hepatitis B surface Antigen*, HBsAg) e il genoma del virus (HBV DNA) nei confronti di genotipi di HBV presenti nei migranti e la progressiva entrata nel mercato di saggi di auto-diagnosi per l'infezione da HCV. Tali innovazioni e criticità hanno implicazioni rilevanti nell'ambito di attività istituzionali specifiche quali:

- l'attività di vigilanza (incidenti) e sorveglianza per il settore dei dispositivi medico-diagnostici *in vitro* (IVD) (direttiva 98/79/CE e DL.vo 332/2000);
- l'implementazione della banca dati IVD, con riferimento alla banca dati europea – EUDAMED (Commissione europea del 2010). Il progetto si pone l'obiettivo di valutare i metodi attuali e innovativi che trovano applicazione per la diagnosi delle infezioni da virus dell'epatite B, C, D.

### **Risultati attesi nel triennio**

Tra i risultati attesi:

- formulazione di procedure che assicurino la qualità delle prove di laboratorio in accordo con le normative tecniche vigenti;
- definizione di un protocollo di prova generale per la valutazione dei campioni;
- addestramento del personale sugli argomenti specifici connessi all'attività di valutazione da svolgere in laboratorio;
- realizzazione di un'inchiesta di mercato atta a definire l'ampiezza del mercato italiano per gli IVD anche con il supporto dei dati disponibili presso il Ministero della Salute in quanto autorità competente per la direttiva 98/79/CE;
- assicurazione, ove richiesta, dell'assistenza tecnico-scientifica al Ministero della Salute sia attraverso la formulazione di pareri relativi a specifici quesiti posti dal Ministero stesso, sia mediante la partecipazione dei propri qualificati funzionari che affianchino i funzionari del Ministero, all'interno di gruppi e organismi tecnici, nazionali e internazionali, operanti nelle materie disciplinate dalla direttiva comunitaria citata al precedente punto.

### **Trasferibilità dei risultati**

Si sottolinea che lo svolgimento dell'attività di ricerca sopra descritta costituisce l'indispensabile strumento per la messa a punto di metodologie di controllo di qualità specifiche che permettano un efficace e rapido intervento nel settore della vigilanza dei diagnostici *in vitro* in generale e nell'evenienza di particolari problematiche e incidenti nella fase di applicazione e commercializzazione. Ciò particolarmente per la considerevole rilevanza nella pratica clinica e per l'elevato impatto sanitario. I risultati delle ricerche e i metodi messi a punto e standardizzati saranno oggetto di pubblicazione su riviste internazionali specializzate e potranno essere utilizzati, sia da parte di organismi preposti al controllo, che da parte delle strutture di produzione. Costituiranno, inoltre, la base per proposte di aggiornamento delle linee guida esistenti da rivolgersi alle specifiche sedi tecniche europee.

## **Diagnosi e patogenesi delle candidosi mucosali e invasive**

Le candidosi sono in continuo aumento e variano da infezioni invasive fatali in pazienti immunocompromessi ad infezioni delle mucose frequenti in pazienti affetti da AIDS. Le candidosi invasive rappresentano una delle maggiori cause di mortalità in pazienti

neutropenici o affetti da vari tipi di neoplasie. In particolare, la candidemia si colloca al quarto posto come causa di infezioni in pazienti ematologici con una percentuale di mortalità >50%. Vi sono difficoltà per una diagnosi precoce, infatti in molti pazienti l'infezione non determina segni clinici distintivi e le emocolture sono frequentemente negative. La prognosi è spesso sfavorevole e un precoce trattamento antifungino può essere decisivo. Il miglioramento della diagnosi, profilassi e terapia di queste infezioni richiede migliori conoscenze di base sull'interazione tra micete e ospite. Le infezioni delle mucose, soprattutto candidosi orofaringee e vaginali, sono particolarmente rilevanti in pazienti affetti da AIDS. La candidosi vulvovaginale è un'infezione frequente anche in donne sane e spesso si manifesta in forme ricorrenti e refrattarie alla terapia antimicotica. Tuttavia la patogenesi e la risposta immune dell'ospite a livello vaginale non è chiara.

Gli obiettivi di questo progetto sono:

- miglioramento della diagnosi delle candidosi invasive;
- studio della candidosi vulvovaginale;
- sperimentazione clinica di un vaccino anti-Candida per le vaginiti ricorrenti.

### **Risultati attesi nel triennio**

Tra i risultati attesi vi sono:

- Miglioramento della diagnosi delle candidiasi invasive  
L'evidenziamento di DNA fungino in campioni di sangue è una metodica alternativa alla tradizionale emocoltura. La nuova ricerca valuterà in uno studio multicentrico specificità, sensibilità e riproducibilità di PCR, multiplex PCR e *Real time* e *High Resolution Melting Analysis* (HRMA) per la rilevazione di alcune specie di *Candida*, con *primer* della sequenza genica della mannoproteina MP65 in campioni clinici di soggetti affetti da candidosi invasiva.
- Studio della candidosi vaginale  
Verrà seguita, durante l'infezione vaginale, l'espressione di geni di *C. albicans* coinvolti nella regolazione dell'adesione, della secrezione di proteinasi, del dimorfismo e della formazione di biofilm con diverse metodiche (RT-PCR, *Real time*, *microarray*). Verrà valutata la patogenicità di mutanti con i geni deleti per capire la funzione e la rilevanza dei geni identificati. Verrà condotto uno studio immunologico per evidenziare difetti molecolari e cellulari nella candidosi vaginale ricorrente nelle donne.
- Sperimentazione clinica di un vaccino anti-candida per le vaginiti ricorrenti  
Abbiamo preparato un vaccino costituito da virosomi e proteinasi (Sap2) che somministrato per via vaginale conferisce protezione verso l'infezione vaginale da *C. albicans* nella ratta. Questo vaccino (PEV7) è in fase di sperimentazione clinica per il trattamento delle candidosi vulvovaginali ricorrenti nelle donne.

### **Trasferibilità dei risultati**

- Miglioramento della diagnosi delle candidiasi invasive  
Tali ricerche permetteranno di standardizzare metodi molecolari per la diagnosi di candidosi invasiva in pazienti leucemici consentendo una diagnosi tempestiva e un approccio terapeutico altrettanto rapido.
- Studio della vaginite da *Candida*  
Questi studi avranno lo scopo di rilevare i meccanismi di protezione anti-*Candida* e individuare quali di questi siano difettivi nelle pazienti con vaginiti ricorrenti ed evidenziare i costituenti immunogenici e immunomodulatori di *Candida* per possibili interventi immunopreventivi e/o terapeutici.  
La sperimentazione clinica evidenzierà se il vaccino anti-*Candida* è una formulazione promettente da utilizzare per il trattamento delle candidosi vaginali ricorrenti nelle donne.

### **Diagnosi e terapia precoce delle infezioni droga-correlate**

Progetto per promuovere e incentivare lo screening, la diagnosi precoce delle principali malattie infettive correlate all'uso delle sostanze stupefacenti e l'accesso precoce alle terapie nel dipartimento delle dipendenze. Il progetto viene condotto con la collaborazione di un campione di 50 SERT distribuiti in tutto il territorio italiano.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Aumentare in modo considerevole l'offerta del test per infezione da HIV, HBV, HCV, nei tossicodipendenti.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Applicazione dei metodi utilizzati per aumentare l'offerta e l'accettazione dei test sierologici per HIV, HBV, HCV in tutti i SERT presenti nel territorio nazionale.

### **Diagnostica molecolare per batteri patogeni atipici, incoltivabili o difficilmente coltivabili**

I microrganismi patogeni difficilmente coltivabili o addirittura incoltivabili rappresentano a tutt'oggi uno dei maggiori problemi della routine diagnostica microbiologica. Generalmente l'unica alternativa è la sierodiagnosi i cui tempi di risposta spesso lunghi implicano notevoli ripercussioni sull'inizio della terapia adeguata. Solo recentemente la diagnostica molecolare sta prendendo piede nella diagnosi delle infezioni sostenute da batteri e specialmente virus. Mentre alcuni metodi di PCR classica sono ormai entrati a far parte della routine diagnostica, altri metodi più innovativi e sofisticati sono oggetto ancora di verifica. Le potenzialità diagnostiche di tali test necessita di una attenta valutazione che ne verifichi l'utilità dell'uso clinico e la possibile standardizzazione.

Lo scopo del progetto sarà:

- mettere a punto metodiche tramite metodologia *real time* PCR per i batteri considerati non isolabili nella routine laboratoristica quali: borrellie, bartonelle, leptospire, rickettsie, erlichie, micoplasma, clamidia, tropheryma e treponema;
- studiare e ottimizzare criteri pratici e allestire protocolli molecolari operativi per l'applicazione di laboratorio in ambito ospedaliero;
- sviluppare proposte mirate alla standardizzazione dei nuovi protocolli diagnostici, valutando anche gli aspetti economici correlati all'uso delle nuove tecnologie.

#### **Risultati attesi nel triennio**

A tale scopo saranno sviluppati di metodi PCR *Real time* che utilizzano sonde Taqman, FRET, Hybprobe e scorpion. Il progetto si articolerà nelle seguenti fasi:

- messa a punto di metodi di estrazione di DNA da diverse matrici biologiche;
- scelta di target genici di "firma" per ciascun patogeno e disegno di *primer* e sonde;
- sviluppo e standardizzazione di una PCR con un singolo protocollo per i batteri sopra citati;
- valutazione della sensibilità, specificità, valore predittivo e ripetibilità dei risultati;
- elaborazione di procedure operative standard relative ai metodi sviluppati;
- allestimento di serie di campioni biologici per l'esecuzione delle prove interlaboratorio;
- elaborazione statistica dei dati per la valutazione della ripetibilità, riproducibilità e concordanza;
- valutazione finale e impatto economico.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'introduzione della reazione di amplificazione degli acidi nucleici mediante PCR ha apportato notevoli vantaggi in tutto il processo diagnostico delle malattie infettive. In

particolare il recente utilizzo della nuova tecnica denominata *real time PCR* rappresenta uno strumento prezioso ed efficace per migliorare la diagnostica infettivologica, perché è in grado di fornire al medico risultati in tempi assolutamente ridotti rispetto alle metodiche sierologiche. Di conseguenza offre l'opportunità di anticipare l'inizio dell'eventuale terapia antibiotica specifica e diminuire i tempi di degenza ospedaliera dei pazienti, con una ricaduta positiva in termini di qualità e di risparmio sui costi complessivi della sanità.

### **Discovery of influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) inhibitors**

Il progetto si prefigge di identificare composti attivi come inibitori della proteina non strutturale NS1 del virus dell'influenza A, coinvolta nella patogenesi dell'infezione ed essenziale per l'instaurarsi di una infezione produttiva negli esseri umani.

Dati preliminari hanno permesso l'identificazione di SEI6, molecole potenzialmente attive nel contrastare l'attività dell'NS1. La prima analizzata di queste è risultata in grado di inibire la replicazione virale in un modello cellulare a 24h dell'80%.

Il proseguo del progetto prevede il completamento dei test di infezione su modelli cellulari. L'ottimizzazione della struttura chimica delle molecole risultate efficaci.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Ci aspettiamo di selezionare *lead compound* efficaci nell'inibire la replicazione di diversi virus influenzali A in modelli cellulari e animali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il nostro progetto è rilevante per il sistema sanitario nazionale in quanto traslazionale.

Ci proponiamo di sviluppare una nuova serie di composti a funzione anti-influenzale allo scopo di servire da prima linea di difesa in caso di una nuova e mortale minaccia da parte di nuovi virus pandemici, in attesa che possa essere sviluppato un nuovo ed efficace vaccino. Questo potrebbe avere un impatto enorme in termini di vite umane salvate e per il potenziale risparmio di risorse economiche per il sistema sanitario nazionale.

### **Discovery of innovative Tat-mimic compounds to be used in HIV-1 eradication strategies**

Il gol del progetto è quello di sviluppare una nuova classe di piccole molecole attraverso due distinti approcci: un *rational drug discovery* e/o un *drug repositioning* capaci di comportarsi come composti mimetici della proteina Tat di HIV. Questi composti saranno impiegati in strategie volte a riattivare i reservoirs latenti del virus HIV senza provocare effetti dovuti all'attivazione delle cellule T.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Sviluppo e valutazione dei modelli strutturali dell'interazione Tat-TAR e Tat-ciclina T1 basati su dati già disponibili. Questi saranno usati per una selezione in silico di composti potenzialmente in grado di interagire col TAR RNA *stem-loop* che con la ciclina T1.
- Analisi delle interazioni chiave e sviluppo di modelli farmacoforici per l'*in silico* screening di composti derivati da librerie già testate in *clinical trial* avanzati (*drug repositioning*) e derivati da librerie *in house* o da composti commercialmente disponibili (*rational drug discovery*).
- Test biologico degli *Hit compound* su modelli di latenza di HIV di cellule T.
- Ottimizzazione razionale di *Hit compound* identificati per migliorare la loro potenza e specificità.

### **Trasferibilità dei risultati**

Ci aspettiamo che questi composti possano poi essere utilizzati con successo nella riattivazione dalla latenza su modelli cellulari e animali (scimmie *reshus* cronicamente infettate col *Simian immunodeficiency virus* – SIV). Il nostro progetto è rilevante per il sistema sanitario nazionale in quanto è traslazionale, in fatti il nostro scopo è di fornire una nuova classe di composti potenzialmente capaci di ottenere da soli o in combinazione con altri agenti riattivanti una completa fuoriuscita dell'HIV-1 dalla latenza. Questi composti qualora si rivelassero efficaci, potranno essere considerati per una successiva sperimentazione mediante *trial* clinici. La possibilità di essere traslazionali risiede nel fatto che potrebbero trarre beneficio dall'approccio di *drug repositioning* che consiste nell'uso alternativo di farmaci già adottati nella clinica per una diversa indicazione terapeutica. Questo permetterebbe una loro riconversione rapida e soprattutto relativamente sicura.

### **Discovery of lipid antigens, effect on Innate immunity (progetto europeo NewTBVac)**

I lipidi sono costituenti essenziali della parete del micobatterio della TB e sono prevalentemente disposti nella zona più esterna del batterio con la quale ragionevolmente il batterio entra in contatto con le cellule del sistema immunitario *in vivo*.

Alcuni lipidi sono stati riconosciuti come possibili antigeni riconosciuti da linfociti T ma possono anche avere degli effetti sulle cellule del sistema immunitario naturale innato che meritano indagine al fine di poterli utilizzare come componenti di vaccini innovativi a subunità.

Scopo dell'unità operativa di questo progetto europeo è la valutazione dell'impatto di nuovi lipidi sulla modulazione della risposta immunitaria umana.

### **Risultati attesi nel triennio**

Risultati attesi sono:

- la definizione del *pool* dei lipidi che modulano la funzione di DC e macrofagi;
- l'identificazione delle variazioni fenotipiche e funzionali indotta dai lipidi micobatterici sulle cellule del sistema innato;
- l'identificazione dei lipidi con attività proapoptotiche o con la capacità di sovvertire il differenziamento di cellule dai precursori ematopoietici.

### **Trasferibilità dei risultati**

I dati saranno strumentali per il possibile inserimento di lipidi in vaccini sperimentali innovativi contro la TB.

### **Discovery of Tat mimicking compounds to fight HIV latency**

Il gol del progetto è quello di sviluppare una nuova classe di piccole molecole attraverso due distinti approcci: un *rational drug discovery* e/o un *drug repositioning* capaci di comportarsi come composti mimetici della proteina Tat di HIV. Questi composti saranno impiegati in strategie volte a riattivare i *reservoir* latenti del virus HIV senza provocare effetti dovuti all'attivazione delle cellule T.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Sviluppo e valutazione dei modelli strutturali dell'interazione Tat-TAR e Tat-ciclina T1 basati su dati già disponibili. Questi saranno usati per una selezione *in silico* di composti potenzialmente in grado di interagire col TAR RNA *stem-loop* che con la ciclina T1.

- Analisi delle interazioni chiave e sviluppo di modelli farmacoforici per l'*in silico* screening di composti derivati da librerie già testate in *clinical trial* avanzati (*drug repositioning*) e derivati da librerie *in house* o da composti commercialmente disponibili (*rational drug discovery*).
- Test biologico degli *Hit compound* su modelli di latenza di HIV di cellule T.
- Ottimizzazione razionale di *Hit compound* identificati per migliorare la loro potenza e specificità.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Ci aspettiamo che questi composti possano poi essere utilizzati con successo nella riattivazione dalla latenza su modelli cellulari e animali (scimmie rhesus cronicamente infettate col virus SIV). Il nostro progetto è rilevante per il sistema sanitario nazionale in quanto è traslazionale, in fatti il nostro scopo è di fornire una nuova classe di composti potenzialmente capaci di ottenere da soli o in combinazione con altri agenti riattivanti una completa fuoriuscita dell'HIV-1 dalla latenza. Questi composti qualora si rivelassero efficaci, potranno essere considerati per una successiva sperimentazione mediante *trial* clinici. La possibilità di essere traslazionali risiede nel fatto che potrebbero trarre beneficio dall'approccio di *drug repositioning* che consiste nell'uso alternativo di farmaci già adottati nella clinica per una diversa indicazione terapeutica. Questo permetterebbe una loro riconversione rapida e soprattutto relativamente sicura.

#### **Effetti del trattamento chemioterapico sulle cellule T regolatorie (Treg): meccanismi coinvolti**

Le cellule Treg sono parzialmente responsabili della mancanza della risposta immune agli antigeni tumorali contribuendo alla crescita del tumore. Il *microenvironment* del tumore è spesso infatti immunosoppressivo e influenza negativamente la capacità di vaccini tumorali di rompere la tolleranza immunologica verso gli antigeni tumorali. Il trattamento con basse dosi del chemioterapico ciclofosfamide è in grado di potenziare la risposta immune contro antigeni tumorali, ottenuta mediante immunoterapia grazie all'effetto inibitorio che è in grado di esercitare sulle Treg. Il trattamento con ciclofosfamide induce, anche, una massiccia produzione di citochine, tra cui l'espressione di IL-7R, che è stata inversamente correlata all'espressione di FOXP3 il *marker* genetico delle cellule Treg. Noi abbiamo dimostrato che FOXP3 è negativamente regolato a valle del *signaling* dell'interferone, da IRF-1. Nostri dati suggeriscono che la modulazione della sua attività possa essere un meccanismo comune agli agenti in grado di modulare le cellule Treg. Obiettivo del progetto è la definizione dei marcatori molecolari dell'effetto del trattamento chemioterapico, combinato e non con immunoterapia, sulle cellule Treg e se essi includano la modulazione di fattori di trascrizione quali IRF-1. IRF-1 può rappresentare sia un "marcatore molecolare" dei chemioterapici associati, e non, con immuno-terapia ed essere utilizzato come strumento per modificare la capacità soppressoria di cellule T.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- misurazione del numero e attività delle cellule Treg in pazienti che partecipano a due *trial* clinici, trattati con chemioterapici e immunoterapia con infusione di IFN-DC autologhe caricate con corpi apoptotici tumorali, o trasferimento adottivo dei linfociti dai pazienti immunizzati;
- studio in modelli animali preclinici del ruolo di fattori del *signaling* degli interferoni e altre citochine nel potenziamento della risposta immune a diversi trattamenti chemioterapici e immunoterapia;

- validazione del ruolo di IRF-1 tramite utilizzo di protocolli di immunoterapia di tumori con modelli di topi IRF-1 deficienti;
- definizione e validazione di correlati immunologici della risposta antitumorale;
- valutazione della capacità di diversi chemioterapici, caratterizzati da diversi meccanismi di azione, di potenziare l'attività antitumorale dell'immunoterapia attraverso l'attivazione di cellule presentanti l'antigene, quali le cellule dendritiche, e l'effetto dei farmaci sul numero e sull'attività di linfociti Treg, Th1 e Th17.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Diversi studi hanno dimostrato che la chemioterapia antineoplastica può essere vantaggiosamente combinata con strategie di immunoterapia. La delucidazione dei meccanismi di azione dei chemoterapici in uno studio comparativo dell'effetto dei diversi chemioterapici sulle risposte immunitarie indotte dalla vaccinazione o dall'immunoterapia, sia sul materiale clinico che nei modelli animali preclinici rende possibile il disegno di nuove strategie di intervento da affiancare ai protocolli di immunoterapia nei *trial* clinici. Nello stesso tempo potrà rendere più efficaci molte strategie che sono già in grado di determinare sensibili risposte immunitarie contro il tumore senza, tuttavia, produrre risposte cliniche significative.

#### **Effetti di modulatori dell'espressione di TLR3 nella maturazione e funzione di cellule leucemiche umane**

Il TLR3 svolge un ruolo cruciale nel riconoscimento di patogeni virali da parte dalle cellule dendritiche mieloidi (mDC). Nostri studi recenti hanno evidenziato che TLR3 è fortemente attivato e trascritto in seguito al *triggering* di specifici elementi *cis-acting* presenti sul promotore di TLR3 umano tra i quali una *consensus interferon-stimulated response element* (ISRE) per gli IRF, molto importante funzionalmente. In particolare, abbiamo dimostrato come IRF8 controlli negativamente l'espressione genica di TLR3 sopprimendone l'espressione stimolata da IRF1 o dal ligando polyI:C in mDC primarie umane. Inoltre, la repressione di TLR3, indotta da IRF8, è mediata dall'associazione con una fosfatasi, SHP2, che defosforilando IRF8, ne incrementa la sua capacità di legame al DNA e pertanto la sua attività repressoria. Recenti studi hanno evidenziato che polyI:C attiva il sistema immunitario umano, con conseguente regolazione della immunità adattativa, portando a importanti modifiche nel microambiente tumorale e ad una soppressione molto significativa della crescita tumorale. Cellule primarie di leucemia mieloide acuta rispondono marcatamente al polyI:C, mostrando una incrementata apoptosi, dovuta ad un forte incremento dell'espressione di TLR3 e di induzione di IFN. Alla luce delle funzioni proapoptotiche svolte da TLR3 in cellule cancerose, obiettivo del presente progetto è pertanto valutare il ruolo degli IRF e di TLR3 nella modulazione di questi processi antitumorali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- sviluppo di vettori lentivirali in grado di esprimere IRF-1 e IRF-8 in linee cellulari umane di mieloma e condizioni ottimali di infezione;
- definizione del fenotipo e attività di linee cellulari umane di mieloma esprimenti IRF-1 e IRF-8;
- sviluppo di RNA interferenti in grado di silenziare l'espressione di IRF-1 e IRF-8;
- definizione del fenotipo e attività di cellule primarie isolate da sangue periferico di pazienti affetti da leucemia mieloide acuta (AML) esprimenti IRF-1 e IRF-8 o silenziati in relazione alla modulazione dell'espressione del TLR3;

- valutazione dell'effetto dell'inibitore specifico per SHP-2 in condizioni basali o di stimolazione con il ligando poly I:C sui cloni leucemici. Parallelamente verranno monitorati parametri proapoptotici e del differenziamento mieloide;
- determinazione *in vivo* e *in vitro* della capacità delle cellule così ingegnerizzate di modificare l'immunogenicità di queste cellule e il loro potenziale proapoptotico in relazione alla modulazione dell'espressione del TLR3.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti risulteranno particolarmente interessanti alla luce delle funzioni proapoptotiche svolte dal *signalling* di TLR3 in diverse cellule cancerose, e nella definizione dell'attività del poly I:C in *trial* clinici attualmente in corso, come adiuvante nell'immunoterapia di alcuni tumori. I risultati ottenuti permetteranno di sviluppare reagenti specifici in grado di stimolare la risposta mediata da TLR3 nel controllo delle risposte antitumorali.

#### **Emergenza di *H. influenzae* non capsulato in epoca post-vaccinale**

L'uso routinario dei vaccini coniugati contro *Haemophilus influenzae* di tipo b (Hib) ha prodotto, accanto ad una notevole riduzione dell'incidenza della malattia, alcune importanti modificazioni nell'epidemiologia della stessa. Ceppi non prevenibili mediante vaccinazione ovvero capsulati diversi dal b e ceppi non capsulati (ncHi) sono emersi e attualmente ncHi rappresenta il sierotipo predominante tra i ceppi invasivi. Inoltre, secondo dati dell'ECDC, si osserva un trend di aumento dei casi di sepsi da ncHi nei neonati, per il quale si ipotizza una possibile trasmissione madre-figlio al momento del parto. È noto che ncHi è presente nel tratto naso-faringeo di portatori sani ed è possibile che particolari genotipi stiano emergendo come conseguenza della nicchia ecologica resasi disponibile in seguito alla vaccinazione anti- Hib. Nessuna informazione è disponibile riguardo alla colonizzazione da ncHi del tratto genito-urinario delle donne in gravidanza.

Il presente progetto intende proseguire lo studio delle malattie invasive da *H. influenzae* ponendo al centro dell'interesse "ncHi" e investigando anche i serbatoi (portatori) della malattia. In particolare, il progetto si propone di: i) caratterizzare i principali genotipi di ncHi da malattia invasiva; ii) stimare la colonizzazione da ncHi nel tratto oro-faringeo di bambini sani e nel tratto genito-urinario delle donne in gravidanza; iii) caratterizzare i principali genotipi di ncHi isolati da portatori sani.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Tra i risultati attesi:

- Valutazione dell'impatto dell'introduzione della vaccinazione anti-Hib sulla popolazione di ceppi di ncHi circolanti in Italia.
- Identificazione dei principali cloni (genotipi) di ncHi causa d'infezioni invasive e circolanti in Italia.
- Stima della frequenza di colonizzazione da ncHi in bambini sani in età prescolare.
- Stima della frequenza di colonizzazione da ncHi nel tratto genito-urinario delle donne in gravidanza.
- Identificazione dei principali cloni (genotipi) di ncHi circolanti tra i portatori sani (bambini e donne in gravidanza).
- Raccolta di elementi scientifici di valutazione riguardo la possibile trasmissione madre-figlio nei casi di sepsi neonatale da ncHi.
- Costruzione di un data set di base da utilizzare in un prossimo futuro per identificare e monitorare prontamente nuovi cloni ncHi emergenti.

### **Trasferibilità dei risultati**

Poiché non sono disponibili a tutt'oggi vaccini anti-ncHi, le informazioni raccolte sui serbatoi (portatori) della malattia stessa saranno importanti per indirizzare strategie di controllo e prevenzione. A tal fine, i risultati ottenuti dal presente progetto saranno trasferiti all'SSN e alla comunità scientifica nazionale utilizzando veicoli ad ampia diffusione affinché le conoscenze ottenute siano ampiamente fruibili. Nell'ambito della rete di laboratori facenti parte della sorveglianza sulle malattie batteriche invasive, così come nell'ambito della rete dei laboratori partecipanti allo studio sui portatori le informazioni saranno trasferite in workshops e incontri periodici. La pubblicazione su riviste internazionali che utilizzano un sistema di *peer-review* permetterà la diffusione dei risultati raggiunti anche a livello della comunità scientifica internazionale.

### **Enter-net Italia, sorveglianza di laboratorio dei patogeni enterici trasmessi da alimenti e acqua: sviluppo delle attività dei laboratori di riferimento e di interventi di prevenzione**

Le malattie trasmesse da alimenti e acqua (*foodborne and waterborne disease*, FWD) continuano a costituire un problema di sanità pubblica a livello nazionale e internazionale. In Italia, i dati attualmente a disposizione evidenziano aspetti epidemiologici e di sanità pubblica in parte sovrapponibili a quelli di altri Paesi e in parte peculiari, per cui proseguire e sviluppare attività di sorveglianza è una componente essenziale nella comprensione di questi fenomeni. A livello europeo vengono raccolti in via prioritaria dati epidemiologici e microbiologici su infezioni da Salmonella, Campylobacter, *E. coli* verocitossina produttore (VTEC), Listeria, Shigella e Yersinia. Per migliorare e razionalizzare le attività a livello nazionale e colmare il debito informativo con l'Europa è necessario da un lato sviluppare le attività dei laboratori di riferimento presso l'ISS che coordinano la sorveglianza di laboratorio (Enter-net Italia) e dall'altro razionalizzare i flussi informativi attualmente indipendenti e non collegati tra loro, che rendono difficoltosa l'identificazione di condizioni di emergenza o di rischio reale per i cittadini e la possibilità di intervento tempestivo. Inoltre, al fine di fornire un valore aggiunto ai dati di sorveglianza e di indirizzare in modo sempre più mirato ed efficace gli interventi di controllo e di prevenzione, è importante aggiungere studi analitici volti a dare informazioni sul rischio di salute e sull'impatto di sanità pubblica delle FWD.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto consentirà di:

- mantenere costante e regolare l'invio di informazioni microbiologiche ed epidemiologiche all'ECDC nell'ambito della sorveglianza FWD a livello europeo;
- di fornire un supporto di coordinamento operativo per la raccolta e la gestione delle informazioni su FWD, con capacità di intervento e allerta rapida in caso di emergenze in analogia con quanto attivo presso l'ECDC (*epidemiology intelligence*);
- di raccogliere, integrare, analizzare e divulgare informazioni epidemiologiche saranno rilevanti per l'identificazione dei fattori di rischio legati alle FWD e per indirizzare strategie di controllo e prevenzione.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti saranno trasferiti all'SSN e alla comunità scientifica nazionale utilizzando veicoli ad ampia diffusione quali congressi nazionali e pubblicazioni affinché le conoscenze acquisite siano largamente fruibili. Nell'ambito dei laboratori facenti parte del sistema di sorveglianza i risultati prodotti saranno trasferiti in workshop e incontri periodici.

### **Epidemiologia molecolare dei cestodi con particolare riferimento ad *Echinococcus sp***

Obiettivi del progetto sono: i) studi di genetica di popolazione di *Echinococcus sp.*; ii) la valutazione della patogenicità di *Echinococcus granulosus* nei pazienti; iii) l'identificazione di nuovi target molecolari per la coprodiagnosi di *E. granulosus complex* nell'ospite definitivo; iv) lo sviluppo di *proficiency test* per l'individuazione di *Echinococcus sp.* nella mucosa intestinale dell'ospite definitivo.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- utilizzo di marcatori mitocondriali permetterà il miglioramento delle conoscenze attuali riguardanti il controllo, la distribuzione e l'evoluzione di questo parassita;
- associazione tra il quadro clinico dei pazienti e l'identificazione molecolare del parassita permetterà di valutare la patogenicità di questi genotipi;
- individuazione di nuovi marcatori molecolari risulterà utile nella diagnosi veterinaria e negli studi epidemiologici di questo parassita.

Questo servizio offerto agli Stati membri della Comunità Europea permetterà il loro miglioramento nella diagnosi di laboratorio di questo parassita.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Gli obiettivi di ricerca di questo progetto miglioreranno le conoscenze attuali sul controllo epidemiologico dell'Echinococcosi cistica.

Nuovi biomarcatori diagnostici e prognostici per l'uso in test di laboratorio avranno un impatto significativo sulla morbilità di questa malattia.

### **Epidemiologia molecolare delle infezioni da virus dell'epatite: circolazione di genotipi di HCV e HBV nei Paesi del Mediterraneo e in popolazioni di migranti**

L'infezione da virus dell'epatite C (HCV) e B (HBV) ha una diffusione mondiale. I diversi genotipi mostrano differente patogenicità, epidemiologia e una distinta distribuzione geografica. Negli ultimi anni si è assistito ad un incremento del genotipo 4 di HCV (prevalente nel Nord Africa) anche in aree del Mediterraneo dove era considerato raro, ad esempio in Italia (4,7% nel Sud e Centro). Il progetto prevede l'impiego di metodi filogenetici che attraverso l'analisi di sequenze di HCV consentiranno di studiare la storia evolutiva e la diffusione del genotipo 4 in Paesi del Mediterraneo (Italia ed Egitto).

In Turchia le infezioni da HCV e HBV hanno prevalenze rispettivamente del 4% e 5%. Nel progetto verranno analizzati i virus circolanti (HBV e HCV) allo scopo di classificare i genotipi ed esaminare l'origine attraverso il paragone con isolati africani ed europei.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Caratterizzazione molecolare di sequenze di HCV e HBV circolanti in Calabria, in Turchia e in popolazioni di migranti, con particolare riguardo allo studio della divergenza genetica e all'identificazione di nuovi sottotipi virali.
- Studio dell'origine dei genotipi di HCV in Calabria e HCV e HBV in Turchia, mediante un confronto tra i virus circolanti in queste zone e gli isolati virali di origine africana ed europea.
- Analisi filo-geografica degli isolati "locali" finalizzata a determinare la diffusione dei genotipi nelle varie aree dei Paesi esaminati.
- Sequenziamento del genoma completo di isolati di HCV di genotipo 4, o nuovi sottotipi, mediante *Ultra-deep Pyrosequencing* (piattaforma GS FLX).

- Stima della prevalenza dei genotipi di HCV e HBV nelle popolazioni di migranti in Italia anche in presenza di co-infezioni con HIV-1 e HIV-2.
- Caratterizzazione molecolare del genoma completo, o del gene S, di HBV isolato da pazienti con infezione occulta (HBsAg negative; HBV DNA positive) provenienti dalla Turchia o afferenti alla popolazione di migranti.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati potranno contribuire a definire l'epidemiologia e i fattori di rischio che sono alla base della trasmissione dei genotipi di HCV e HBV in Europa. Lo studio della circolazione dei genotipi (HCV 4 e HBV non-D) nell'area del Mediterraneo, particolarmente nella popolazione di migranti, sarà importante per prevedere variazioni nei valori di prevalenza nei Paesi europei. L'allestimento di banche dati di sequenze virali di HCV (genotipo 4 e sottotipi nuovi) o di HBV (virus isolato da infezioni occulte) potrà essere utile per lo sviluppo di un vaccino anti-HCV e di nuove terapie anti-virali. Inoltre, potrà fornire informazioni rilevanti per la diagnosi virologica (infezione da HBV "occulta") e più in generale per la biologia dei virus. L'infezione da genotipo 4 è responsabile del 20% dei casi di epatite C nel mondo ed è associata ad una scarsa risposta alla terapia mentre l'infezione occulta da HBV rappresenta un problema clinico nel settore dei trapianti e trasfusionale.

#### **Evoluzione della epidemiologia molecolare di pneumococco nell'era dei vaccini glicoconiugati per bambini e adulti**

Negli ultimi anni, la disponibilità di un vaccino pneumococcico glicoconiugato, capace di dare memoria immunitaria ed essere immunogeno anche nei primi anni di vita, ha cambiato profondamente l'epidemiologia delle malattie invasive da pneumococco e i sierotipi circolanti. Il vaccino, largamente utilizzato in Nord America e nei Paesi europei, inclusa l'Italia, comprendeva solo sette sierotipi di pneumococco (PCV7) degli oltre 90 conosciuti. In seguito al suo uso, si è verificato il fenomeno del rimpiazzo dei sierotipi, cioè un aumento assoluto delle infezioni dovute a sierotipi non contenuti nel vaccino. Poiché in Italia i sierotipi non vaccinali erano largamente antibiotico-resistenti, non si è verificata l'attesa diminuzione della resistenza agli antibiotici, come osservato in altri Paesi. Attualmente è sul mercato un vaccino che contiene 13 sierotipi (PCV13) compresi alcuni sierotipi frequenti che non erano contenuti nel PCV7, che è stato autorizzato, oltre che per i bambini, anche per adulti oltre i 50 anni. L'epidemiologia dello pneumococco è quindi in continua evoluzione sia per l'allargamento della popolazione interessata alla vaccinazione sia perchè anche i sierotipi contenuti nel PCV13 potrebbero essere rimpiazzati da nuovi.

Questo progetto si propone come continuazione e implementazione del precedente per seguire nel tempo l'evoluzione dei sierotipi e dei cloni di pneumococco circolanti in Italia, con particolare riguardo ai ceppi antibiotico-resistenti.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio renderà possibile seguire il trend dei sierotipi circolanti in Italia con particolare riguardo a quelli responsabili di infezioni invasive nei bambini e nei soggetti anziani. Studi di colonizzazione e co-colonizzazione da sierotipi diversi nei bambini potranno contribuire a valutare precocemente l'occorrenza e l'entità del fenomeno del rimpiazzo dei sierotipi.

Risultati specifici saranno:

- caratterizzazione dei sierotipi e dei cloni circolanti, in particolare dei cloni che comprendono ceppi di sierotipo non vaccinale e antibiotico-resistenti, quale i sierotipi 24F e 15A, che già stanno circolando nel nostro Paese;

- determinazione di un eventuale rimpiazzo di sierotipi (aumento dei sierotipi non vaccinali) e dei fenomeni che lo hanno determinato (espansione clonale, introduzione di nuovi cloni, *switch* capsulare);
- valutazione dell'andamento dell'antibiotico-resistenza nei ceppi responsabili di infezioni invasive, con particolare riguardo alla resistenza alla penicillina e ai macrolidi e alla multiresistenza associate a ceppi non vaccinali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti dal progetto potranno essere utilizzati dall'SSN e in particolare dalle Regioni per valutare le politiche sulla vaccinazione pneumococcica sia nell'età pediatrica che negli adulti. I dati sulla potenziale copertura vaccinale negli adulti potranno essere utili anche agli operatori sanitari che trattano soggetti adulti a rischio o anziani per i quali la vaccinazione è raccomandata.

Le informazioni sull'evoluzione dei sierotipi potranno contribuire a valutare l' utilità futura di una vaccinazione basata su un numero limitato di polisaccaridi capsulari oppure riproporre l'esigenza di sperimentare antigeni proteici potenzialmente presenti in tutti i ceppi di pneumococco. I risultati inerenti la caratterizzazione dei ceppi e cloni saranno oggetto di pubblicazione scientifica e messi a disposizione della comunità scientifica internazionale.

#### **Field evaluation of the efficacy and safety of a topical formulation of Indoxacarb/permethrin (SCH 900560) on the prevention of the transmission of canine leishmaniosis by sand flies in an endemic area**

La ricerca si propone di valutare l'efficacia di una formulazione topica insetticida in cani esposti a trasmissione di leishmaniosi da parte di flebotomi.

Centocinquanta cani (75 di controllo) verranno esposti in focolai endemici della malattia.

Al termine della stagione di trasmissione i soggetti verranno seguiti nel corso di un anno per lo sviluppo della malattia.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Qualora il repellente/insetticida presentasse efficacia topica nei confronti dei flebotomi, il gruppo trattato dovrà sviluppare infezioni da *Leishmania* in proporzione significativamente inferiore a quello di controllo.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il miglioramento dei presidi di controllo della leishmaniosi umana potrebbe trarre beneficio da un ulteriore prodotto veterinario disponibile commercialmente e saggiato su basi scientifiche e controllate.

#### **Genetica ed epidemiologia della resistenza agli antibiotici: mobiloma e resistoma**

La diffusione di batteri resistenti alla terapia antibiotica rappresenta un importante problema di sanità pubblica a livello mondiale, essendo tali batteri associati ad incremento della mortalità, della durata della ospedalizzazione e dei costi per il sistema sanitario. Nel corso del progetto verranno sequenziati mediante approccio genomico i geni di resistenza, i plasmidi, fagi ed elementi genetici trasponibili da batteri di origine nosocomiale e comunitaria tra i più diffusi a livello mondiale grazie alla collaborazione con il *Center for Disease Control and Prevention, National Antimicrobial Resistance Surveillance Team*.

Disponiamo della piattaforma tecnologica FLX-Roche che permette la determinazione della sequenza genomica completa di batteri anche non coltivabili in poche ore. La genomica rappresenta l'approccio più innovativo tra quelli disponibili per la diagnosi delle malattie

infettive e l'analisi molecolare completa di cloni epidemici. L'approccio genomico offre la possibilità di investigare l'intero apparato di resistenza (resistoma) e gli elementi che ne determinano il trasferimento (mobiloma). Il progetto prevede l'analisi genomica di ceppi epidemici multi-resistenti utile all'identificazione dei meccanismi di resistenza multipla agli antibiotici.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Questo progetto si propone di caratterizzare mediante approccio genomico i meccanismi di resistenza e gli elementi genetici mobili che favoriscono la diffusione e riducono l'efficacia dei principali antibiotici utilizzati per il trattamento delle infezioni batteriche. In particolare verranno analizzate le carbapenemasi, le beta-lattamasi a spettro esteso (*Extended Spectrum Beta-Lactamase*, ESBL), la resistenza ai fluoroquinoloni mediata da plasmidi (PMQR) in *Enterobacteriaceae* e la resistenza ai glicopeptidi in enterococchi.

Sulla base delle informazioni ottenute verranno disegnati dei test per l'identificazione rapida dei meccanismi principali di acquisizione e diffusione delle resistenze che permettano uno screening rapido e un miglioramento della tracciabilità delle resistenze e dei ceppi di rilevanza clinica per l'uomo.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'innovazione tecnologica mediante la messa a punto di strumenti innovativi è essenziale per poter garantire un'efficace indagine epidemiologica e il miglioramento delle metodiche di identificazione e caratterizzazione dei microrganismi responsabili degli episodi oggetto di studio. A tal fine i tradizionali metodi fenotipici di tipizzazione non permettono in molti casi di ottenere informazioni adeguate. Per poter condurre efficaci studi epidemiologici i metodi di tipizzazione tradizionali devono essere supportati da moderne metodologie molecolari che rappresenteranno il principale risultato di questo progetto.

I risultati prodotti porteranno all'identificazione nella cellula batterica di bersagli molecolari da utilizzare per screening diagnostici rapidi e altamente specifici (es. al letto del paziente) e identificazione di nuovi bersagli per la progettazione di farmaci antibatterici di nuova generazione da utilizzare contro i batteri multi-resistenti alle terapie convenzionali.

### **Genomica applicata all'identificazione e caratterizzazione di microrganismi patogeni**

La sorveglianza epidemiologica delle infezioni necessita di strumenti innovativi che permettano di riconoscere le caratteristiche genetiche degli agenti patogeni al fine di implementare le misure di controllo e prevenzione delle infezioni. Un approccio multidisciplinare è necessario per lo studio degli agenti infettivi, per identificarne i meccanismi di acquisizione e trasmissione della resistenza agli antimicrobici, la presenza di determinate caratteristiche di virulenza, le capacità metaboliche e resistenza ambientale, l'adattamento e la fitness. A questo scopo si rendono necessari nuovi metodi per la determinazione del contenuto genico che conferisce la resistenza e la virulenza, per la determinazione del contenuto plasmidico nei batteri resistenti, per l'identificazione degli elementi genetici mobili responsabili del trasferimento orizzontale delle resistenze e delle isole di patogenicità. L'approccio genomico offre la possibilità di investigare l'intero genoma e di dedurre le principali funzioni. Questo progetto si propone di caratterizzare mediante approccio genomico i meccanismi di resistenza e gli elementi genetici mobili che favoriscono la diffusione e riducono l'efficacia dei principali antibiotici utilizzati per il trattamento delle infezioni batteriche, ma anche di identificare nuovi cloni mediante sequenziamento di ceppi provenienti da collezioni disponibili in Istituto e da altri enti di ricerca e ospedali isolati durante studi di sorveglianza e controllo.

### **Risultati attesi nel triennio**

Questo progetto si basa sulla piattaforma tecnologica *Genome Sequencer -FLX* della Roche disponibile in Istituto di cui il proponente è un utente esperto e abilitato ad eseguire le procedure di sequenziamento. Nel corso del progetto verranno sequenziati i genomi completi o la parte del genoma accessorio (plasmidi e fagi) di batteri di rilevanza clinica o epidemiologica di origine nosocomiale e comunitaria (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*) e di batteri che hanno un serbatoio in ceppi di origine animale (*Escherichia coli*, Salmonella), ma anche di altri microorganismi di interesse clinico per l'uomo (protozoi e funghi).

I risultati di questa ricerca saranno quelli di utilizzare la nuova piattaforma tecnologica di sequenziamento genomico totale per l'individuazione, in patogeni responsabili di infezioni comunitarie e nosocomiali di rilevanza per l'uomo, di nuovi bersagli da utilizzare per il disegno di farmaci antimicrobici di nuova generazione e per la ricerca dei meccanismi di patogenesi e trasmissione genetica orizzontale.

### **Trasferibilità dei risultati**

L'individuazione dei meccanismi di resistenza e patogenicità, lo studio degli elementi genetici responsabili del trasferimento orizzontale di tali caratteristiche, la caratterizzazione dei ceppi clonali prevalenti, sono attività indispensabili per un corretto monitoraggio e valutazione di episodi infettivi epidemici o sporadici e di fenomeni di trasmissione animale-uomo. L'approfondimento delle caratteristiche dei ceppi porta alla determinazione di nuovi bersagli molecolari su cui sviluppare diagnostici di nuova generazione utili a migliorare gli strumenti di sorveglianza e contro cui pensare in un prossimo futuro di costruire nuovi farmaci utili alla cura delle malattie infettive.

## **Identificazione del ruolo funzionale delle interazioni fra proteina core del virus dell'epatite C e fattori della cellula ospite**

Il virus HCV è responsabile della maggior parte dei casi di epatite cronica nel mondo. Nel 25-35% dei casi l'infezione cronica da HCV evolve in cirrosi ed epatocarcinoma (*Hepatitis C Carcinoma*, HCC). Nonostante la stretta associazione fra HCV e HCC, non è ancora stato chiarito il ruolo del virus nella carcinogenesi epatica. Fra le proteine codificate dal virus, la proteina strutturale core ha un ruolo nella patogenesi associata all'infezione e svolge molteplici attività di regolazione nel ciclo replicativo virale e in varie funzioni cellulari, soprattutto interagendo con fattori della cellula ospite. La caratterizzazione della rete di interazioni fra proteine virali e cellulari rappresenta un metodo innovativo per risolvere interrogativi riguardo alla virulenza/attenuazione, all'identificazione di target terapeutici, alla cronicità e al rischio di sviluppare cancro. A tale riguardo ci si è proposti di svolgere un progetto collaborativo che ha lo scopo: i) di esplorare e caratterizzare strutturalmente la rete di interazioni proteiche della proteina core di HCV (interattoma) con l'impiego di *microarray* di proteine; ii). di mappare i domini di interazione della proteina core attraverso l'uso di costrutti mutanti della proteina virale; iii). confermare e validare le interazioni fra core e proteine cellulari identificate con i metodi su citati, e di valutarne l'effetto funzionale in vari sistemi di espressione e di infezione *in vitro*, nonché in modelli murini di topi transgenici per la proteina core.

### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio descritto permetterà di identificare la rete di interazioni fra la proteina virale core e le proteine della cellula ospite e di riconoscere siti specifici nella proteina core responsabili dell'interazione con i fattori cellulari, sia già noti dalla letteratura che quelli neo-identificati con la metodologia qui impiegata di *microarray* proteico. In particolare, ci si

attende di caratterizzare dal punto di vista strutturale e biochimico l'interattoma della proteina *core* e di studiare e caratterizzare l'effetto funzionale di tali interazioni in vari sistemi di espressione e coltivazione del virus HCV *in vitro*. Da tale studio si otterranno informazioni sui meccanismi e fattori cellulari coinvolti nella replicazione e persistenza del virus e possibilmente di quelli responsabili della carcinogenesi. Sarà così possibile identificare nuovi potenziali targets di trattamento delle cellule infettate da HCV.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati prodotti dallo studio descritto saranno divulgati su riviste internazionali sottoposte a *peer-review*. Le interazioni fra proteina core e fattori cellulari che mostreranno un ruolo funzionale nella replicazione virale e nella funzionalità della cellula infettata saranno utilizzate per sviluppare successivamente *tool* molecolari che interferiscono con le interazioni caratterizzate, fornendo un punto di partenza per lo sviluppo di nuove strategie farmacologiche volte ad inibire la sopravvivenza delle cellule che esprimono HCV.

### **Identificazione di nuovi immunoterapici e biomarker per la tubercolosi**

Per contrastare la pandemia di TB è necessario individuare nuovi trattamenti terapeutici, non solo chemioterapici, e identificare *biomarker* in grado di distinguere tra fase attiva e latente d'infezione e predittivi dell'andamento della malattia o dell'efficacia vaccinale. Basandoci su un approccio integrato di sperimentazione animale (modelli sperimentali di TB in topi immunocompetenti con diverse suscettibilità alla TB e con fase acuta e cronica d'infezione) e approcci clinici (pazienti malnutriti e normonutriti con diverse forme di TB e/o infezioni latenti) ci proponiamo di investigare se la leptina possa essere un nuovo immunoterapico per il trattamento della TB, in soggetti malnutriti e normonutriti, e se leptina o specifici MicroRNA (miR) siano fattori di rischio di suscettibilità alla TB. La leptina, ormone/citochina rilasciato dagli adipociti, regola il metabolismo energetico e lega lo stato nutrizionale con la funzionalità del sistema neuroendocrino e immunitario. Aspetti essenziali nella TB, considerando che l'attivazione e il mantenimento della risposta immune durante l'infezione richiedono un aumento del consumo energetico e la malnutrizione è un importante fattore di rischio di suscettibilità alla TB. I miR sono regolatori chiave di un ampio spettro di processi biologici, includendo infiammazione e risposta immune. Il profilo dei miR è utilizzato nella diagnosi/prognosi di malattie polmonari infettive e non infettive, ma non ancora nella TB.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Correlando l'espressione, a livello sistemico e polmonare, di leptina e/o dei miR con la patogenesi e la risposta immune innata e acquisita nei modelli sperimentali murini e in cellule/campioni biologici di individui sani, con infezione latente e pazienti con varie forme di TB definiremo se: i) la carenza di leptina, a livello sistemico e polmonare, in individui immunocompetenti correla con una maggiore suscettibilità alla TB o con un più sfavorevole decorso; ii) i livelli sistemici/polmonari di leptina e/o la produzione di leptina da cellule del sistema immunitario (principalmente cellule CD4 T o macrofagi) possono esseri usati come fattori di rischio predittivi della suscettibilità alla TB; iii) la carenza di leptina è responsabile dell'incapacità dei macrofagi di ospiti suscettibili di uccidere *M. tuberculosis* e se il trattamento con leptina, attraverso meccanismi Th1, dipendenti o indipendenti, può superare tale deficit; iv) la leptina contribuisce alla suscettibilità alla TB nella malnutrizione e se la somministrazione di leptina migliora il decorso della TB in soggetti suscettibili malnutriti; v) la leptina influenza l'efficacia vaccinale del BCG; vi) specifici miR sono *biomarker* in grado di distinguere a livello polmonare e/o sistemico le diverse fasi acuta, cronica e latente

dell'infezione tubercolare; vii) specifici miR sono correlati di protezione nella vaccinazione alla TB, con particolare attenzione per il BCG e i vaccini basati su Ag85B.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto mira a risolvere alcune criticità nel trattamento e nella diagnosi della TB. L'incapacità di distinguere in tempi rapidi tra una TB attiva e un'infezione latente e la mancanza di *biomarker* in grado di predire l'andamento della malattia e l'efficacia vaccinale e/o terapeutica, sono problematiche finora non risolte da *marker* puramente immunologici e/o microbiologici. Queste limitazioni potrebbero essere superate dall'utilizzo di specifici miR e/o di leptina per la loro natura di interfacciarsi contemporaneamente a diversi processi biologici. Inoltre, la leptina potrebbe rilevarsi un importante immunomodulatore sia dell'immunità innata, potenziando le capacità microbicide dei macrofagi, sia acquisita, attivando la Th1, che le consentirebbe un utilizzo terapeutico anche in soggetti malnutriti e in quelle situazioni dove la chemioterapia è fallimentare come in individui infettati con ceppi MDR o XDR. Tutto questo sarà di notevole beneficio per i pazienti con TB.

#### **Il ruolo del microbioma nelle infezioni opportunistiche sostenute da batteri resistenti agli antibiotici**

In Italia il 5-17% dei pazienti ospedalizzati acquisisce una infezione nosocomiale e il 3% ne muore. È dimostrato che prima di sviluppare una infezione grave, la maggior parte dei pazienti viene colonizzata a livello intestinale o nel cavo orale da batteri opportunisti multi-resistenti ma non sono noti i meccanismi e la dinamica di sviluppo di infezioni sistemiche gravi da parte dei batteri opportunisti in questi individui. Le popolazioni microbiche che colonizzano l'uomo a livello della mucosa orale e intestinale (microbioma) svolgono il ruolo fondamentale di barriera alla colonizzazione e infezione da parte degli opportunisti e la variabilità microbica è pesantemente influenzata dalle terapie antibiotiche. Per la sua complessità il microbioma non può essere studiato mediante le tradizionali tecniche colturali. È possibile calcolare la composizione dei microbiomi, mediante un approccio metagenomico basato sul sequenziamento delle varianti di 16S rRNA dell'intera popolazione microbica. Questo progetto si propone di valutare i cambiamenti dinamici del microbioma in pazienti ricoverati in reparti di terapia intensiva. Sarà possibile determinare i fattori predisponenti e che hanno influenzato la colonizzazione e l'insorgenza di infezione nosocomiale, l'effetto delle terapie e loro modalità di somministrazione sulle popolazioni microbiche endogene. I meccanismi di resistenza dei principali ceppi epidemici verranno identificati mediante approccio genomico.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Nei pazienti arruolati per lo studio verrà determinata la complessità microbica iniziale al momento del ricovero, le comunità batteriche dominanti instauratesi in seguito a trattamenti con antibiotici e la composizione del microbioma al momento dell'insorgenza di una infezione nosocomiale. Il progetto prevede inoltre l'analisi mediante sequenziamento dell'intero contenuto di geni di resistenza agli antibiotici (resistoma) e degli elementi genetici mobili (plasmidi, fagi, trasposoni) responsabili della loro diffusione e trasmissione inter- e intra-specifica (mobiloma).

Risultati attesi:

- Identificazione degli elementi genetici mobili responsabili della trasmissione orizzontale dei determinati di resistenza. In particolare, saranno considerate le seguenti tipologie batteriche: *Enterobacteriaceae* e *Acinetobacter baumannii* multi-resistenti, *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA), enterococchi resistenti alla vancomicina, *Clostridium difficile* resistente a macrolidi e fluoquinoloni.

- Misurazione della diversità batterica nei microbiomi delle vie aeree e dell'intestino in pazienti intubati ricoverati presso l'unità di terapia intensiva durante la terapia antimicrobica empirica (piperacillina/tazobactam/vancomicina e linezolid/meropenem).
- Conoscenza della dinamica della colonizzazione/infezione/circolazione/ trasmissione di cloni batterici multi-resistenti agli antibiotici di origine nosocomiale.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Dalla meta-analisi delle variazioni osservate nei microbiomi e dallo studio dei singoli casi clinici sarà possibile determinare i fattori che influenzano la colonizzazione e l'insorgenza di infezioni nosocomiali, il ruolo della complessità microbica nella protezione dell'individuo dalla progressione dell'infezione, l'effetto delle terapie e loro modalità di somministrazione sulle popolazioni microbiche endogene.

Questi studi suggeriranno protocolli terapeutici per il miglioramento del trattamento di pazienti a rischio di infezione nosocomiale, per la prevenzione di infezioni sistemiche gravi in pazienti immunocompromessi e per un uso corretto e prudente degli antibiotici in ambito ospedaliero.

#### **Immunità e protezione nella tubercolosi: caratterizzazione e regolazione delle risposte vaccinali all'antigene 85B e impatto della vaccinazione anti-HIV sull'andamento dell'infezione da *Mycobacterium tuberculosis***

La realizzazione di vaccini efficaci verso la TB è limitata dalla duplice natura della risposta Th1, al tempo stesso protettiva e deleteria, e dalla sua mutevolezza durante il processo infettivo. Lo studio identificherà i meccanismi di regolazione, dovuti a componenti di *M. tuberculosis* e/o fattori della risposta immunitaria dell'ospite, che modificano la risposta Th1 durante il progredire dell'infezione. Sarà utilizzato l'antigene di Mtb Ag85B candidato principale per nuovi vaccini a sub-unità. Inoltre, poiché l'immunità dell'ospite verso ogni singolo agente è alterata nelle coinfezioni, investigheremo gli effetti di alcune proteine di HIV, principale coinfezione nella TB, sull'immunità e sull'andamento dell'infezione tubercolare. Useremo tat, env e nef, proteine utilizzate nella vaccinazione AIDS e rilasciate da HIV in corso d'infezione. Utilizzando modelli sperimentali di TB, valuteremo in topi (*wild type*, difettivi per specifici geni o depleti di alcuni *subset* immunitari), opportunamente immunizzati (BCG, vari antigeni di Mtb, adiuvanti, immunomodulatori), trattati con proteine di HIV, l'andamento dell'infezione misurando, nel polmone e nella milza, carica batterica e danno tissutale a vari tempi. Questo sarà associato alla caratterizzazione, a livello fenotipico e funzionale, della risposta immunitaria, innata e acquisita. I meccanismi molecolari e cellulari di induzione e di regolazione della risposta T memory saranno studiati *in vivo* ed *ex vivo*.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Identificheremo e caratterizzeremo, a livello sistemico e polmonare:

- l'evoluzione e/o involuzione, in termini di protezione, delle risposte Th1 e Th17/22 specifiche per Ag85A, Ag85B e PstS1 nelle fasi acute e croniche d'infezione;
- il ruolo e i meccanismi molecolari con cui cellule B, citochine, chemochine, molecole co-stimolatorie (e.g. 4-1BB, PDL-2), sottopopolazioni di cellule dendritiche, cellule T CD8, regolano il priming/induzione e/o la fase effettrice di memoria della risposta Th1 e Th17/22 protettiva e non protettiva specifica per Ag85B;
- gli epitopi di Ag85B associati con la protezione e quelli che inducono risposte non-protettive;
- nuovi adiuvanti sistemici e mucosali, e immunomodulatori che potenziano la risposta protettiva Ag85B-specifica;

- la capacità di antigeni di Mtb (e.g. PstS1) di attivare le funzioni di presentazione antigenica nelle varie sottopopolazioni di cellule dendritiche;
- i meccanismi con cui l'antigene PstS-1 induce e modula la risposta *memory* Th1 e Th17/22 non-antigene relata;
- il ruolo che le proteine tat, env e nef di HIV hanno sulla modulazione della risposta immune anti-Mtb specifica e sull'andamento dell'infezione da Mtb in topi vaccinati e non con BCG;
- l'influenza dell'infezione da Mtb e/o della vaccinazione con BCG sulla risposta umorale e cellulo-mediata indotta dalla vaccinazione AIDS con tat, env e nef.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto implementerà conoscenze utili nella vaccinazione e immunoterapia della TB: i) identificando correlati di protezione vaccinale ancora scarsamente definiti; ii) individuando nuovi target immunoterapeutici in grado di aumentare e mantenere nel tempo la risposta Th1 protettiva e/o in grado di de-regolare le risposte Th1 e Th17/22 che contribuiscono alla patologia; iii) identificando nuovi adiuvanti, immunomodulatori e protocolli di immunizzazione utili allo sviluppo di nuovi vaccini a sub-unità con Ag85B.

Inoltre, il progetto sarà di grosso impatto per lo sviluppo di nuove strategie preventive e terapeutiche delle coinfezioni Mtb/HIV indicando la possibilità di utilizzo dei vaccini anti-HIV in pazienti con TB o in soggetti vaccinati con BCG. Aspetto di estremo interesse considerando che TB e AIDS sono endemiche nelle stesse aree geografiche.

Tutto questo sarà di notevole beneficio per il controllo dell'infezione tubercolare e migliorerà la qualità dell'SSN.

#### **Impatto di modificazioni post-traduzionali della beta 2 glicoproteina I sull'omeostasi delle cellule immunitarie ed endoteliali: possibili implicazioni nella patogenesi della preclampsia**

La preclampsia è una sindrome che si può manifestare durante la gravidanza e mettere a repentaglio la vita della madre e del nascituro. Si manifesta con una condizione d'ipertensione e proteinuria ed è caratterizzata da disfunzione endoteliale e attivazione del sistema immunitario. La causa della preclampsia non è stata ancora chiarita. I classici fattori di rischio cardiovascolare sono associati alla preclampsia. Diversi studi hanno mostrato una forte associazione tra preclampsia e sindrome antifosfolipidica (APS). Inoltre una maggiore incidenza di preclampsia è stata rilevata in donne sane con elevato titolo di anticorpi per la beta 2-glicoproteina I (b2GPI). Tale proteina rappresenta il principale bersaglio del sistema immunitario in soggetti con APS e aterosclerosi carotidea. Modificazioni post-traduzionali dovute a processi ossidativi e/o di glicazione rendono tale molecola altamente immunogenica (Buttari *et al.*, 2011). Il progetto si propone di studiare, in distinte categorie di donne in gravidanza (donne con e senza APS stratificate per la presenza o assenza di alterazioni del metabolismo del glucosio), la presenza di modificazioni post-traduzionali della beta2GPI (glicazione e ossidazione) in associazione al profilo pro-infiammatorio ematico. Il progetto si avvarrà di approcci sperimentali *in vitro* e *in vivo* su modelli animali al fine di ottenere una migliore comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari alla base della preclampsia.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto si propone di identificare fattori in grado di attivare meccanismi immunologici e vascolari rilevanti nello sviluppo della preclampsia. I risultati attesi hanno la potenzialità di mettere a punto nuovi strumenti diagnostici per identificare donne in gravidanza ad elevato rischio di sviluppare la preclampsia e nuove strategie terapeutiche specifiche per le diverse categorie di pazienti. Gli studi *in vitro* e *in vivo* sul modello animale di preclampsia sono

stati progettati per chiarire i meccanismi molecolari attivati dalla b2GPI, dalle sue forme modificate e/o dagli autoanticorpi specifici per la b2GPI in distinte popolazioni cellulari (cellule endoteliali, cellule della immunità innata e adattativa). In particolare, i risultati prodotti saranno relativi alla caratterizzazione fenotipica e funzionale delle popolazioni cellulari studiate e fortemente coinvolte nello sviluppo e progressione della preclampsia, un campo di ricerca ancora fortemente mancante di informazioni.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto si propone di identificare strumenti diagnostici da trasferire nella pratica clinica di routine, non solo per identificare soggetti a rischio di sviluppare la preclampsia ma anche per monitorare l'efficacia delle terapie. La comprensione dei meccanismi molecolari e cellulari alla base della preclampsia aiuteranno ad identificare nuove strategie terapeutiche che contribuiranno a ridurre i costi della sanità pubblica, la morbilità e mortalità nella popolazione ad elevato rischio. Inoltre, la comprensione di tali meccanismi permetterà di migliorare la prevenzione della malattia cardiovascolare in donne con storia pregressa di preclampsia mediante opportuni trattamenti farmacologici. Il progetto si propone di produrre materiali, reagenti e protocolli innovativi che saranno trasferiti al sistema sanitario nazionale anche attraverso la produzione di brevetti e la formazione di studenti universitari e post-universitari.

### **Individuazione di indicatori di processo e di outcome nell'intervento di *counselling* telefonico mirato alla prevenzione delle infezioni sessualmente trasmesse**

Negli ultimi decenni si è assistito ad un consolidamento delle attività di *counselling* rivolte a prevenire la diffusione delle Infezioni Sessualmente Trasmesse (IST, o *Sexually Transmitted Infections*, STI), a migliorare la qualità di vita delle persone che ne sono coinvolte, a potenziare la performance comunicativo-relazionale degli operatori sociosanitari. A fronte di un'ampia diffusione degli interventi di *counselling* nell'area sanitaria, la realtà scientifica italiana non è stata in grado di fornire una definizione operativa e univoca del processo di *counselling* e di consentire l'individuazione di indicatori per la valutazione dello stesso. Sulla base dei risultati della ricerca "Valutazione di un intervento di HIV/AIDS *counselling* rivolto a cittadini stranieri" promossa e finanziata dal Ministero della Salute negli anni 2005-2008, è stato possibile individuare indicatori di struttura, di processo e di risultato sperimentati nella valutazione dell'HIV/AIDS *counselling* rivolto ai migranti.

Il presente Progetto intende proseguire ed estendere il lavoro iniziato precedentemente, al fine di costruire un sistema di valutazione dell'intervento di *counselling* telefonico nell'ambito delle IST. Sistema di indicatori, disegnati e costruiti *ad hoc*, che consenta di analizzare l'efficacia di tale intervento. Il Progetto si avvale della collaborazione di 23 AIDS *Helpline*, aderenti alla Re.Te.AIDS, Network di esperti sull'HIV/AIDS *counselling* telefonico coordinata dall'ISS.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I principali risultati riguarderanno i seguenti punti:

- fornire una valutazione di efficacia della metodologia dell'HIV/AIDS/IST *counselling* telefonico;
- condividere la metodologia dell'intervento di HIV/AIDS/IST *counselling* telefonico in tutti i Servizi telefonici aderenti alla Re.Te.AIDS;
- applicare un modello di intervento standardizzato di HIV/AIDS/IST *counselling* in tutti i Servizi aderenti alla Re.Te.AIDS;

- mettere a punto e applicare sistematicamente la valutazione dell'intervento di HIV/AIDS/IST *counselling* telefonico nei Servizi aderenti alla Re.Te.AIDS;
- applicare uno specifico sistema di valutazione dell'intervento di HIV/AIDS/IST *counselling* telefonico a gruppi vulnerabili.

È anche prevista:

- la stesura di un Manuale con linee di indirizzo e strumenti applicativi dell'intervento di HIV/AIDS/IST *counselling* telefonico per gli operatori socio-sanitari del settore;
- la divulgazione dei risultati ottenuti e delle attività realizzate nell'ambito del Progetto attraverso la conduzione di workshop e seminari, nonché la stesura di documenti per i referenti istituzionali sanitari e i decisori politici.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Lo svolgimento del Progetto con il coinvolgimento della Re.Te.AIDS permetterà di ottenere risultati trasferibili non solo ad altre *Helpline*, ma consentirà anche di individuare strumenti applicabili in differenti tipologie di Servizi sanitari territoriali impegnati nella prevenzione, diagnosi e cura delle IST.

Inoltre, gli indicatori di processo e di outcome messi a punto per il *counselling* telefonico, potrebbero essere ricalibrati e sperimentati per la valutazione di interventi di *counselling vis à vis*.

#### **Innovative diagnosis of tuberculosis in HIV infected individuals**

La TB è causa di una elevata mortalità e morbilità in molte aree del mondo ma prevalentemente nelle aree in via di sviluppo e dove si concentra la coinfezione con l'HIV.

Fra vari limiti dei metodi diagnostici per la TB in corso di infezione da HIV c'è la difficoltà di usare i metodi basati sulla risposta immunitaria dell'ospite, dal momento che tale risposta risulta primariamente compromessa dall'infezione da HIV. Pertanto i test basati sul rilascio di interferone gamma (*Interferon Gamma Release Assay*, IGRA) e lo *skin test* non sono affidabili nei soggetti HIV positivi.

#### **Risultati attesi nel triennio**

In questi casi potrebbe essere utile un test basato sulla determinazione della presenza nei liquidi biologici di *biomarker* rilasciati dal patogeno, quali ESAT-6 e lipoarabinomannano. Tali metodi sono già stati valutati per la diagnosi di alcune malattie infettive, come l'epatite B (ricerca dell'antigene S) mentre per altri il problema è costituito dalla bassa concentrazione dei *biomarker* nei liquidi biologici. Ciò vale particolarmente per la TB in cui il batterio responsabile è a prevalente crescita intracellulare

Per tale motivo si propone di utilizzare delle nanoparticelle (0,5 micron) formate da un nucleo in idrogel con delle esche chimiche capaci di concentrare *biomarker* dai liquidi biologici in base alla natura del *biomarker* stesso. Una volta concentrati i *biomarker*, in termine di pochi minuti, potrebbero essere svelati con metodiche immunochimiche o con spettrometria di massa.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Risultati preliminari suggeriscono la fattibilità del progetto i cui risultati potrebbero essere facilmente trasferiti all'SSN.

#### **Interazione del *Mycobacterium tuberculosis* replicativo o dormiente con cellule umane come modello pre-clinico per l'identificazione di nuovi target di intervento immunologico contro la tubercolosi**

Il *Mycobacterium tuberculosis* ha evoluto una serie di strategie per evadere il sistema immunitario dell'ospite e causare la TB. Un meccanismo essenziale di immuno-evasione

dell'Mtb è la sua capacità di passare ad uno stato non-replicativo definito "dormienza" che causa un'infezione tubercolare latente. Poco si sa sull'immunologia dell'infezione tubercolare latente e della riattivazione della TB.

Questo progetto comparerà le diverse perturbazioni che il Mtb dormiente e replicativo inducono nelle cellule dell'ospite in termini di modulazione di microRNA, presentazione antigenica, rilascio di marcatori immunologici e diverso repertorio antigenico riconosciuto da cellule T.

Il progetto si suddivide in tre principali attività:

- Preparazione di Mtb replicativo e dormiente.
- Studio dell'interazione ospite-parassita in termini di internalizzazione e compartimentalizzazione intracellulare dell'Mtb replicativo e dormiente in diversi tipi cellulari. La capacità di cellule fagocitiche di processare e presentare antigeni derivati dall'internalizzazione dell'Mtb e la risposta immunitaria T specifica ad entrambe le forme di batterio verrà valutata. Mediatori dell'infiammazione rilasciati dalle cellule infettate saranno misurati.
- Studio del ruolo regolatorio di microRNA in diversi tipi cellulari infettati con entrambe le forme di Mtb: valutazione del profilo di espressione di miRNA in cellule infettate e analisi della rilevanza immunologica di miRNA chiave.

### **Risultati attesi nel triennio**

Con questo progetto crediamo di poter rispondere a molte delle domande ancora irrisolte nel campo dell'immunologia della TB e in particolare riguardo i meccanismi immunologici attivi durante l'infezione tubercolare latente e che prevengono la riattivazione. Ci aspettiamo di identificare la strategia messa in atto dal Mtb per colonizzare compartimenti intracellulari nei quali possa mantenere lo stato non-replicativo, da una parte, e la risposta cellulare al Mtb dormiente in termini di capacità di uccidere o di mantenere lo stato non-replicativo, dall'altra. Il progetto proposto potrebbe portare all'identificazione di antigeni, micobatterici o *self*, che possano discriminare l'Mtb replicativo da quello dormiente. Con il presente lavoro ci aspettiamo di fornire informazioni importanti riguardo il rilascio di segnali di pericolo da parte di cellule infettate con le due forme di batteri. L'identificazione di diversi antigeni, compartimentalizzazione e segnali di pericolo rilasciati da cellule infettate è essenziale nel disegno di nuovi vaccini efficaci contro la TB. L'impatto medico di questo progetto quindi risiede nel suo contributo verso più efficaci disegni vaccinali e strumenti clinico-diagnostici per la diagnosi di TB e/o per il controllo dell'efficacia di farmaci.

### **Trasferibilità dei risultati**

L'identificazione di antigeni specificatamente prodotti durante la dormienza fornirà un valido strumento per l'immunoterapia innovativa. I risultati generati avranno un grande impatto strategico e capacità di attrazione sul mercato di riferimento, rendendo realistica una rapida trasferibilità dei risultati all'assistenza sanitaria.

La disponibilità di test *in vitro* basati sul riconoscimento di antigeni collegati alla dormienza da parte di linfociti di pazienti rappresenterà un valido strumento per la diagnosi e l'identificazione dello stadio di TB. In aggiunta, l'identificazione di segnali di pericolo specifici per le cellule infettate con l'Mtb replicativo o non-replicativo, ad esempio citochine e miRNA, potrebbe incrementare il potere diagnostico di questi bio-marcatori sierologici. In ultimo, le differenti risposte ad antigeni isolati dall'Mtb replicativo e dormiente potrebbero rappresentare un valido correlato di protezione per la valutazione di *trial* vaccinali contro la TB.

### **La prevenzione dell'infezione da HIV e delle IST attraverso l'intervento di *counselling* telefonico fornito dal Servizio nazionale telefono verde AIDS e IST dell'unità operativa**

Il Progetto prevede il supporto dell'ISS alle iniziative di comunicazione realizzate dal Ministero della Salute in tema di prevenzione dell'infezione da HIV e delle IST attraverso l'intervento di *counselling* telefonico erogato dal "Telefono Verde AIDS e IST" – 800 861061 (TV AIDS/IST). Tale Servizio, che si colloca all'interno dell'UO Ricerca psico-socio-comportamentale, comunicazione, formazione del Dipartimento MIPI dell'ISS, si avvale di ricercatori esperti sia nei contenuti tecnico-scientifici che in quelli comunicativo-relazionali, nonché di collaboratori tecnici di ricerca che supportano le diverse attività del TV AIDS/IST.

Obiettivo è amplificare e ottimizzare gli interventi di prevenzione dell'infezione da HIV e delle IST, integrando le Campagne informativo-educative del Ministero della Salute con differenti strumenti comunicativi, in particolare, attraverso il contributo specifico rappresentato dall'attività di *counselling* telefonico svolta dal Servizio TV AIDS/IST dell'ISS.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati conseguiti potranno consentire di implementare una strategia comunicativa integrata per la prevenzione dell'infezione da HIV e delle IST che possa coniugare un'informazione generalizzata (Campagne informativo-educative del Ministero della Salute) con una personalizzata, mirata al singolo per fornire risposte individualizzate (*counselling* telefonico).

Inoltre, nell'ambito del Progetto è previsto anche il raggiungimento dei seguenti risultati:

- aggiornamento e supervisione degli esperti del Servizio;
- definizione delle caratteristiche delle persone-utenti (bisogni informativi, profili anagrafici, aspetti comportamentali, ecc.) che telefonano al Servizio;
- monitoraggio del gradimento del Servizio da parte delle persone-utenti;
- individuazione dei bisogni informativi dei diversi target che accedono al TV AIDS/IST al fine di fornire indicazioni per le future Campagne informativo-educative del Ministero della Salute.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La collaborazione tra i ricercatori dell'UO Ricerca psico-socio-comportamentale, comunicazione, formazione del Dipartimento MIPI dell'ISS con gli esperti di comunicazione del Ministero della Salute consentirà di mettere a punto un modello di intervento condiviso e integrato relativamente all'attivazione di efficaci processi di informazione scientifica su tematiche di salute. Tali programmi informativi potranno essere applicati in differenti ambiti, non necessariamente legati alle malattie infettive, ma che implicino i comportamenti volontari del singolo individuo. Tali ambiti potrebbero, ad esempio, essere l'abuso di alcol, tabagismo, tossicodipendenza, comportamenti alimentari.

### **Linfociti LAP positivi nella colite ulcerosa: studio di prevalenza e funzioni**

Le IBD sono caratterizzate dalla rottura dell'omeostasi mucosale verso i batteri del microbioma. Le cellule T regolatorie in grado di controllare l'omeostasi intestinale sono classificate come: Treg (cellule CD25+Foxp3+), Tr1 (producenti IL-10 e TGF-beta) e Th-3 (producenti TGF-beta). Le cellule LAP+ sfuggono a questa classificazione, esprimono sulla loro superficie il TGF-beta in forma latente e sono per la maggior parte FOXp3 negative. Studi effettuati in coliti sperimentali hanno evidenziato il ruolo regolatorio delle cellule CD4+LAP+ che svolgerebbero la loro azione regolatoria anche in condizione di infiammazione acuta dove

le Treg CD25+Foxp3+ risultano insufficienti, nonostante l'aumento del loro numero, a controllare l'infiammazione. Recentemente è stato descritto un aumento della popolazione Th17, sia nel morbo di Crohn che nella colite ulcerosa. Studi recenti, effettuati sia in modelli sperimentali murini che nell'uomo, hanno evidenziato una elevata plasticità della popolazione Th17, le cellule Th-17 potrebbero essere precursori di cellule produttrici IFN-gamma e a loro volta derivare da cellule regolatorie Foxp3+. Scopo del progetto è quello di valutare la prevalenza delle cellule LAP+ nelle IBD, di analizzare la loro capacità regolatoria e le citochine prodotte con particolare riferimento alla produzione di IL-17 e di studiarne le variazioni funzionali associate alla produzione di diversi tipi di citochine.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Studi preliminari hanno evidenziato, nella colite ulcerosa, un'espansione selettiva di linfociti T CD4+ LAP+ rispetto al morbo di Crohn dove si osservano valori paragonabili ai controlli non infiammati.

Ci proponiamo quindi di caratterizzare la popolazione LAP+ nella colite ulcerosa in base alla produzione delle diverse citochine con particolare attenzione alla produzione di IL-17 e IFN-gamma.

Ci proponiamo inoltre di studiare, dal punto di vista funzionale, la capacità regolatoria di queste cellule e quanto questa capacità sia influenzata dalle citochine prodotte.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati di questo studio permetteranno una migliore comprensione dei meccanismi regolatori mucosali operanti nei pazienti con colite ulcerosa con conseguenti approcci terapeutici mirati.

### **L'iper-invasività di *Neisseria meningitidis* correla con un maggiore attraversamento della barriera emato-encefalica umana?**

Scopo dello studio è analizzare l'interazione di ceppi di *Neisseria meningitidis* iperinvasivi o isolati da *carrier* con la barriera emato-encefalica umana per identificare *target* specifici associati a virulenza correlati ad un aumentato passaggio della barriera emato-encefalica e nuovi strumenti per la prevenzione e il trattamento delle meningite da meningococco.

Il disegno dello studio prevede d'infettare cellule endoteliali umane dei vasi sanguigni cerebrali (HBMVE) con ceppi di meningococco isolati da pazienti con meningite, sepsi o da portatori sani. L'espressione di molecole d'adesione, di recettori per chemochine coinvolti nella migrazione dei leucociti attraverso la barriera emato-encefalica e di recettori che riconoscono componenti batterici saranno analizzati mediante citofluorimetria a flusso o western blotting. Per verificare se l'infezione da parte dei suddetti ceppi possa alterare l'organizzazione delle giunzioni intercellulari di tipo ocludente della barriera emato-encefalica, verrà utilizzato un modello di monostrato di cellule HBMVE *in vitro* e studi d'immunofluorescenza valuteranno l'espressione e la distribuzione di proteine giunzionali.

Sarà valutata la capacità dei vari ceppi di attraversare la barriera emato-encefalica in saggi di permeabilità con il modello di monostrato di cellule HBMVE e tramite conta delle unità formante colonia (*Colony Forming Unit*, CFU).

Un'analisi tramite *real time* PCR valuterà la modulazione di proteine dei vari ceppi coinvolte nell'adesione batterica alle cellule HBMVE.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Identificazione di *target* associati a virulenza correlati ad un'aumentata invasione della barriera emato-encefalica.

- Validazione di un modello pre-clinico *in vitro* basato su un monostrato di cellule HBMVE studiare l'espressione e la distribuzione di proteine delle giunzioni intercellulari di tipo occludente.
- Identificazione di proteine batteriche coinvolte nell'adesione alla barriera emato-encefalica che potrebbero essere modulate diversamente nei ceppi iper-invasivi o isolati da *carrier*.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questo studio aumenterà le nostre conoscenze sull'interazione ospite-patogeno responsabile delle infezioni meningococciche. Gli approcci utilizzati costituiranno una valida piattaforma pre-clinica per la valutazione di nuovi strumenti d'intervento terapeutico per limitare l'invasività di *Neisseria meningitidis*.

La diffusione dei risultati avverrà attraverso i canali standard come la pubblicazione su riviste internazionali di forte impatto, l'invio di abstract a congressi nazionali e internazionali.

#### **Membrane dynamics of Plasmodium sexual stages as potential target of malaria transmission blocking intervention**

La malaria, causata dal protozoo parassita del genere Plasmodio, rappresenta uno dei più gravi problemi sanitari ed economici a livello globale. Ad oggi più di 250 milioni di persone nei Paesi in via di sviluppo contraggono questa malattia che determina circa un milione di morti l'anno, soprattutto tra i bambini sotto i cinque anni. L'assenza di un vaccino efficace e la rapida insorgenza di ceppi di Plasmodio resistenti ai farmaci di prima linea rende prioritaria l'identificazione di nuove molecole target per il disegno di strategie di intervento farmacologico e/o vaccinale. La maggior parte dei farmaci disponibili agiscono sulle forme asexuate del parassita che si sviluppano e replicano all'interno dei globuli rossi dell'ospite vertebrato, mentre sono completamente inefficaci sulle forme sessuate (gametociti) che sono responsabili della trasmissione del parassita all'ospite vettore, la zanzara del genere *Anopheles*. Questo progetto analizzerà con gli strumenti della genomica funzionale, molecole e processi cellulari che portano alla maturazione dei gameti e alla loro fertilizzazione. Dati di proteomica, trascrittomica e genetica inversa saranno integrati con network metabolici prodotti in collaborazione con il partner degli Stati Uniti, la *Princeton University*.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto si propone di studiare l'organizzazione, la dinamica e le interazioni molecolari di comparti membranosi specifici del gametocita del parassita umano *P. falciparum* e del modello murino *P. berghei*. In particolare saranno caratterizzati:

- I corpi osmiofilici che sono organelli secretori coinvolti nella fuoriuscita dei gameti dall'eritrocita ospite. Questo processo denominato "emergenza" precede la fertilizzazione ed è cruciale per il successivo sviluppo del parassita nella zanzara.
- Proteine associate ai *lipid raft* delle forme sessuali mature. Questi sono microdomini di membrana coinvolti in processi cellulari fondamentali come la fusione di membrane, il *sorting* di proteine e la trasduzione del segnale.

Nel corso del progetto saranno raggiunti i seguenti risultati sperimentali:

- Identificazione dei lipidi e delle proteine che compongono i microdomini di membrana dei gametociti di Plasmodio.
- Descrizione della dinamica e composizione dei microdomini attraverso l'integrazione dei dati di genomica funzionale e proteomica.
- Identificazione di molecole coinvolte nell'emergenza dei gameti e loro localizzazione.

- Identificazione di component dei corpi osmiofilici utilizzando inibitori di enzimi coinvolti nella biosintesi dei lipidi e analisi NMR.
- Costruzione e analisi di network di interazione degli stadi sessuali del parassita.
- Analisi comparative di *pathway* metabolici degli stadi asessuali e sessuali del parassita.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Gli stadi sessuali del Plasmodio della malaria rappresentano un target ideale per il disegno di strategie di intervento che limitino la trasmissione del parassita e riducano la diffusione della farmaco-resistenza. Lo studio sistematico di comparti membranosi specifici dei gametociti di Plasmodio coinvolti nel processo di gametogenesi e fertilizzazione e l'uso di inibitori di *pathway* selezionati permetterà di identificare e validare nuovi potenziali bersagli farmacologici e/o vaccinali.

#### **Messa a punto di metodi per la tipizzazione molecolare delle leptospire**

La leptospirosi è una malattia infettiva acuta sistemica di tipo vasculitico, causata da spirochete del genere *Leptospira*. Si conoscono più di 200 diversi sierotipi (*serovar*) patogeni raggruppate sotto la singola specie *Leptospira interrogans*. Il sierotipo più virulento e più spesso patogeno è il serovar *icterohaemorrhagiae*, ma sono comuni anche i sierotipi *canicola*, *hardjo*, *hebdomadis*, *grippotyphosa* e *pomona*. Esistono almeno 60 sierotipi di leptospire saprofitiche non patogene che vivono libere nelle acque, raccolte sotto la specie *L. biflexa*. La loro presenza nelle acque non è pericolosa di per sé, ma è segno di possibile contaminazione da parte delle leptospire patogene. È presente presso l'ISS-MIPI il Centro di riferimento nazionale per la leptospirosi umana dove nel corso dei vari anni sono stati conservati più di 1.000 ceppi batterici di *Leptospira* catalogati per *serovar* ma non ancora caratterizzati a livello molecolare. Lo scopo del progetto sarà quello di caratterizzare la ceppoteca ed eventualmente ricatalogare i ceppi batterici in base alle nuove evidenze molecolari. Verranno proposti metodi di tipizzazione avanzate quali MLST, *Variable-Number Tandem Repeat Analysis* (VNTR) e *high-resolution melting curve analysis* (HRM).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Saranno valutate le metodiche di tipizzazione con metodologia VNTR su piattaforma Bioanalyzer 2100 (Agilent), MLST su siti internet dedicati, e HRM su piattaforma LightCycler.

In particolare i risultati verranno estrapolati da:

- messa a punto di metodi di estrazione di DNA dagli isolati batterici;
- scelta di target genici e disegno di *primer*;
- valutazione della sensibilità, specificità e ripetibilità dei risultati
- elaborazione statistica dei dati per la valutazione della ripetibilità, riproducibilità e concordanza.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I metodi di tipizzazione molecolare permettono importanti osservazioni quali:

- origine clonale dei ceppi (se derivano da un organismo parentale);
- identificazione dei batteri a livello di ceppo;
- spiegazione di importanti caratteristiche fenotipiche dalla diversità genetica;
- identificare ceppi non correlati epidemiologicamente;
- identificare ceppi appartenenti a *outbreak*;
- identificare isolati con determinati criteri di selezione (particolari fattori di virulenza, particolari tratti di antibiotico-resistenza, ecc.).

L'applicazione della tipizzazione molecolare offre la possibilità di supportare le reti di sorveglianza e le indagini epidemiologiche su questi patogeni con notevole impatto e ricaduta sulla sanità pubblica.

### **Microarray, microRNA e virus dell'epatite. Resistenza alla terapia con IFN e identificazione di nuovi bersagli terapeutici**

L'infezione da virus dell'epatite C (HCV) è la causa principale di malattia epatica. La terapia con interferone è efficace solo nel 50% dei pazienti. La tecnologia del *microarray* ha evidenziato la complessità dei processi di resistenza virale all'IFN. Nei pazienti che non rispondono alla terapia, il virus attiva l'IFN endogeno ma l'espressione dei geni stimolati dall'IFN (ISG), ad azione anti-virale, è inefficace. La pre-attivazione dei geni ISG sembra quindi ostacolare la risposta alla terapia. In uno studio di *microarray* abbiamo identificato geni modulati dall'HCV, la cui funzione è importante sia per la resistenza virale all'IFN che per lo sviluppo di nuove terapie anti-virali. Il progetto prevede l'analisi dei geni ISG in sistemi cellulari di replicazione virale e in biopsie epatiche, da pazienti infetti, raccolte prima della terapia con IFN. Verrà inoltre esaminato il profilo di espressione di specifici microRNA implicati nella regolazione dei geni ISG. La disponibilità di un *pattern* di espressione completo (geni e microRNA) rappresenta un aspetto importante del progetto, il cui obiettivo finale è quello di identificare un set ottimale di marcatori molecolari con valore predittivo per la risposta alla terapia.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Sono previsti i seguenti risultati:

- Analisi globale dei cambiamenti indotti dall'HCV sul profilo di espressione dei geni e dei microRNA cellulari.
- Integrazione dei risultati di genomica ottenuti nel sistema cellulare e nei pazienti infetti.
- Classificazione ontologica dei geni e identificazione delle categorie funzionali rilevanti sia per la biologia del virus che per la terapia anti-virale.
- Deposizione di un brevetto relativo ai marcatori identificati con valore predittivo per la risposta alla terapia.
- Identificazione di molecole di RNA interferenti (siRNA) che, legandosi a specifici RNA messaggeri (quelli up-regolati dal virus) inibiscono l'espressione di geni necessari per la replicazione dell'HCV.
- Valutazione funzionale dei geni modulati quale punto di partenza per la selezione di nuove molecole ad azione anti-virali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'applicazione della tecnologia del *microarray* è potenzialmente utile per il rilevamento di marcatori biologici con valore predittivo per la risposta alla terapia. La successiva deposizione di un brevetto rappresenta il primo passo per lo sviluppo di un prodotto biotecnologico di sicura utilità nel settore sanitario.

L'analisi simultanea dell'espressione di migliaia di geni apre inoltre il campo ad una nuova e più complessa interpretazione dei fenomeni patologici coinvolti nell'epatite C.

L'impiego del *microarray* e il successivo allestimento di sistemi sperimentali per la valutazione funzionale dei geni modulati, può rappresentare un punto di partenza fondamentale per la selezione di nuove molecole ad azione anti-virale.

### **Modulazione di coliti sperimentali mediante l'uso di agenti biologici interferenti con il processo infiammatorio**

Obiettivo del progetto è la valutazione in modelli murini di colite sperimentale dell'effetto sull'infiammazione di trattamenti tendenti a potenziare l'attività di citochine regolatorie e ad inibire l'attività di citochine effettrici.

Programma di attività: i) sarà valutato l'effetto della somministrazione per via endovenosa, intrarettale e orale degli agenti biologici in studio sul decorso di coliti sperimentali acute, ricorrente e cronica; ii) successivamente, si valuterà la dose e la modalità di somministrazione degli agenti biologici in studio ottimali per il trasferimento del trattamento in pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali.

Metodi: i) induzione di colite: somministrazione intrarettale di TNBS o Oxazolone in dose singola o ripetuta associata o meno a presensibilizzazione cutanea. Induzione di colite mediante trasferimento in topi SCID di diverse sottopopolazioni linfocitarie. Induzione di colite mediante trattamento con somministrazione orale di DSS. ii) Produzione locale di citochine: ELISA su omogenato di tessuto. iii) Analisi delle sottopopolazioni linfocitarie: Citofluorimetria di superficie e intracitoplasmatica.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Validazione della somministrazione dei vari trattamenti in studio come modalità per indurre remissione clinica e istologica della colite.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Studio preclinico di efficacia propedeutico alla sperimentazione clinica in pazienti con morbo di Crohn e colite ulcerosa.

### **Neoplasie causate da HPV 16 in individui HIV positivi: sviluppo di un vaccino terapeutico contro le lesioni precancerose e cancerose di HPV16 basato su particelle lentivirali che incorporano gli antigeni tumorali E6 ed E7**

Gli HPV sono associati allo sviluppo di tumori ano-genitali, condividono con HIV sia i fattori di rischio che l'essere malattie sessualmente trasmesse. L'incidenza delle infezioni da HPV e dei tumori ad essi correlati è più alta nelle persone sieropositive per HIV (HIV+) rispetto alla popolazione generale. Donne HIV+ presentano con maggior frequenza lesioni cervicali dovute a papillomavirus. Tali lesioni progrediscono più rapidamente a carcinoma della cervice (CC) e sono resistenti ai trattamenti convenzionali. Per questi motivi il carcinoma invasivo della cervice è stata incluso tra le patologie che definiscono l'AIDS. I moderni trattamenti terapeutici per i pazienti con cancro cervicale sono la chirurgia, la chemioterapia e la radioterapia. Tali trattamenti nei sieropositivi e nei pazienti con AIDS danno scarsi risultati. Lo sviluppo di vaccini HPV terapeutici rimane di grande interesse soprattutto per un loro possibile impiego nei soggetti sieropositivi. I vaccini sono farmaci specifici, ben tollerati e hanno effetti a lungo termine. L'uso in combinazione di vaccini profilattici e terapeutici consentirebbe nelle persone HIV+ un controllo più efficiente sia delle infezioni da HPV che delle lesioni pre-cancerose e cancerose. Lo studio propone l'impiego di un vaccino anti-HPV innovativo basato su particelle lentivirali (VLP) contenenti elevati livelli di E6 e E7 fuse ad un mutante Nef di HIV-1.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Le proteine E6 e E7 di HPV sono antigeni tumorali (*Tumor Specific Antigen*, TSA) e antigeni per il rigetto del tumore, target ideali per un vaccino terapeutico. Tale mutante, usato come *carrier*, è incorporato in quantità elevate nelle VLP. È noto che particelle lentivirali sono in grado di indurre una risposta immunitaria di tipo Th1, quindi nel nostro

modello di studio verranno generate particelle lentivirali contenenti E7 e E6 e tali VLP ricombinanti verranno usate per indurre una immunità antitumorale nel modello tumorale murino HPV16. Le E6-E7 VLP verranno anche utilizzate per pulsare IFN-DC (Lapenta C, Santini S) per la valutazione di un loro possibile impiego nell'immunoterapia mediata da cellule dendritiche autologhe pulsate e prodotte *in vitro*.

Il nostro progetto prevede di:

- produrre VLP lentivirali contenenti E6 ed E7 HPV16;
- impiegare E6 ed E7-VLP come antigeni nel modello animale TC1 cellule di C57BL6 al fine di valutare la loro efficacia per indurre l'immunità anti-tumorale;
- analizzare le capacità di VLP-E6/E7 di indurre una risposta immunitaria proliferativa E7/E6 specifica in soggetti HIV+ e normali con diverse patologie correlate alle infezioni da HPV;
- valutare la capacità di IFN-DC, pulsate con VLP-E7 di indurre linfociti T effettori CD4 e CD8, *in vitro* e *in vivo* utilizzando il modello *human PBL/SCID mouse*.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Negli ultimi dieci anni sono stati prodotti diversi vaccini terapeutici basati sugli antigeni E6 ed E7. Per alcuni di essi sono in corso sperimentazioni ma nessun vaccino è stato ancora autorizzato per uso nell'uomo. Una ragione è che nella sperimentazione sull'uomo per la maggior parte dei sistemi si registra una scarsa induzione di cellule citotossiche, fatto che induce la comunità scientifica a sperimentare nuovi sistemi di *delivery*, adiuvanti e vettori genetici. I risultati ottenuti dal nostro progetto ci consentiranno di produrre particelle lentivirali prive di genoma contenenti gli antigeni tumorali di E7/E6 utili come vaccino terapeutico per l'immunoterapia delle lesioni causate da HPV16.

#### **Ng-MIP (*Neisseria gonorrhoeae*-Macrophage Infectivity Potentiator) e Ng-OMPA (*Neisseria gonorrhoeae*-Outer Membrane Protein A) come nuovi *target* contro le infezioni da ceppi di *N. gonorrhoeae* multi resistenti agli antibiotici**

Questo progetto nasce dalla necessità di investigare nuovi approcci per combattere le infezioni da gonorrea resistente o multi resistente ai farmaci. A tale scopo verranno studiate due proteine di gonococco, già riconosciute come importanti fattori di virulenza, MIP e OMPA.

I principali obiettivi della ricerca sono:

- valutare la conservazione, l'espressione e il *cross* riconoscimento di Ng-MIP e Ng-OMPA tra differenti ceppi di isolamento clinico resistenti o multi resistenti;
- stabilire la capacità di queste proteine di indurre anticorpi policlonali per valutare la capacità siero battericida *vs* ceppi resistenti;
- investigare la capacità delle due proteine di attivare cellule dendritiche umane e di indurre una risposta T specifica;
- valutare preliminarmente l'epitope *mapping*.

#### **Risultati attesi nel triennio**

La diffusione di ceppi resistenti a diversi antibiotici richiede la necessità di valutare nuovi approcci efficaci per combattere la malattia.

In particolare, i principali risultati che si intende raggiungere sono:

- identificare le principali varianti di Ng-MIP e Ng-OMPA tra i ceppi di collezione esaminati;
- valutare l'attività battericida di anticorpi policlonali;
- ottenere una struttura cristallografica delle due proteine;

- valutare la capacità di stimolare cellule dendritiche e la loro attività di presentazione dell'antigene;
- determinare l'epitope *mapping* di entrambe le proteine.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I dati che si otterranno dal presente progetto permetteranno di avere un aggiornamento relativo all'antibiotico suscettibilità dei ceppi di gonococco circolanti nel nostro Paese. Lo studio molecolare dei due *target* genici permetterà di individuare omologie di sequenza tra i ceppi analizzati. Inoltre, lo studio per valutare le capacità immunomodulatorie e immunogeniche delle due proteine, fornirà le informazioni preliminari per considerare i due *target* genici come potenziali candidati vaccinali contro la gonorrea.

### **Nuovi strumenti per la manipolazione di cellule del sistema immune per l'immunoterapia delle malattie virali e tumorali**

Finora approcci di immunoterapia con DC non hanno avuto gli esiti sperati e hanno evidenziato la necessità da un lato di sviluppare nuove strategie di terapia combinate e nello stesso tempo di ottimizzare la vaccinazione con DC. A tale riguardo l'uso di fattori immunostimolanti come citochine e molecole co-stimolatorie è uno degli approcci utilizzati per aumentare l'immunogenicità delle preparazioni vaccinali. Una famiglia di fattori di trascrizione IRF è in grado di modulare diverse funzioni immunologiche. Su tale base questi fattori possono costituire dei potenti adiuvanti per la formulazione sia di vaccini antitumorali che antinfettivi. Nostri studi indicano che sia il fattore IRF-1 che IRF-8 direttamente regolano il differenziamento e il potenziale tolerogenico sia delle DC che Treg. Inoltre IRF-1 si è dimostrato efficace in strategie vaccinali con antigeni specifici nell'aumentare sensibilmente sia la risposta Th1 che quella ciltotossica.

Obiettivo principale del progetto è pertanto quello di mettere a punto sistemi per l'ingegnerizzazione di cellule dendritiche e T regolatorie che esprimano fattori IRF o in cui tali fattori siano silenziati quale approccio per modulare le risposte immuni di tali popolazioni cellulari e ottenere una migliore presentazione dell'antigene ed evocare una più efficace e duratura risposta T e B e nello stesso tempo reprimere l'attività soppressoria delle cellule Tregolatorie

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- sviluppo di vettori lentivirali adatti ad esprimere IRF-1 e IRF-8 nelle cellule dendritiche e condizioni ottimali di infezione;
- definizione del fenotipo e attività delle cellule Dendritiche esprimenti IRF-1 e IRF-8;
- definizione del fenotipo e attività di cellule T regolatorie esprimenti IRF-1 e IRF-8;
- sviluppo di RNA interferenti in grado di silenziare l'espressione di IRF-1 e IRF-8;
- determinazione *in vivo* e *in vitro* della capacità delle cellule così ingegnerizzate di stimolare una risposta immune specifica dapprima verso antigeni modello e successivamente verso antigeni tumorali e virali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Gli studi proposti tendono ad ottimizzare l'attività immunostimolatoria di cellule del sistema immune ingegnerizzandole con due fattori di trascrizione con potente attività immunomodulatoria. Gli studi sulla funzionalità di IRF-1 e IRF-8 *in vitro* e *in vivo* in modelli sperimentali murini, costituisce la necessaria evidenza sperimentale per il loro uso, come adiuvanti nell'evocare una duratura risposta immune contro antigeni virali e tumorali.

I risultati e i prodotti ottenuti potranno portare all'identificazione di nuovi adiuvanti per la formulazione di vaccini efficaci.

## **Nuovi tool per la modulazione dello sviluppo di cellule T regolatorie e cellule Dendritiche tolerogeniche**

Le cellule Treg e DC tolerogeniche sono componenti essenziali della tolleranza immunologica. Le cellule Treg solo recentemente sono state riconsiderate come possibili strumenti terapeutici per il trattamento di un crescente numero di patologie umane anche su base infettiva. Finora le applicazioni terapeutiche di tali cellule sono state limitate sia dall'incapacità di definire la loro specificità antigenica sia dal limitato numero di Treg circolanti. Recentemente sono stati, sviluppati metodi per l'espansione policlonale e antigene specifica di tali cellule e gli studi sui meccanismi molecolari alla base del loro differenziamento e attività hanno aperto la strada per una loro manipolazione a scopi terapeutici. In questo contesto lo studio e la definizione dei meccanismi e dei fattori che intervengono nella generazione delle cellule Treg rappresenta l'indispensabile strumento per tale manipolazione. Nel nostro laboratorio sono stati identificati fattori cellulari in grado di regolare la trascrizione del promotore del *gene marker* di questa popolazione di cellule immunitarie, Foxp3. Principale obiettivo del presente progetto è quello di sviluppare approcci sperimentali in grado di modulare lo sviluppo e l'attività di cellule Treg attraverso antagonisti e/o RNA interferenti di molecole che hanno dimostrato un'attività inibitoria sulle T reg e le DC tolerogeniche, quali il fattore di trascrizione coinvolto nel *signaling* dell'Interferon, IRF-1.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Definizione dei livelli di espressione di IRF-1 in cellule CD4+CD25- isolate sia dal topo che da sangue periferico umano, e indotte a differenziare, *in vitro*, in cellule CD4+CD25<sup>high</sup>.
- Regolazione reciproca tra IRF-1 e foxp3, *gene master* nello sviluppo e attività di cellule T regolatorie.
- Verifica della possibilità di modulare *in vitro* il differenziamento di cellule dendritiche e cellule CD4+CD25- attraverso la stimolazione e/o repressione di geni specifici.
- Sviluppo e uso di siRNA diretti verso IRF-1 come possibile terapia cellulare sia per patologie autoimmuni che infettive.

### **Trasferibilità dei risultati**

È sempre più evidente che non solo una risposta immune inefficace, ma anche la presenza di cellule tolerogeniche reattive, possa essere responsabile di una mancata protezione contro agenti sia *self* che non *self*. L'uso di DC e Treg manipolate *in vitro* rappresenta uno strumento potenzialmente molto efficace per la terapia di diverse patologie e sperimentazioni cliniche sono già in atto. Gli studi proposti tendono a stabilire se il fattore di trascrizione IRF-1 possa essere efficacemente utilizzato come un bersaglio molecolare e strumento per modulare l'attività tolerogenica di cellule dendritiche e cellule T regolatorie. I risultati ottenuti permetteranno di sviluppare reagenti specifici quali ad esempio RNA interferenti in grado di reprimere un eccessivo o indesiderato sviluppo di cellule T reattive e/o cellule dendritiche immunogeniche favorendo allo stesso tempo lo sviluppo di una marcata risposta T soppressoria.

## **Ottimizzazione delle risposte immunitarie indotte da vaccinazione**

Un vaccino ottimale deve indurre una risposta immunologica antigene-specifica in grado di prevenire la malattia (vaccinazione preventiva) o di ridurne la diffusione (vaccinazione terapeutica). Per ottenere un vaccino efficace è necessario utilizzare protocolli di immunizzazione basati su strategie di *prime-boost* appropriate in grado di indurre una

risposta immunologica sia cellulare che anticorpale, nei vari distretti dell'organismo. Gli approcci vaccinali si basano sull'antigene di interesse somministrato con un adiuvante o mediante un sistema di veicolazione efficace, rappresentato da vettori ricombinanti virali o batterici. Il metodo di veicolazione dell'antigene e l'adiuvante definiscono qualitativamente e quantitativamente il livello di risposta immunologica indotta. In questo studio ci proponiamo di valutare l'efficacia di vaccini sia preventivi che terapeutici in modelli preclinici. Tali approcci saranno basati sulla somministrazione di un vettore lentivirale integrasi-difettivo (IDLV) esprimente l'antigene di interesse virale (HIV-Env, Influenza-M1), batterico (*Mycobacterium tuberculosis*) o tumorale (HPV-E7). IDLV verrà inoculato una sola volta da solo o in combinazione prime-boost con l'antigene in forma proteica insieme a un adiuvante. Le risposte immunologiche antigene-specifiche indotte a livello sistemico e mucosale verranno dettagliatamente analizzate al fine di disegnare una efficace strategia vaccinale da testare nell'uomo.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Abbiamo recentemente dimostrato che IDLV è un ottimo sistema di veicolazione dell'antigene, in grado di indurre una forte e persistente risposta immunitaria antigene-specifica a livello sistemico, in seguito a una singola somministrazione per via intramuscolare. In particolare, l'inoculo del vettore determina la comparsa di un alto numero di linfociti effettori CD8+ antigene-specifici. Ci aspettiamo che IDLV sia capace di indurre una risposta cellulare anche a livello dei distretti mucosali. Per ottimizzare la produzione di anticorpi diretti verso l'antigene di interesse, l'immunizzazione con IDLV sarà seguita da una o più immunizzazioni (*boost*) con l'antigene in forma proteica insieme a un adiuvante appropriato. Ci aspettiamo che tale strategia vaccinale sia in grado di ottimizzare le risposte sia cellulari che anticorpali indotte.

La forte induzione di linfociti CD8 citotossici verrà sfruttata per controllare la crescita tumorale in un modello di tumore murino. Ci aspettiamo che una singola vaccinazione terapeutica in topi che presentano una massa tumorale avanzata sia in grado di bloccare o controllarne la crescita. In modelli di tumore molto aggressivi prevediamo che l'utilizzo combinato di una terapia farmacologica con chemioterapici e la vaccinazione terapeutica con IDLV possano portare a forte controllo o addirittura eradicazione del tumore sperimentale.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati di questo studio saranno fondamentali per capire il livello di efficacia di un vaccino preventivo o terapeutico basato sull'utilizzo di IDLV in modelli preclinici di infezione o di crescita tumorale. I dati ottenuti in questo studio saranno utili per una eventuale traslazione al modello umano.

### **Peptide da polline di *Parietaria judaica* con attività antimicrobica come nuovo strumento terapeutico: valutazione dell'interazione con il sistema immunitario**

La progressiva diffusione di microbi resistenti agli antibiotici normalmente utilizzati ha stimolato lo sviluppo e lo studio di nuove molecole con una migliore efficacia terapeutica.

Diverse proteine in grado di legare componenti della parete batterica sono riportate in letteratura. Spesso contengono aminoacidi a carica positiva (da qui il termine proteine cationiche). Tra queste le proteine non specifiche per il trasferimento dei lipidi (ns-LTP) sono piccole molecole di circa 10 kDa presenti in tutti gli organismi vegetali. Studi recenti hanno dimostrato che sono in grado di agire come peptidi con attività antimicrobica.

La tecnologia del DNA ricombinante ci ha permesso di isolare una ns-LTP (Parj1.01) da *Parietaria judaica* che presenta un peptide di 37-aminoacidi carbossi-terminali (Par37) con proprietà cationiche e antimicrobiche.

In questo progetto, Par37 sarà caratterizzato per quanto riguarda le sue proprietà antimicrobiche e il suo impatto sul sistema immunitario. Valuteremo la capacità di modulare i segnali infiammatori anche contro gli agenti patogeni infettivi. In particolare, valuteremo come Par37 può influire sulle funzioni principali del sistema immunitario innato, come la modulazione della maturazione e l'attivazione delle DC e la risposta di cellule NK, T e B contro le infezioni. Verranno inoltre valutate le capacità terapeutiche di Par37 mettendo a punto appropriati modelli animali di malattie infettive.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Le endotossine sono le principali responsabili per la patogenesi della sepsi, shock settico e l'insufficienza multi organo (*Multi Organ Failure*, MOF). In presenza di endotossine nel sangue, si innesca una complessa attivazione immunobiologica che comporta una serie di mediatori, principalmente liberati dall'attivazione dei macrofagi, monociti e altre cellule. Finché l'endotossina continua a stimolare il meccanismo sopra descritto, con conseguente attivazione della risposta infiammatoria, c'è il rischio di degenerare in un processo settico. Da qui la necessità, per il trattamento della sepsi, di rimuovere e/o disattivare le endotossine dal corpo del paziente prima che la malattia degeneri. Con questo studio, ci aspettiamo che la rimodulazione della risposta all'endotossina LPS dei componenti principali del sistema immunitario in presenza di Par37 in termini di produzione di fattori infiammatori e di fenotipo. Inoltre, valuteremo se il Par 37 si lega direttamente a LPS o può interagire con i PRR presenti sulle cellule del sistema immunitario. Nel primo caso, Par 37 potrà essere utilizzato per rimuovere le endotossine nelle applicazioni *in vivo* quali la terapia genica o nelle preparazioni farmaceutiche al fine di prevenire le reazioni infiammatorie.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Alcuni funghi e batteri sono importanti agenti patogeni in ospiti con diversi fattori di rischio, come pazienti affetti da tumore, sottoposti a trapianto (es. trapianto di cellule staminali) o pazienti HIV.

I risultati degli studi su Par37 sulla risposta immunitaria aiuteranno nella progettazione e valutazione di innovativi strumenti terapeutici. Se i nostri studi saranno in grado di confermare l'efficacia di Par37 come antimicrobico, potrà essere potenzialmente applicato nella configurazione di un nuovo pannello di prodotti farmaceutici che può sfuggire alla crescente farmacoresistenza, sia influenzando la risposta immunitaria sia agendo sulla rimozione o nella disattivazione dell'endotossina LPS per prevenire o curare lo shock settico o reazioni infiammatorie. Infine, modelli animali di malattie infettive e croniche possono fornire informazioni nella valutazione preclinica di nuovi antimicrobici e approcci immunomodulatori, prima della loro applicazione negli studi clinici.

### **Potenzialità terapeutiche degli oli essenziali, anche in fase vapore, nella lotta alle infezioni batteriche e micotiche e all'antibioticoresistenza**

L'emergenza di agenti microbici sempre nuovi e aggressivi, l'estensione e l'aggravamento del fenomeno dell'antibioticoresistenza, nonché la carenza di nuovi farmaci anti-infettivi richiedono nuove capacità d'intervento, miglioramento delle diagnosi e soprattutto nuove soluzioni terapeutiche. Per quest'ultimo aspetto e sulla base dei promettenti risultati già ottenuti, viene proposta una linea di ricerca sull'attività antimicrobica *in vitro* e *in vivo* di oli essenziali e dei loro principali costituenti nei confronti di microrganismi opportunisti patogeni per l'uomo. Queste sostanze potranno essere utilizzate come nuovi approcci terapeutici e/o preventivi nella lotta alle infezioni fungine opportunistiche (*Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus*) e batteriche, con particolare riguardo ad alcune fra quelle che presentano problemi di trattamento con farmaci attualmente in uso,

in particolare le infezioni causate da (*Staphylococcus aureus*, *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* – MRSA, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* vancomicina-resistente, *Legionella pneumophila* e altre Legionelle spp). Attualmente abbiamo dimostrato che il terpinen-4-olo, il principale componente dell'olio essenziale di *Melaleuca alternifolia* (*tea tree oil*), è attivo contro *Legionella pneumophila*, ed esercita attività battericida sia in soluzioni acquose, sia sotto forma di vapore. I nostri dati evidenziano questo composto come un agente antimicrobico innovativo per un eventuale controllo ambientale della legionellosi.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Validazione dell'attività terapeutica nei confronti di ceppi fungini e batterici sensibili e resistenti ai farmaci di sintesi, che permetteranno di valutare:

- oli essenziali, in fase liquida e in fase vapore;
- loro principali costituenti attivi presenti nella miscela vegetale (fitocomplesso);
- attraverso ricerche dirette a dimostrarne l'attività *in vitro* e *in vivo* in modelli sperimentali murini già validati.

In particolare saranno valutate:

- attività microbica *in vitro* anche in presenza di farmaci di sintesi convenzionali;
- attività microbica *in vivo* su infezioni sistemiche e mucosali dai vari agenti;
- meccanismo di azione a livello cellulare e molecolare;
- frequenze di mutazione per la resistenza agli oli essenziali e componenti.

L'olio essenziale di *Melaleuca alternifolia* *Cheel* (*Tea Tree Oil*, TTO), costituirà l'olio di elezione e di confronto per valutare l'attività di altri oli essenziali, opportunamente selezionati per composizione, stabilità e per il prevalente contenuto di sostanze fenoliche o alcoliche.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati saranno trasferiti alla comunità scientifica nazionale e internazionale attraverso pubblicazioni indexate. Il TTO, altri oli essenziali e /o loro componenti in forma libera o in altre differenti formulazioni, che risulteranno particolarmente attive, potranno essere testati per la loro tossicità e tollerabilità in sperimentazioni eseguite con tossicologi e se questi saggi saranno positivi, saranno formulate e proposte prove di efficacia clinica nell'uomo. Tutto ciò nell'interesse dell'SSN e della salute dei cittadini.

### **Presenza dei virus HPV nei carcinomi uroteliali**

La capacità carcinogenetica di alcuni papillomavirus definiti ad alto rischio oncogeno è stata chiaramente dimostrata nel carcinoma della cervice uterina. Moltissimi studi epidemiologici nel corso di un ventennio hanno consentito di dimostrare una correlazione tra infezione, trasformazione oncogenica e sviluppo del cancro. I genotipi HPV, noti per causare il CC, sono coinvolti anche nelle infezioni anche di altri epitelii oltre quello della cervice.

Nel sistema uroteliale sia femminile che maschile sono presenti epitelii in grado di sostenere la replicazione dei papillomavirus. Diversi gruppi hanno dimostrato la presenza dei genotipi ad alto rischio oncogeno nell'uretra, nella vescica e nell'urina sia delle persone sane che di quelle affette da un carcinoma uroteliale di vario grado. Tuttavia gli studi pubblicati sono ancora insufficienti per poter correlare il carcinoma uroteliale all'attività carcinogenetica di HPV e quindi ipotizzare una eziologia virale di tale carcinoma.

In collaborazione con l'Istituto Bracci del Policlinico Umberto I e con l'Anatomia Patologica del medesimo Istituto è in corso uno studio retrospettivo per cercare i virus HPV in una collezione di carcinomi uroteliali di vario grado. Saranno analizzati i tumori provenienti da una popolazione maschile che sembra svolgere un ruolo chiave nella catena di trasmissione dei papillomavirus.

### **Risultati attesi nel triennio**

Dai campioni di tumore uroteliale verrà estratto il DNA che verrà processato per identificare eventuali papillomavirus presenti mediante i primers diagnostici GP5+/GP6+. Il genotipo virale verrà identificato mediante sequenziamento dell'amplicone ottenuto con PCR. Lo studio consentirà:

- mettere a punto e validare metodi per la diagnosi molecolare dei papillomavirus;
- determinare la percentuale di tumori uroteliali contenenti un genoma HPV;
- caratterizzare i carcinomi uroteliali HPV positivi attraverso l'analisi di altri marcatori tumorali quali p53, p16 e miRNA.

### **Trasferibilità dei risultati**

Lo studio consentirà di accrescere le conoscenze sulla presenza dei virus HPV e sul loro possibile effetto oncogeno nei tumori uroteliali. I risultati ottenuti sui tumori di una popolazione maschile consentiranno di valutare l'eventuale beneficio dell'introduzione del vaccino HPV anche nell'uomo.

## **Prevenzione e cura della cecità e ipovisione nella Regione di GAO, Mali**

Le attività previste nell'ambito dei due anni del programma (2010-2012) sono finalizzate alla creazione di un sistema di assistenza specialistica oftalmologica nella Regione di Gao, nonché alla realizzazione di studi epidemiologici e di identificazione di cause (infettive e non) e fattori predisponenti che sottendono alla stimata elevata incidenza di patologie che causano cecità nel Mali.

Sono inoltre previste attività di formazione diretta del personale locale implicato nella realizzazione del progetto (seminari, *atelier*), nonché attività di supporto alla formazione specialistica mediante il finanziamento di due corsi di specializzazione quadriennali in oftalmologia presso lo IOTA di Bamako e di alcuni stage formativi da realizzare in Italia. Tali attività, promuovendo anche il rafforzamento delle risorse umane specialistiche disponibili, faciliterà la sostenibilità futura dei benefici derivanti dalla realizzazione dell'intervento programmato. Oltre a studi pilota, che saranno definiti congiuntamente con la controparte maliana, sulla base dello stato dell'arte della ricerca in ambito epidemiologico, sarà previsto uno studio specifico sulle più importanti malattie infettive presenti nell'area di intervento, quali malaria e TB, che peggiorano la qualità della vita della popolazione locale ipovedente. Il programma verrà rinnovato per altri due anni a partire da febbraio 2012.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono: i) la riduzione dell'incidenza di patologie che causano la cecità nella regione di Gao; ii) la realizzazione di un Centro Oftalmologico presso l'Ospedale Regionale di Gao; iii) la realizzazione di un laboratorio ottico presso l'Ospedale Regionale di Gao; iv) l'esecuzione nell'arco del programma di 1.500 interventi chirurgici per cataratta; v) la realizzazione di un laboratorio diagnostico presso l'Ospedale Regionale di Gao; vi) la realizzazione di workshop e/o seminari sulle malattie infettive prevalenti nell'area di intervento, come malaria e TB; vii) la realizzazione di uno studio congiunto epidemiologico/patogenetico concordato tra esperti italiani e maliani.

### **Trasferibilità dei risultati**

Impatto sulla sanità pubblica della popolazione locale presente nell'area di intervento: riduzione chirurgica dell'incidenza della patologia oculare e quindi miglioramento della qualità di vita dei soggetti cechi e ipovedenti nella regione di Gao; controllo delle malattie infettive aggravanti la situazione sanitaria della popolazione locale, quali TB e malaria.

## **Processi patogenetici in infezioni polmonari e gastroenteriche: nuove strategie terapeutiche**

Identificare dei componenti microbici di superficie che abbiano una valenza patogenetica.

La presenza nelle placche aterosclerotiche di *Chlamydia pneumoniae* (Cp) suggerisce il coinvolgimento di potenziali target microbici nell'attivazione dei linfociti infiltranti la placca e quindi coinvolti nei processi degenerativi. Tra i meccanismi autoimmuni legati all'aterosclerosi abbiamo recentemente dimostrato (Ausiello *et al. Microb Infection* 2006) il perdurare di una risposta Th1/Th17 azionata da cellule dendritiche monocita-derivate (*Monocyte-Derived Dendritic Cells*, MDDC) maturate in presenza di Cp.

Il virus respiratorio sinciziale (*Respiratory Syncytial Virus*, RSV) è la principale causa di patologie delle basse vie respiratorie della prima infanzia. La patologia dell'RSV è associata con una risposta eccessiva immune e infiammatoria causata dall'induzione di stress ossidativo negli epitelii polmonari e da funzioni alterate dei macrofagi e delle DC. Abbiamo dimostrato come l'infezione da RSV in DC provochi un aumento della produzione di IL-10 e blocchi la produzione di IL-12, promuovendo una risposta di tipo Th2 (in preparazione).

Il *Clostridium difficile* (Cd) è una emergenza sanitaria dovuta alla diffusione di un ceppo particolarmente virulento. Abbiamo recentemente dimostrato che proteine di superficie che costituiscono S layer del Cd inducono citochine infiammatorie e regolatorie nel modello di MDDC (Ausiello *et al. Microbes Infect* 2006; Bianco *et al. J Med Microb* 2011) e che quindi possono essere implicate nella patogenicità del batterio.

### **Risultati attesi nel triennio**

Particolare attenzione sarà posta sul tipo di risposta evocata dall'infezione/trattamento con il patogeno intero o con prodotti batterici purificati in un modello sperimentale *in vitro* costituito da MDDC, di grande aiuto per capire la regolazione della risposta immune innata, e di quella T e B antigenica specifica e in modelli di linee epiteliali derivanti dall'apparato respiratorio (A549, BEAS-2B) e digerente (Caco2).

Obiettivi dell'UO sono identificare nei due modelli prescelti:

- i recettori coinvolti nell'infezione/interazione con il batterio e/o con i bersagli antigenici (proteine purificate) derivati dal patogeno;
- identificazione delle vie di trasduzione del segnale indotte dall'infezione/interazione con il patogeno e/o da bersagli antigenici (proteine purificate) da esso derivati;
- identificazione del profilo T *helper* indotto da MDDC istruite dall'incontro con il batterio e/o prodotti derivati con particolare attenzione all'induzione del profilo Th17, coinvolto sia in infezioni croniche che in processi autoimmuni;
- individuazione di strategie di immunomodulazione per ottenere lo spegnimento delle risposte patologiche;
- individuazione di antigeni bersaglio della risposta antigenica-specifica e differenzialmente espressi durante le fasi dell'infezione.

### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- Validare, con approcci di medicina sperimentale e clinica, le presunte associazioni fra alcune patologie di forte impatto sanitario e la loro eziopatogenesi microbica. Il raggiungimento di tale obiettivo è subordinato all'individuazione di parametri immunologici/infiammatori significativi da seguire nelle popolazioni in studio.
- Una migliore comprensione dei meccanismi infiammatori coinvolti permetterebbe interventi terapeutici con immunomodulanti, con particolare riguardo al possibile uso di citochine antiinfiammatorie, agenti bloccanti i recettori e le vie di trasduzione dei segnali cellulari coinvolti nell'infiammazione.

- Ricerca iniziata nel triennio precedente finanziato con la ricerca UE (Hyperdiff) e continuerà per mantenere le collaborazioni con i partner Europei nella prospettiva di nuovi progetti a livello europeo.

### **Prodotti di glicazione non enzimatica nella patogenesi delle malattie cardiovascolari: ricerca di biomarcatori di aumentato rischio cardiovascolare**

Sebbene il diabete sia un noto fattore predisponente lo sviluppo delle malattie cardiovascolari, il rischio cardiovascolare associato ad una glicemia al di sotto della soglia diabetica è scarsamente definito e i meccanismi che ne sono alla base non sono chiari. Un meccanismo candidato è la glicazione non enzimatica, che causa la formazione dei prodotti finali di glicazione avanzata (*Advanced Glycation End-product*, AGE).

La ricerca proposta si avvarrà di studi clinici (un *trial* clinico pilota sugli effetti di una dieta standard e a basso contenuto di AGE) e di popolazione (*nested case-control study*) integrati con approcci sperimentali *in vitro* e *in vivo* per sviluppare i seguenti obiettivi:

- Valutazione del contributo di una dieta ricca di AGE sui livelli circolanti di proteine glicate e di molecole infiammatorie nell'uomo.
- Analisi dell'associazione tra regime alimentare, profili di glicazione/infiammazione nel sangue e incidenza di infarto del miocardio nell'uomo.
- Identificazione di molecole circolanti coinvolte nei processi di glicazione quali biomarcatori di rischio cardiovascolare nell'uomo.
- Determinazione degli effetti di una dieta ad alto contenuto di AGE sullo sviluppo della patologia aterosclerotica nel modello murino.
- Valutazione del ruolo di specifici AGE nell'attivazione di meccanismi immunologici e vascolari coinvolti nella patogenesi dell'aterosclerosi.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati ottenuti aggiungeranno informazioni relative all'associazione tra alterazioni nel *pattern* di glicazione non enzimatica e aumentato rischio di malattie cardiovascolari. In particolare verrà chiarito il contributo degli AGE assunti con la dieta sui profili di infiammazione (recettore degli AGE solubile, citochine, chemochine, molecole di adesione, fattori di crescita angiogenici) e di glicazione (AGE totali, prodotti di glicazione iniziali, intermedi e avanzati, emoglobina glicata, metilgliosale, carbossi-metil-lisina, enzimi deglicanti) nel sangue, e l'eventuale associazione di tali fattori con l'infarto del miocardio. Lo sviluppo del modello murino permetterà di confermare la relazione causa/effetto tra dieta ricca di AGE e sviluppo della patologia aterosclerotica. La ricerca permetterà anche di identificare nuovi biomarcatori di rischio cardiovascolare tra i diversi componenti del *pattern* di glicazione analizzato e di mettere in luce possibili meccanismi immunologici e infiammatori rilevanti per la patogenesi dell'aterosclerosi innescati da specifiche proteine glicate.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La comprensione delle basi molecolari e cellulari dei meccanismi immunitari e infiammatori responsabili dello sviluppo dell'aterosclerosi aiuterà ad individuare nuovi *target* per la messa a punto di strategie terapeutiche che consentiranno di ridurre la morbilità e la mortalità dovuta ad eventi cardiovascolari.

La comprensione del ruolo patogenetico di una dieta ad elevato contenuto di AGE permetterà di ridurre il rischio di complicanze cardiovascolari in soggetti con alterazioni nel *pattern* di glicazione non enzimatica mediante un adeguato controllo alimentare atto al ripristino dell'omeostasi dell'organismo.

L'identificazione di biomarcatori di rischio cardiovascolare fornirà nuovi strumenti per l'individuazione dei soggetti ad alto rischio, permettendo di migliorare la prevenzione della

malattia cardiovascolare. Tali biomarcatori potrebbero essere utili non solo ai fini preventivi, ma anche per monitorare l'efficacia della terapia.

### **Profili di microRNA nelle infezioni da virus dell'epatite: analisi nel linfoma da HBV e HCV e applicazione nella diagnostica avanzata**

Il progetto si articola in due sottoprogetti:

- Profili di miR in pazienti con Non-Hodgkin linfoma (NHL) positivi per HBV e/o HCV. A questo progetto partecipa anche il CNESPS, nonché collaboratori esterni. HBV e HCV sono riconosciuti fattori di rischio per NHL. Evidenze cliniche suggeriscono che i linfomi di pazienti HCV o HBV positivi abbiano caratteristiche biologiche specifiche, tuttavia sono indistinguibili istologicamente da quelli di pazienti senza tali infezioni. È stata riportata la possibilità di classificare varie neoplasie in base ai profili dei miR. Obiettivo principale del progetto è l'identificazione di miR utilizzabili per una classificazione molecolare e per la diagnosi precoce dell'NHL nella popolazione a rischio con infezione HBV o HCV.
- Profili di miR nel siero di pazienti con epatiti ad eziologia ignota o di difficile diagnosi. Nonostante l'elevato standard dei diagnostici attuali, sussiste una frazione di epatiti a probabile eziologia virale non attribuibile ad alcuno dei virus noti. Inoltre l'epatite B occulta risulta spesso di difficile diagnosi. Studi recenti mostrano che i miR nel siero sono promettenti marcatori per una varietà di patologie. Obiettivo del progetto è l'identificazione di miR circolanti che possano essere utilizzati come marcatori di supporto nella diagnosi delle epatiti virali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I livelli dei miR saranno analizzati quantitativamente mediante *Real-Time* PCR (tecnologia TaqMan).

- Sottoprogetto 1

I campioni provengono da precedenti studi caso-controllo, e sono suddivisi in HBV+, HCV+, e negativi per HBV e HCV. Mediante *array* di *Real Time* PCR commerciali (quantizzazione di 377 miR in ogni corsa di amplificazione) sarà analizzato l'RNA totale estratto sia da sieri, sia da tessuti inclusi in paraffina (di cui è dimostrata la sovrapposibilità dei profili miR con quelli ottenibili da campioni congelati). I dati ottenuti permetteranno di definire profili di rischio, effettuare una classificazione molecolare delle patologie, ed evidenziare miR correlabili specificamente con l'agente infettivo coinvolto. I dati potranno anche fornire indicazioni sul ruolo di HBV e HCV nella genesi dell'NHL.

- Sottoprogetto 2

Il Reparto dispone di sieri di epatiti acute non-A-C inviati da strutture dell'SSN per diagnosi di epatite E, risultate non-A-E; ha inoltre accesso a sieri di pazienti con epatite B occulta. Lo studio prevede l'analisi di tali campioni contemporaneamente con gruppi di controllo (sieri da soggetti sani e da casi di epatite A, B, C, E ben caratterizzati). I campioni verranno sottoposti ad analisi di un gruppo di miR, selezionato da dati di letteratura e da banche dati online. Ci si aspetta che alcuni di essi siano rilevabili in maniera virus specifica nei campioni di controllo ed evidenziabili nei sieri da epatiti ad eziologia ignota o di epatiti B occulte.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'identificazione di profili di miR associati all'NHL in pazienti HBV o HCV positivi ha potenziali implicazioni nella pratica clinica per quanto attiene alla diagnosi e alla prognosi, nonché alla scelta e al monitoraggio di efficacia della terapia. Singoli miR potrebbero

diventare bio-marcatore sierologici precoci, indicatori di rischio di NHL in pazienti HBV e HCV positivi.

L'identificazione di miR circolanti associati a specifici virus dell'epatite potranno avere applicazione come marcatori di supporto nella diagnosi di pazienti con epatite negativi per i virus noti o con diagnosi incerta.

Oltre alla possibilità di identificare con approcci computazionali specifici geni *target* dei miR deregolati, su cui progettare terapie innovative, molto promettente è anche la possibilità di agire direttamente sui miR, impiegando molecole denominate antagomir in grado di sopprimere, in sistemi sperimentali *in vitro* e *in vivo*, specifici miR.

### **Progetto di una Unità di Epidemiologia molecolare e bioinformatica**

La bioinformatica inizia negli anni '70, insieme allo sviluppo delle tecnologie del DNA ricombinante, e alle pubblicazioni delle prime sequenze di acidi nucleici, si inizia quindi a pensare ad una programmazione dei grossi progetti di sequenziamento con il supporto di archivi informatici in cui immagazzinare questo tipo di dati per poi poterli analizzare. Tra le principali funzioni della bioinformatica, importante è la progettazione, l'implementazione e l'applicazione di metodi matematici e statistici per la caratterizzazione funzionale delle sequenze geniche (DNA, RNA, proteine) e per studi di evoluzione molecolare e strutturale degli acidi nucleici e delle proteine. La grande variabilità circa la proporzione stimata di sottotipi non-B di HIV-1 circolanti, nonché la variabilità e la continua evoluzione temporale del virus H5N1 dell'influenza aviaria e di altri tipi virali (epatite, arbovirus, ecc.) insieme alla grande disponibilità di sequenze di interi genomi o di interi segmenti genici che arricchiscono continuamente le banche dati, ci porta ad utilizzare queste metodologie di epidemiologia molecolare e bioinformatica per stimare la filogenesi e l'evoluzione temporale di molti tipi virali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Nei primi venti anni di epidemia l'infezione da HIV/AIDS ha avuto un impatto limitato nei Paesi balcanici. La maggior parte dei Paesi dell'Ovest dei Balcani negli anni recenti sono stati colpiti da una serie di avvenimenti catastrofici (guerre, distruzioni socio-economiche) che possono essere considerati dei potenziali determinanti della diffusione dell'infezione da HIV a grande variabilità di questo virus e la diffusione dei vari sottotipi e delle forme ricombinanti, ha un ruolo importante per l'epidemiologia, la diagnosi, la terapia e la prevenzione dell'infezione. Un primo obiettivo sarà la determinazione della diffusione e dell'evoluzione virale tra le popolazioni. Un secondo obiettivo sarà di descrivere l'evoluzione molecolare nel tempo dei vari tipi virali mediante l'applicazione di metodologie bayesiane. Un terzo obiettivo sarà la caratterizzazione filogenetica di tipi virali di interesse clinico, e di ricombinanti per i ceppi virali (es. epatite C) di cui non sono noti, nonché la caratterizzazione filogenetica ed evolutiva di proteine di origine virale e batterica di particolare interesse. Studi molecolari sono importanti perché si possono condurre in siti candidati a sperimentazione vaccinale, inoltre la designazione di un sottotipo rappresenta un marcatore molecolare importante per seguire la diffusione del microrganismo.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La conoscenza della distribuzione di tipi e sottotipi, e della loro circolazione in specifiche aree ha un impatto importante sull'epidemiologia, la diagnosi, il trattamento e la prevenzione delle infezioni associate. In particolare, per quanto riguarda le infezioni da HIV, HCV e H5N1, la determinazione della prevalenza, della circolazione delle forme ricombinanti e la conoscenza dell'evoluzione molecolare dei virus saranno di grande utilità nel campo della prevenzione per indirizzare nel modo migliore le eventuali strategie terapeutiche e vaccinali

che possono essere utilizzate dagli operatori dell'SSN. Nell'ambito clinico sarà di grande utilità la conoscenza e l'individuazione delle *novel mutation* (analisi dei polimorfismi) in soggetti HIV positivi *naïve* per terapia. La diffusione dell'informazione per mezzo di pubblicazioni scientifiche internazionali sulla epidemiologia molecolare dei virus sarà di grande utilità alla comunità scientifica.

### **Basi molecolari delle sindromi respiratorie gravi da influenza virus di tipo A (pandemico e stagionale): studio dell'evoluzione virale e identificazione di marcatori genetici prognostici**

Studio sviluppato nell'ambito di un Bando Cariplo – Piano di azione – Aumentare i livelli di eccellenza scientifica dei gruppi attivi nella ricerca medica di base attraverso il sostegno a progetti di grande impatto sulla comunità scientifica internazionale.

Questo progetto è rivolto all'identificazione e comprensione delle basi molecolari delle infezioni severe da virus dell'influenza, sia in corso di pandemia che di epidemia stagionale, con particolare riferimento al miglioramento delle pratiche preventive, diagnostiche e terapeutiche. Gli obiettivi specifici sono:

- L'identificazione di nuovi marcatori di virulenza e la generazione di saggi diagnostici rapidi.
- La comprensione dei meccanismi di *escape* immunologico per il miglioramento degli approcci vaccinali oggi disponibili.
- L'identificazione di fattori dell'ospite predisponenti e/o favorenti la selezione di ceppi virali a maggiore potenziale patogeno.
- L'implementazione di una attività diagnostica avanzata che preveda, oltre che l'identificazione, tipizzazione e sottotipizzazione dei ceppi influenzali anche l'analisi in tempo reale della sequenza genica dei ceppi virali.
- Il consolidamento di una rete di sorveglianza delle infezioni influenzali gravi che affianchi e integri la rete di sorveglianza sul territorio. Mentre la rete di sorveglianza territoriale è basata sul coinvolgimento dei medici sentinella, la rete per le infezioni gravi dovrebbe essere basata sul coinvolgimento delle Unità di Rianimazione e Terapia intensiva.
- Il miglioramento delle pratiche preventive attraverso lo sviluppo di un modello operativo basato sull'interscambio in tempo reale di informazioni a livello regionale e nazionale (ISS).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il cambiamento che l'intervento intende produrre è principalmente quello di migliorare la diagnosi e la terapia delle infezioni gravi da virus dell'influenza A. Inoltre, i dati raccolti serviranno a migliorare la prevenzione di questa infezione, mediante l'identificazione precoce di varianti aggressive. I tempi in cui il cambiamento è atteso sono relativamente ridotti. Infatti: i) il know-how scientifico è già disponibile presso il gruppo di ricerca ed è già stato utilizzato con successo nel corso della pandemia 2009; ii) gli aspetti organizzativi messi in opera in occasione della citata pandemia, sono risultati utili per proseguire nell'analisi delle infezioni severe a livello della Regione Lombardia; iii) il gruppo di ricerca è arricchito di professionalità che consentiranno la verifica dell'impatto biologico di nuove mutazioni identificate nel corso della presente epidemia stagionale, determinando un più ampio spettro di marcatori di virulenza; iv) l'esportazione del modello operativo proposto è attuabile in tempi rapidi basandosi sulla rete di sorveglianza già attiva in sede nazionale e coordinata da ISS. È prevedibile che il progetto possa concludersi in tre anni.

### **Trasferibilità dei risultati**

Lo svolgimento del programma, in linea con gli obiettivi più generali della WHO, nell'ambito del *Global Influenza Programme* (GIP), assicurerà il mantenimento degli standard tecnico-scientifici previsti dalla WHO per i Centri Nazionali di Riferimento per l'influenza (NIC).

### **Progetto EU FP7 EDENext – *Biology and control of vector-borne infections in Europe***

EDENext (*Biology and control of vector-borne infections in Europe*) è un progetto quadriennale della UE (2011-2014) dedicato allo studio della diffusione e al controllo delle principali malattie trasmesse da vettori in Europa. Prosegue gli obiettivi del progetto UE FP6 EDEN cercando di approfondire gli aspetti di biologia e controllo delle infezioni trasmesse da vettori (es. flebotomi) in Europa. Queste malattie coinvolgono aspetti di sanità pubblica umana e veterinaria e per molte di esse non esistono vaccini. Inoltre le metodiche di controllo del vettore sono spesso inadeguate. Il progetto EDENext coinvolge 46 gruppi di studio provenienti da 22 Paesi. L'ISS, Dipartimento MIPI, è presente nel coordinamento e attività scientifica del gruppo verticale "Malattie trasmesse da flebotomi vettori", sviluppando la sua attività sia in campo nazionale che internazionale. L'ISS è coinvolto nei *Work Package 8 (Emergence and Spread of Phlebotome group diseases, PhD)* e *9 (Intervention and control, PhD)*. L'attività di ricerca è rivolta a: i) interpretazione dei processi bio-ecologici di introduzione e diffusione dell'infezione; ii) sviluppo e messa a punto di metodi di prevenzione, sorveglianza e controllo dei flebotomi vettori; iii) identificazione di strategie di sanità pubblica per la valutazione del rischio reale della popolazione umana esposta. Le malattie prese in esame sono le Leishmaniosi e le malattie virali trasmesse da flebotomi.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Standardizzazione di protocolli diagnostici e formulazione di linee guida per la diagnosi delle malattie trasmesse da flebotomi con particolare attenzione alle Leishmaniosi umane e alla Leishmaniosi canina.
- Sorveglianza della diffusione di *Leishmania infantum* e del rischio di introduzione di *L. tropica* e ibridi di *L. donovani* in aree non endemiche del Mediterraneo.
- Diffusione di Phb-virus in Europa attraverso la centralizzazione in ISS dell'isolamento e identificazione di virus da campioni di flebotomi catturati dai singoli partner europei.
- Studio della dinamica stagionale, resting microhabitats, attività notturna e *host-feeding preference* di popolazioni di flebotomi vettori.
- Distribuzione e diffusione di flebotomi appartenenti al sottogenere *Larroussi* vettori provati di leishmaniosi nel Mediterraneo e Phlebovirus.
- Valutazione della suscettibilità di flebotomi vettori alle diverse specie di *Leishmania*.
- Monitoraggio della leishmaniosi canina attraverso sorveglianza dei cani, ospiti sentinella della leishmaniosi da *L. infantum*.
- Sviluppo e valutazione dell'efficacia di misure di controllo. Speciale attenzione verrà rivolta alla protezione del cane come *reservoir* di *Leishmania infantum*. L'obiettivo generale sarà quello di proteggere il cane dalla puntura dei flebotomi attraverso *spot-on* e collari con repellenti.
- Valutazione dell'efficacia anti-leishmaniosi di nuovi regimi farmaco/immunoterapeutici nel cane attraverso xenodiagnosi.

### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- Sorveglianza e controllo della diffusione della leishmaniosi umana (LV e LC) in Italia.
- Sorveglianza e controllo della leishmaniosi canina in Italia.
- Entomologia medica: i) dinamica stagionale, ii) distribuzione con particolare riferimento all'altimetria e iii) capacità vettoriale delle principali specie vettrici di leishmaniosi in Italia.
- Tassonomia di Leishmania: identificazione di specie e ceppi di *L. infantum* causa di casi autoctoni di LV, LC e LCan in Italia.
- Identificazione, diffusione e distribuzione di virus trasmessi da flebotomi in Europa.
- Valutazione del rischio di introduzione di nuove specie di Leishmania in Italia (es. *L. tropica*).
- Valutazione del rischio di introduzione di nuovi aplotipi *L. infantum* in Italia (Bacino del Mediterraneo, Nord Africa, Medio Oriente).
- Formulazione di mappe di rischio di diffusione della leishmaniosi in Italia e in Europa.
- Valutazione di nuovi repellenti nel controllo della leishmaniosi canina

### **Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis-specific biomarkers by core-shell hydrogel particles: low cost and non-invasive new tools for the diagnosis of tuberculosis in humans and cattle**

La TB è una delle malattie batteriche ad elevata prevalenza e a diffusione mondiale.

La TB è causa di una elevata mortalità e morbilità in molte aree del mondo ma prevalentemente nelle aree in via di sviluppo e dove si concentra la coinfezione con l'HIV.

#### **Risultati attesi nel triennio**

La TB è anche diffusa negli animali e in particolare nei bovini dove può determinare delle epidemie anche negli allevamenti con possibili trasferimenti all'uomo.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Fra vari limiti dei metodi diagnostici per la TB c'è da sottolineare la impossibilità di diagnosticare le forme di malattia attiva dallo stato di infezione tubercolare latente (*Latent Mycobacterium Tuberculosis Infection*, LTBI), asintomatico ma che può determinare diffusione della malattia nel caso di riattivazione.

Inoltre i metodi basati sulla dimostrazione della presenza del micobatterio attraverso la coltura o l'amplificazione genica sono assai limitati nei casi di lesioni tubercolari chiuse, ovvero forme non in rapporto con l'esterno per le quali è difficile identificare il liquido biologico dove cercare il patogeno. In particolare ciò vale per le forme miliari, linfonodali o comunque non polmonari aperte.

### **Regolazione della risposta cellulare a componenti della flora microbica commensale in topi NOD2KO**

In precedenti studi abbiamo analizzato la risposta immunitaria locale alla normale flora commensale durante un transitorio aumento della permeabilità intestinale. Abbiamo osservato un significativo aumento di cellule regolatorie mucosali esprimenti TGF- $\beta$  sulla superficie (cellule CD4+LAP+) evidenziando l'induzione di una risposta prevalentemente regolatoria. Queste cellule sono indotte dalle cellule CD11c+, sono IL-10 dipendenti e la loro espansione coinvolge lo stimolo attraverso il TLR2. Queste osservazioni sono rilevanti per lo studio delle malattie infiammatorie croniche intestinali. Il segnale del TLR2 è infatti influenzato dalla presenza di NOD2, un sensore intracitoplasmatico del muramil dipeptide, prodotto di origine batterica. Nel 30% dei casi di morbo di Crohn è presente una mutazione

del gene NOD2 considerata come fattore genetico di suscettibilità alla malattia. Questa mutazione si associa ad aumento della permeabilità intestinale, presente anche nei parenti di pazienti con morbo di Crohn che mostrano la stessa mutazione senza però evidenza di malattia suggerendo che possano essere operanti meccanismi di regolazione. In questo progetto, ci si propone lo studio dell'effetto di NOD2 sulla regolazione della risposta immunitaria mucosale alla flora batterica intestinale mediante la valutazione del microbioma e della risposta regolatoria a variazioni della permeabilità nei topi NOD2 KO e controlli.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Conoscenza dell'effetto della mutazione NOD2 sulla risposta locale alla flora commensale sia in condizioni basali che dopo induzione di un aumento transitorio della permeabilità intestinale con particolare riferimento alla risposta regolatoria locale caratterizzata nella componente cellulare e nella produzione di citochine.
- Conoscenza delle ripercussioni delle eventuali variazioni dell'attività regolatoria presenti nei topi NOD2KO sulla suscettibilità alla colite sperimentale.
- Conoscenza delle variazioni NOD2- dipendenti della composizione del microbioma.
- Definizione dell'effetto della variazione relativa dei diversi *phyla* componenti il microbioma intestinale sulla risposta regolatoria.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Individualizzazione dell'approccio terapeutico in pazienti con Morbo di Crohn portatori di mutazioni del gene NOD2-

### **Ricerca di nuove combinazioni di farmaci per il trattamento della tubercolosi**

Ogni anno circa nove milioni di persone si ammalano di TB. Si stima inoltre che due miliardi di individui siano infettati in maniera latente con Mtb e che il 10% di essi riattivi verso la TB attiva. La terapia della TB prevede l'uso di quattro farmaci per sei mesi ed è pertanto urgente trovare nuove combinazioni per eradicare rapidamente Mtb dai tessuti. Nei pazienti con TB latente il batterio si trova in uno stato dormiente non replicativo in lesioni poco ossigenate dei polmoni (tubercolomi), ed è refrattario all'attività degli antibiotici a causa dello sviluppo di bacilli genotipicamente sensibili ma fenotipicamente resistenti ai farmaci (*persisters*). Recentemente abbiamo approntato un modello *in vitro* (tubo di Wayne) per la produzione di Mtb aerobi, dormienti (microaerofili e anaerobi) e *persisters* mediante diminuzione graduale dell'ossigeno nelle colture. Con tale metodo nel triennio 2012-14 studieremo l'espressione genica e l'attività di farmaci in commercio e di nuova sintesi, da soli e in combinazione, verso le varie fasi di crescita di Mtb. Dopo l'esposizione ai farmaci, per verificarne l'attività, verranno determinati: i) il numero di unità formanti colonia in terreno solido; ii) i giorni di ricrescita in terreno liquido (MGIT 960); iii) la produzione di radicali liberi all'interno della cellula di Mtb mediante risonanza elettronica paramagnetica, con lo scopo di disegnare nuove combinazioni di farmaci sterilizzanti Mtb da saggiare *in vivo*.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Acquisizione di nuove conoscenze microbiologiche e molecolari (mediante *real time* PCR e RNA-seq) sulla dormienza di Mtb, in collaborazione con l'Istituto S. Raffaele di Milano.
- Identificazione di nuove combinazioni di farmaci inibenti e/o sterilizzanti Mtb in base alla mancata ricrescita in terreno liquido (MGIT 960) fino a 100 giorni di osservazione. I farmaci da studiare comprenderanno, tra gli altri: fluorochinoloni (moxifloxacina), aminoglicosidi (amikacina), fenotiazine (tioridazina), nitrocomposti

attivi su anaerobi (metronidazolo, nitazoxanide, niclosamide, PA-824, nitro-pirazinamidi), pirroli. PA-824 verrà fornito dalla *Global Alliance for TB drug development* di New York; le nitro-pirazinamidi dalla *Need-Pharma* di Milano, i pirroli dall'Università Sapienza di Roma. I farmaci da usare da soli e in combinazione verranno selezionati in base alla lipofilia (LogP: ripartizione ottanolo/acqua) e alla capacità di indurre la formazione di radicali dell'ossigeno e dell'azoto all'interno della cellula di Mtb, determinata mediante risonanza elettronica paramagnetica.

- La/le combinazioni in grado di impedire la ricrescita *in vitro* di Mtb aerobi, microaerofili, anaerobi e *persister* verranno somministrate come microparticelle (Università di Perugia) in un modello di infezione con Mtb in topi C57BL/6 presso l'Università Tor Vergata di Roma.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati di queste attività saranno presentati in comunicazioni a congresso e in pubblicazioni scientifiche e potranno essere utili per diminuire la durata della terapia della TB attiva e latente.

### **Ruolo dei biocidi nell'induzione dell'antibioticoresistenza in microrganismi biofilmogeni**

I biocidi sono stati utilizzati per decenni per disinfettare strumenti e superfici, mantenere gli alimenti, per igiene personale e per la prevenzione della trasmissione delle infezioni. La maggior parte delle specie batteriche e fungine rimane a tutt'oggi sensibile all'azione di queste molecole, sebbene si comincino ad osservare casi di aumentata resistenza, occasionalmente legati all'antibiotico-resistenza (principalmente in patogeni umani e veterinari). Poco è noto su quale possa essere l'efficacia dei biocidi sui batteri cresciuti in biofilm, una caratteristica che si sta presentando sempre più spesso e rivelando un problema di notevole entità in ambito clinico.

Il progetto si propone di verificare l'efficacia di alcuni disinfettanti di largo uso (composti dell'ammonio quaternario, clorexidina e triclosan) su microrganismi cresciuti in biofilm, valutandone l'azione sia su biofilm in formazione che su biofilm maturi, e determinando l'eventuale capacità di indurre una diminuita sensibilità ai biocidi stessi dopo trattamenti prolungati.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I dati ottenuti consentiranno di acquisire dati sui meccanismi di azione di biocidi di largo consumo su diverse specie batteriche, con particolare riferimento al possibile ruolo dei biocidi nell'induzione di resistenze crociate antibiotico-biocidi. Le informazioni saranno inoltre utilizzate per stilare delle linee guida che permettano la valutazione di biocidi su microrganismi cresciuti in biofilm, mentre quelle attualmente disponibili permettono la sola valutazione dell'efficacia su batteri in sospensione o adesi ad un substrato.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le informazioni ottenute con questi studi verranno trasmesse alla comunità scientifica, tramite pubblicazioni, e agli organismi interessati mediante la messa a punto di protocolli normativi per la valutazione dell'efficacia e non pericolosità di biocidi di nuova introduzione.

**Ruolo dei fattori di trascrizione cellulari IRF (*Interferon Regulatory Factor*) nella patogenesi dell'AIDS e nella riattivazione di HIV-1 dalla latenza: meccanismi e sviluppo di nuovi strumenti terapeutici**

L'espressione del virus HIV-1 e i suoi meccanismi patogenetici dipendono in larga misura dall'interazione tra fattori cellulari e virali la cui definizione costituisce la base per lo sviluppo di interventi terapeutici. I fattori cellulari sono tra i migliori candidati terapeutici in quanto non soggetti a quella variabilità che invece caratterizza le proteine virali ed è causa dei fallimenti finora ottenuti. Tra i fattori cellulari coinvolti nella trascrizione del genoma di HIV-1, NF- $\kappa$ B e fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia IRF giocano un ruolo essenziale sia nella trascrizione basale che nella riattivazione dalla latenza. Il problema della riattivazione dalla latenza, in particolare, rappresenta uno dei maggiori ostacoli alla *clearance* virale anche in presenza di terapia ART. Sono quindi oggi oggetto di intenso studio strategie volte a stimolare la riattivazione virale dalla latenza per poi eliminare anche le cellule latentemente infettate. Il presente progetto riguarda lo sviluppo da una parte di sistemi in grado di bloccare selettivamente gli IRF nelle cellule *target* dell'infezione produttiva, e dall'altra lo sviluppo di vettori in grado di permettere l'espressione costitutiva o inducibile di alcuni fattori IRF in grado di ristimolare una risposta immune controllata e/o di portare a morte le cellule in cui l'espressione del virus è stata ristimolata.

**Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Definizione del contributo relativo di IRF-1 e di NF- $\kappa$ B nell'indurre la trascrizione dell'LTR e la formazione di un complesso NF- $\kappa$ B / IRF-1 sulla regione *enhancer*. Questo permetterà di stabilire se la sola inibizione di NF- $\kappa$ B sia in grado di eliminare anche il contributo di IRF-1 alla transattivazione del promotore virale.
- Identificazione, attraverso l'uso di sistemi *high-throughput* di molecole da usare come farmaci in grado di riattivare la replicazione virale in cellule latentemente infettate.
- Produzione di vettori lentivirali inducibili esprimenti la forma costitutivamente attivata di IRF-3 sotto un promotore che risponda a tat, da esprimere in cellule riattivate per indurre morte cellulare.
- Produzione di vettori lentivirali inducibili esprimenti un super-repressore di NF- $\kappa$ B.
- Definizione di sequenze di RNA interferenti in grado di inibire in maniera specifica e selettiva i fattori IRF-1 e -2 e la subunità p65 di NF- $\kappa$ B.

**Trasferibilità dei risultati**

Gli studi proposti validaranno attivatori di IRF-1, già noti o utilizzati in terapia, per riattivare la latenza virale. Questo rappresenta un approccio innovativo nelle strategie terapeutiche di eliminazione dei *reservoir* dell'infezione al di là degli approcci classici più generici non utilizzabili perché determinano un generale stato di attivazione immunitaria dannoso per l'individuo. La strategia inoltre di bloccare l'attivazione di NF- $\kappa$ B mediante un vettore lentivirale in grado di esprimere un super-repressore di NF- $\kappa$ B in maniera inducibile, rappresenta un tentativo di approccio terapeutico innovativo di tipo genetico/molecolare volto a rendere le cellule infettate, un ambiente poco adatto alla replicazione. Con lo stesso approccio verrà espressa nelle cellule riattivate anche una forma di IRF-3 in grado di indurre apoptosi, sotto un promotore Tat-inducibile che conferirà grande specificità ed eviterà ogni effetto indesiderato nelle cellule non infette.

### **Ruolo del neuropeptide Y nei meccanismi infiammatori implicati nella patogenesi dell'aterosclerosi e nel rimodellamento vascolare**

È stata dimostrata una connessione bidirezionale tra il sistema immune e il sistema nervoso che coinvolge ligandi condivisi tra cui i neuropeptidi. Il neuropeptide Y (NPY), rilasciato dalle terminazioni nervose del sistema simpatico in seguito a stimoli stressanti, ha attività pleiotropiche tra cui la modulazione di funzioni immunologiche. Se rilasciato in maggiori quantità può rivestire un ruolo patogenetico in diverse alterazioni metaboliche predisponenti lo sviluppo dell'aterosclerosi. È stato suggerito che NPY, mediante interazione con il recettore specifico NPY-Y2, attiva meccanismi infiammatori associati alla instabilità della placca aterosclerotica. Altri studi indicano che il livello circolante di NPY ha un ruolo quale marcatore di rischio cardiovascolare. Il nostro programma di ricerca prevede l'utilizzo di modelli *in vitro* integrati con studi clinici per determinare, mediante approcci cellulari, molecolari e proteomici il ruolo di NPY quale marcatore circolante di rischio di sviluppo di aterosclerosi e quale fattore implicato nella progressione della patologia aterosclerotica. In particolare cellule del sistema immunitario di soggetti sani, stimulate *in vitro* con NPY verranno caratterizzate fenotipicamente e funzionalmente per valutare l'effetto di NPY sul sistema immunitario. Verrà valutata l'interazione di NPY con i diversi tipi di recettore specifico, in particolare Y1 e Y2, e con molecole immunomodulanti.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il primo risultato atteso è la determinazione del ruolo di NPY quale biomarcatore circolante di rischio di sviluppo della patologia aterosclerotica. Un secondo importante risultato è la comprensione della capacità di NPY di attivare cellule dell'immunità innata (monociti, macrofagi, cellule dendritiche) e adattativa (linfociti T) e di promuovere meccanismi immunologici e infiammatori pro-aterogenici. La ricerca permetterà anche di individuare i recettori coinvolti nell'interazione tra NPY e le componenti cellulari del sistema immunitario. Verrà inoltre determinato l'effetto immunomodulante di ormoni con funzione metabolica e immunoregolatoria quali leptina e grelina o di altre molecole immunomodulatorie sull'interazione tra NPY e cellule del sistema immunitario.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il trasferimento applicativo nella pratica clinica delle conoscenze acquisite potrebbe portare allo sviluppo di nuovi strumenti biologici di intervento preventivo e riparativo. L'identificazione di NPY quale biomarcatore di malattia aterosclerotica fornirà nuovi strumenti per migliorare la prevenzione e la prognosi della malattia cardiovascolare. L'individuazione del ruolo patogenetico di NPY e dei meccanismi coinvolti permetterà di mettere a punto nuove strategie terapeutiche. In particolare potranno essere prese in considerazione terapie basate sull'utilizzo di immunomodulanti che interferiscano con i meccanismi identificati di danno vascolare.

### **Ruolo del sistema NF-kB/IKK nell'infezione da HPV, mucosali e cutanei, e nelle lesioni tumorali associate**

I papillomavirus umani ad alto rischio (HR-HPV) causano il cancro della cervice uterina e altri tumori epiteliali. Le proteine virali E6 ed E7 mediano la progressione tumorale interferendo con il controllo della crescita cellulare (inattivazione degli oncosoppressori p53 e pRb) e interagendo con numerose proteine anti-apoptotiche e fattori trascrizionali tra cui il fattore nucleare kB (NF-kB).

L'attivazione di NF-kB, indotta da diversi stimoli patogenetici, induce la trascrizione di vari geni codificanti molecole che mediano l'infiammazione e controlla molti aspetti dell'oncogenesi (apoptosi, proliferazione, differenziamento cellulare).

L'espressione di E6 ed E7 di HR-HPV induce l'attivazione di NF-kB in cheratinociti umani primari e immortalizzati. Il trattamento con l'inibitore curcumina è in grado di abbassare questa espressione e inibire proliferazione cellulare e apoptosi in varie linee cellulari HPV-positive.

L'attività di NF-kB può essere coinvolta nello sviluppo di neoplasie HPV-associate e rappresentare un bersaglio per la loro terapia.

Nostro scopo è caratterizzare l'effetto dell'infezione da HPV sull'attivazione della risposta NF-kB-dipendente in cellule epiteliali e il suo meccanismo molecolare. Sarà analizzato l'effetto di E6 ed E7 sull'espressione NF-kB-dipendente di geni anti-apoptotici e pro-proliferativi per valutare se l'attivazione di NF-kB possa alterare il profilo di espressione genica in modo compatibile con quello della oncogenesi HPV-correlata.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- caratterizzazione dell'effetto dell'espressione di E6 ed E7 sull'attività del sistema IKK/NF-kB in diversi sistemi di cellule epiteliali umane;
- valutazione dell'effetto del sistema IKK/NF-kB sulla espressione delle oncoproteine di HPV;
- delucidazione del ruolo del sistema IKK/NF-kB nel controllo della proliferazione e della sopravvivenza di cellule HPV-positive;
- caratterizzazione dell'effetto di inibitori del sistema IKK/NF-kB sulla crescita tumorale e sulla sopravvivenza di cellule HPV-positive *in vivo*, in un sistema animale;
- caratterizzazione dell'effetto dell'inibizione di NF-kB, indotta mediante sostanze farmacologiche, sull'espressione e sull'attività di E6 ed E7, sia in linee cellulari HPV-positive che in cheratinociti trasfettati con i geni delle oncoproteine virali;
- caratterizzazione dell'effetto della inibizione di E6 ed E7 sull'attività di NF-kB negli stessi tipi cellulari.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La caratterizzazione del ruolo del sistema IKK/NF-kB nei meccanismi molecolari che sono alla base della aberrante regolazione della proliferazione e della sopravvivenza cellulare nelle cellule infettate da HPV mucosali e cutanei potrà consentire l'identificazione sia di nuovi bersagli molecolari utili per un intervento terapeutico contro i tumori HPV-correlati che di molecole con attività pro-apoptotiche e anti-proliferative in questi tumori.

Inoltre lo studio permetterà la determinazione dell'effetto dose-risposta di diversi inibitori di NF-kB sulla crescita tumorale e sulla sopravvivenza, e dei meccanismi della loro attività antitumorale *in vivo*.

I risultati di tali studi contribuiranno alla comprensione dei meccanismi molecolari alla base della carcinogenesi indotta da HPV e, consentendo l'individuazione di *target* cellulari di nuovi farmaci anti-virali e anti-tumoral, apriranno la strada a nuove strategie di intervento terapeutico per le infezioni e tumori HPV-associati.

### **Ruolo dell'endoglin e dei fattori di crescita del supergruppo TGFβ/BMP nella patogenesi dell'aneurisma dell'aorta ascendente: ricerca di nuovi biomarcatori**

L'aneurisma e la dissecazione dell'aorta sono eventi potenzialmente pericolosi poiché possono portare alla rottura dell'aorta e causare una grave emorragia che, nella maggior parte dei casi, determina la morte. Le cause della patologia aneurismatica dell'aorta sono molteplici e includono, malattie degenerative e arteriosclerotiche, disordini congeniti e malattie del tessuto connettivo. La presente ricerca si propone di identificare biomarcatori

circolanti per la diagnosi e il monitoraggio dei pazienti con aneurisma/dissecazione dell'aorta ascendente. Uno studio longitudinale sarà condotto su distinte categorie di soggetti e la variazione del profilo di espressione dell'endoglina, e del supergruppo del *Transforming growth factor-beta (TGF-beta)/bone morphogenic protein (BMP)* verrà valutata su campioni di sangue periferico e su sezioni di aneurisma di aorta ascendente mediante saggi di immunochimica, citofluorimetrici e di immunoistochimica. La ricerca si avvarrà di studi *in vitro* per identificare eventuali meccanismi molecolari e cellulari responsabili dell'eventuale alterata espressione dell'endoglina e del supergruppo del TGFbeta/BMP a livello delle lesioni aneurismatiche di aorta ascendente.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati ottenuti aggiungeranno informazioni relative all'associazione dell'espressione di endoglina e del supergruppo del TGFbeta/BMP con l'evoluzione delle lesioni aneurismatiche di aorta ascendente. La ricerca permetterà di identificare nuovi biomarcatori di rischio di aneurisma e/o dissecazione dell'aorta ascendente tra i diversi fattori di crescita del supergruppo TGFbeta/BMP e di mettere in luce possibili meccanismi immunologici e infiammatori rilevanti nella patogenesi dell'aneurisma dell'aorta ascendente.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La comprensione delle basi molecolari e cellulari dei meccanismi immunitari e infiammatori responsabili dello sviluppo e progressione dell'aneurisma e/o dissecazione dell'aorta ascendente aiuterà ad individuare nuovi *target* per la messa a punto di strategie terapeutiche che consentiranno di ridurre la morbilità e la mortalità dovuta ad eventi aneurismatici e/o di dissecazione dell'aorta ascendente. L'identificazione di biomarcatori di rischio di aneurisma e/o dissecazione fornirà nuovi strumenti per l'individuazione e monitoraggio dei soggetti a rischio permettendo di migliorare la prevenzione della malattia. Tali biomarcatori potrebbero essere utili non solo ai fini preventivi, ma anche per monitorare l'efficacia della terapia

### **Ruolo delle citochine e delle cellule regolatorie nel determinare l'estensione delle lesioni infiammatorie in pazienti con colite ulcerosa**

La colite ulcerosa è una delle due principali forme di malattie infiammatorie croniche intestinali. In Europa, l'incidenza e la prevalenza della colite ulcerosa è aumentata negli ultimi 50 anni. L'incidenza varia da 0,6 a 24,3 /100.000 soggetti-anno con una prevalenza di 505 per 100.000 persone. La colite ulcerosa coinvolge primariamente il retto e può estendersi per via retrograda interessando porzioni di colon più estese fino ad interessare l'intero organo. Dopo 20 anni dall'esordio, il 50% circa dei pazienti ha una pancolite. L'estensione della malattia è un fattore determinante per la prognosi di malattia. Precedenti studi hanno valutato i fattori di rischio clinici di estensione della malattia, ma i risultati sono controversi. La capacità di classificare correttamente i pazienti in base al rischio di progressione della malattia, in modo da adottare strategie di trattamento personalizzate, rappresenterebbe quindi un importante avanzamento nella gestione clinica dei pazienti con colite ulcerosa. Lo scopo dello studio è quello di individuare, mediante lo studio integrato delle caratteristiche genetiche, del tipo di risposta immunologica mucosale e del microbioma dei pazienti, diversi moduli associati con le diverse caratteristiche di estensione della malattia e con il rischio di progressione delle lesioni.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Lo scopo dello studio è quello di individuare, mediante lo studio integrato delle caratteristiche genetiche, del tipo di risposta immunologica mucosale e del microbioma dei pazienti, diversi moduli associati con le diverse caratteristiche di estensione della malattia e

con il rischio di progressione delle lesioni. I gruppi in studio sono rappresentati da pazienti con colite ulcerosa classificati nei seguenti gruppi:

- Pazienti con malattia limitata al retto con estensione stabile da almeno cinque anni.
- Pazienti con colite Sn (interessamento del colon-retto distalmente alla flessura splenica) con estensione stabile da almeno cinque anni.
- Pazienti con colite estesa (interessamento del colon-retto esteso oltre la flessura splenica) con estensione stabile da almeno cinque anni.
- Pazienti che hanno subito una estensione delle lesioni con passaggio dal gruppo A al gruppo B o C da non più di cinque anni.

Questo studio si avvale della collaborazione con esperti di genetica delle malattie infiammatorie croniche dell'intestino (Università degli Studi di Firenze) e di gastroenterologi clinici (Ospedale Sandro Pertini di Roma).

#### **Trasferibilità dei risultati**

I dati ottenuti dallo studio aiuteranno a capire come le interazioni tra geni e risposta immunologica possano, sotto l'impulso dei batteri luminali promuovono la diffusione di infiammazione nei pazienti con colite ulcerosa offrendo la possibilità di strategie cliniche e terapeutiche individualizzate e ottimizzate

### **Ruolo dello stress ossidativo nella patogenesi dell'aterosclerosi**

L'aterosclerosi è una patologia in cui lo stress ossidativo rappresenta un importante fattore patogenetico. Scopo generale del presente progetto è quello di valutare modificazioni strutturali e di espressione causate dallo stress ossidativo a carico di componenti autologhe molecolari e cellulari e di determinare se tali modificazioni inducono meccanismi infiammatori e immunologici coinvolti nello sviluppo dell'aterosclerosi. Obiettivi specifici sono: i) identificazione in pazienti con aterosclerosi di reazioni autoimmuni umorali e cellulari verso molecole autologhe modificate nella struttura o nel *pattern* di espressione in seguito a stress ossidativo; ii) identificazione dei meccanismi pro-aterogenici mediati dalle reazioni autoimmuni; iii) valutazione dell'effetto immunomodulatorio degli ossisteroli, prodotti di ossidazione del colesterolo presenti all'interno della placca aterosclerotica, sulle due sottopopolazioni di macrofagi classicamente attivati (pro-infiammatori, pro-aterogenici) e alternativi (anti-infiammatori, anti-aterogenici). Il bilancio tra le due sottopopolazioni gioca un ruolo importante nella patogenesi dell'aterosclerosi e in particolare nei meccanismi infiammatori che determinano l'instabilità della placca; iv) valutazione della capacità di sostanze naturali ad azione antiossidante quali le cumarine di prevenire e/o contrastare le modificazioni causate dallo stress ossidativo nella struttura e/o nel *pattern* di espressione di componenti autologhe.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I principali risultati attesi sono: i) l'acquisizione di nuove conoscenze sull'ipotesi eziopatogenetica autoimmune dell'aterosclerosi e l'identificazione di nuovi candidati autoantigeni in pazienti con aterosclerosi carotidea e coronarica; ii) l'individuazione di autoantigeni e/o autoanticorpi quali marcatori immunologici di malattia e in particolare di instabilità della placca; iii) la comprensione della capacità dei prodotti di ossidazione del colesterolo di polarizzare i macrofagi infiltranti la placca aterosclerotica verso un fenotipo pro-infiammatorio responsabile dell'instabilità della placca stessa; iv) l'identificazione di sostanze naturali ad azione antiossidante in grado di prevenire e/o contrastare i meccanismi patogenetici attivati dallo stress ossidativo.

### **Trasferibilità dei risultati**

Il trasferimento applicativo nella pratica clinica delle conoscenze acquisite potrebbe portare allo sviluppo di nuovi strumenti biologici di intervento preventivo e riparativo che interferiscano con i meccanismi putativi del danno vascolare quali: i) terapie immunomodulanti specifiche atte a contrastare i meccanismi immuni/autoimmuni cellulari e umorali con particolare riguardo ai meccanismi responsabili dell'instabilità della placca aterosclerotica; ii) terapie atte a ridurre lo stress ossidativo nei pazienti con aterosclerosi mediante utilizzo di sostanze naturali ad azione antiossidante quali le cumarine. L'individuazione di autoantigeni e/o autoanticorpi quali marcatori immunologici sensibili e precoci di malattia e di progressione e in particolare di instabilità della placca può avere ricadute a scopo diagnostico, prognostico, preventivo e terapeutico.

### **Sclerosi multipla: analisi del TLR *signalling* e IFN *signature* come possibili biomarcatori per la previsione del decorso della malattia**

La SM rimane una malattia ad eziologia sconosciuta e senza una cura definitiva. L'ipotesi eziopatogenetica più studiata prevede il coinvolgimento di un agente infettivo quale causa scatenante di una risposta autoimmune contro antigeni della mielina attraverso meccanismi di mimetismo molecolare, induzione di superantigeni o attivazione *bystander*. Tra le varie cause scatenanti la malattia è stata anche considerato il coinvolgimento di un agente infettivo quale causa scatenante di una risposta autoimmune. Ad oggi, circa 20 agenti infettivi sono stati associati alla SM, tuttavia solo per l'EBV è stato possibile fare un'associazione credibile con la SM sostenuta da un numero crescente di osservazioni epidemiologiche e di studi immunologici.

L'esistenza di DC plasmacitoidi attivate nelle placche e nei tessuti linfoidei della SM, dove è stata dimostrata la presenza di cellule B infettate dall'EBV, suggerisce la possibilità che possano svolgere un'attività antivirale protettiva attraverso il rilascio di IFN di tipo I successivamente alla stimolazione con virus o suoi derivati. Tuttavia, non si può escludere che l'attivazione continua di questa popolazione di DC da parte dell'EBV e la conseguenziale produzione di IFN di tipo I possano rappresentare un evento patogenetico alla luce delle proprietà immunoregatorie di queste citochine il cui ruolo è stato chiaramente definito nell'ambito di altre malattie autoimmuni.

### **Risultati attesi nel triennio**

Gli esperimenti pianificati sono mirati ad identificare nuovi biomarcatori con valore prognostico e/o diagnostico in relazione al decorso clinico o allo stadio della malattia attraverso l'analisi di possibili alterazioni della risposta innata contro l'infezione da EBV. A tale scopo abbiamo iniziato un'analisi comparativa dell'espressione dei geni IFN-indotti, tra cui MxA, in pazienti con SM con diversi decorsi della malattia *vs* donatori sani (studio *ex vivo*) attraverso *real time* PCR quantitativa. Abbiamo inoltre messo a punto una tecnica di *real time* PCR per rivelare l'espressione dei trascritti di EBV nel sangue periferico dei pazienti e dei donatori sani in modo da poter associare l'induzione della risposta antivirale con l'espressione del virus. La messa a punto di questa tecnica consentirà anche di valutare se la riattivazione virale può indurre il rilascio di IFN di tipo I soprattutto da parte delle DC plasmacitoidi.

A questo proposito abbiamo iniziato anche la caratterizzazione della risposta delle DC plasmacitoidi alla stimolazione dei TLR e all'infezione con EBV (studio *ex vivo/in vitro*) nei pazienti SM verso donatori sani al fine di identificare eventuali disregolazioni della risposta antivirale indotta attraverso il rilascio di IFN di tipo I da parte di queste cellule.

Questo studio è condotto in collaborazione con l'Ospedale Sant'Andrea di Roma.

### **Trasferibilità dei risultati**

L'ottenimento degli obiettivi permetterà di individuare se e come le pDC sono coinvolte nella patogenesi della SM. Inoltre il nostro studio potrebbe chiarire alcuni aspetti relativi alla risposta delle pDC e delle cellule B all'IFN- $\beta$  aprendo nuove prospettive di studio e applicazione per questo trattamento terapeutico. Questo aspetto è di particolare rilievo in considerazione del ruolo eziopatologico che è stato recentemente associato ai linfociti B nell'induzione della SM.

### **Sequenziamento e studio del genoma di pazienti pediatrici e adulti con disturbo dello spettro autistico nell'area del Mediterraneo**

I disturbi dello spettro autistico rappresentano una grave sindrome neuropsichiatrica, che si manifesta durante l'infanzia, i cui sintomi persistono per tutta la vita dell'individuo e per la quale non esiste, ad oggi, alcuna possibilità di cura. La malattia è eterogenea, sia da un punto di vista clinico che eziologico, e studi epidemiologici indicano la presenza di una forte componente genetica. Il modello di ereditarietà è tuttavia complesso, ed è probabilmente determinato dall'azione concertata di geni con altre sequenze genomiche. Il sequenziamento completo del genoma dei pazienti ASD pediatrici e adulti, effettuato con le più attuali tecniche di *deep-sequencing*, potrà fornire nuove informazioni sulla complessa ereditarietà dell'autismo. Noi ipotizziamo che esista una *signature* genomica, non solo a carico dei geni che codificano per proteine, ma anche a carico dei retrovirus endogeni umani (*Human Endogenous RetroVirus*, HERV) che costituiscono l'8% dell'intero genoma e che sono parte attiva e integrante dell'*environment* genomico. Mediante l'integrazione dei dati biologici in piattaforme bioinformatiche innovative, cercheremo di costruire un modello che integri tutte le componenti molecolari responsabili dell'insorgenza e della progressione degli ASD. Nuovi approcci terapeutici emergeranno dalla completa conoscenza della struttura e funzione del genoma "implicito". I nostri studi contempleranno il sequenziamento di pazienti provenienti dai Paesi del Mediterraneo (Italia, Albania, Marocco, Tunisia, ecc.).

### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio delle interazioni tra genoma e ambiente, il contributo degli HERV e la conoscenza della sequenza completa del genoma dei pazienti saranno al centro di questo studio. L'espressione genica degli HERV, sarà messa in relazione con la loro localizzazione genomica, andando a rappresentare pertanto il primo studio in tal senso relativo a questa patologia. L'estrema variabilità ed eterogeneità del fenotipo autistico è difficilmente spiegabile senza l'azione regolativa dei retrovirus endogeni e quindi, lo studio del genoma in tutta la sua complessità, ci porterà ad identificare nuovi meccanismi molecolari alla base di questa patologia complessa. Saranno utilizzati algoritmi innovativi per l'analisi bioinformatica di regioni specifiche (*isochore*) del genoma per confrontare i genomi di pazienti con disturbo dello spettro autistico di differenti età e provenienti da paesi diversi. Un primo risultato sarà quello di uniformare i test di classificazione dei fenotipi clinici (ADOS, ADI-R) in tutta l'area del Mediterraneo, tenendo conto delle differenze culturali e ambientali. Il secondo sarà quello di organizzare una banca dati di DNA dei pazienti autistici dell'area suddetta e il terzo quello di identificare la correlazione esistente tra la composizione del genoma e la mappatura dei retrovirus endogeni, in modo da caratterizzare i fattori determinanti la penetranza del fenotipo autistico.

### **Trasferibilità dei risultati**

Ad oggi, sono stati identificati più di 200 geni coinvolti negli ASD, senza che ne sia derivata alcuna terapia efficace. Con questo studio ci ripromettiamo di identificare e mappare le componenti genomiche, e non solo i geni, coinvolti nell'autismo in quanto solo lo studio

integrato delle sequenze che regolano i geni potrà suggerire un nuovo approccio terapeutico. Il *deep-sequencing* ci consentirà di sapere quanti sono gli HERV, a quale famiglia appartengono e dove sono presenti nel genoma di un individuo. La strategia che vorremmo perseguire è quella di interferire e regolare l'espressione di *pathway* di geni "autistici" mediante il silenziamento o l'attivazione degli HERV. Differenti classi di antiretrovirali potrebbero essere utilizzate per interferire con la trascrizione dei retrovirus endogeni, e quindi riequilibrare l'espressione dei geni coinvolti nell'autismo.

### **Sicurezza, immunogenicità ed efficacia delle vaccinazioni nel personale militare**

Il progetto prevede che i militari, una volta ottenuto il nulla osta del Comitato Etico e le autorizzazioni degli Stati Maggiori, siano studiati, previo consenso informato, per:

- raccolta anamnestica dei dati individuali circa le esposizioni vaccinali prima e durante l'attività militare e anamnesi patologica (con possibilità di istituire una registrazione continua sistematica per ogni militare, presso l'Osservatorio Epidemiologico della Difesa, OED);
- documentazione di vaccinazioni ricevute in occasioni di missioni (da inserire nella registrazione OED);
- documentazione di profilassi e trattamenti contemporanei (da inserire presso OED);
- raccolta di campioni biologici da stoccare in una banca biologica (da collocare presso il Centro Studi e Ricerche di Sanità e Veterinaria dell'Esercito Italiano o presso l'ISS) collegata con l'OED e su cui effettuare le seguenti valutazioni nell'ambito del presente studio;
- immunogenicità – analisi quantitativa e qualitativa degli anticorpi specifici a 0, 1, 6 e 12 mesi e poi annualmente per ulteriori due anni e, agli stessi tempi, congelamento cellule in un sottogruppo per esaminare la frequenza delle sottopopolazioni di cellule T specifiche per antigeni proteici vaccinali (T<sub>cm</sub>, T<sub>em</sub>) e delle sottopopolazioni delle cellule della memoria (CD45RO e RA), Tregs, Th1, Th2, Th17, e la frequenza di linfociti B memoria.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Uno studio di tali dimensioni e con un monitoraggio così analitico, attraverso sofisticate metodiche di laboratorio e con un follow-up a tre anni consentirà non soltanto di disporre di dati in grado di rispondere al quesito sulla eventuale immunopatogenicità delle vaccinazioni, ma anche sulla regolazione della risposta immunitaria ad un relativamente elevato numero di antigeni vaccinali somministrati contemporaneamente e sulla efficacia vaccinale. Inoltre vi sarà l'opportunità di attivare, da parte dell'OED, i record vaccinali dei militari. Alla fine del primo anno sarà possibile valutare la dinamica di risposta immunitaria specifica e l'eventuale comparsa precoce di alterazioni autoimmunitarie o linfoproliferative. Alla fine del secondo e del terzo anno si valuterà la persistenza di risposta specifica e si continuerà a monitorizzare l'eventuale comparsa di alterazioni autoimmunitarie o linfoproliferative. Le informazioni acquisite consentiranno un rapido trasferimento dei risultati alle pratiche vaccinali in sanità pubblica e militare.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Lo studio permetterà una valutazione dell'efficacia e sicurezza dei vaccini che contribuirà alla migliore comprensione dei limiti di vaccinazioni complesse.

### **Sintomatologia simil-parotitica in bambini e adolescenti vaccinati e non vaccinati per morbillo, parotite e rosolia**

Nell'ambito della sorveglianza delle malattie prevenibili da vaccino può essere interessante approfondire lo studio della parotite epidemica. L'agente eziologico di tale malattia è il virus parotitico, un paramyxovirus a RNA. L'infezione viene in genere trasmessa per via respiratoria. Il primo sintomo evidente della malattia è il gonfiore delle parotidi. Il vaccino viene somministrato in combinazione con le componenti del morbillo e rosolia ed è costituito da virus vivi attenuati capaci di stimolare le difese naturali dell'organismo. Nel periodo che segue la vaccinazione i bambini vaccinati possono sviluppare una varietà di altre malattie con sintomi che richiamano quelli della parotite; in questi casi sono necessari esami di laboratorio per guidare la terapia. È infatti difficile differenziare clinicamente la parotite epidemica da altre condizioni che causano il rigonfiamento delle ghiandole parotidi. In letteratura è riportato che in Finlandia, in cui la parotite è stata virtualmente debellata, sono stati osservati casi simili alla parotite causati da EBV, virus parainfluenzali di tipo uno, due e tre, adenovirus ed herpes virus sei e parvovirus B19. Per questo motivo l'approccio basato su una diagnosi di laboratorio differenziale risulta essenziale per ottenere l'accuratezza necessaria nella sorveglianza della parotite sul territorio nazionale in cui l'incidenza della malattia è bassa.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Per reperire i campioni sui quali effettuare lo studio ci serviremo della rete coinvolta nel piano di eliminazione del morbillo e della rosolia congenita. L'analisi di questi campioni, attraverso la messa a punto di una strategia diagnostica atta a differenziare i diversi virus capaci di dare un'infezione assimilabile ad una parotite, permetterà di: i) comprendere la vera epidemiologia di queste malattie; ii) valutare l'impatto del programma di vaccinazione (trivalente: morbillo, parotite e rosolia).

#### **Trasferibilità dei risultati**

Un'attenta diagnosi dei casi con una sintomatologia clinica compatibile con una parotite è importante nel trattamento di ogni singolo paziente.

### **Sorveglianza antibioticoresistenza in comunità, nelle infezioni trasmesse dagli alimenti e in quelle di origine zoonosica: cloni batterici di *Salmonella* e *Campylobacter* con resistenza multipla responsabili di infezioni trasmesse da alimenti**

La valutazione dell'impatto dell'antibioticoresistenza in sanità pubblica deve essere necessariamente specifica per patogeno, per antibiotico e per area geografica. Ogni microrganismo, infatti, è causa di malattie di severità e incidenza diversa e possono essere disponibili pochi o molti chemioterapici efficaci nei suoi confronti. Inoltre la comparsa di patogeni resistenti contemporaneamente a più antibiotici riduce ulteriormente la possibilità di un trattamento efficace. Il problema della resistenza agli antibiotici è complesso in quanto fondato su molteplici fattori tra cui l'aumentato uso di antibiotici sia in medicina umana che in medicina veterinaria, incluso l'uso non appropriato.

*Salmonella* e *Campylobacter* rappresentano i principali agenti zoonosici d'infezioni trasmesse da alimenti nel nostro Paese così come in Europa. In questi ultimi anni si è assistito ad un notevole incremento dei ceppi resistenti e multiresistenti anche verso antibiotici di elezione nella terapia delle infezioni umane. Recentemente un nuovo profilo di multi resistenza (R-ASSuT) è emerso in Italia, attualmente rappresenta quasi il 50% di tutti i ceppi multi resistenti di *S. Typhimurium* e della sua variante monofasica (S.4,5,12;i;-). *Campylobacter jejuni* resistente ai fluorochinoloni è isolato con elevata frequenza sia in

campo umano che veterinario e recentemente si assiste ad un aumento della resistenza all'eritromicina.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Individuazione di *marker* utilizzabili come strumenti epidemiologici per tracciare tali cloni antibiotico resistenti di *Salmonella* e *Campylobacter* in ambito umano, veterinario e ambientale. Le attività della sorveglianza mirata al monitoraggio di ceppi di *Salmonella* e *Campylobacter* responsabili di infezioni trasmesse da alimenti con resistenza multipla agli antibiotici permetteranno infatti la caratterizzazione fenotipica e genotipica di isolati di origine umana, la caratterizzazione e la localizzazione dei geni di resistenza nonché l'individuazione dei principali genotipi isolati da infezioni umane e dalle principali specie di animali da reddito.

Partecipazione a network europei con l'obiettivo di condividere strumenti di epidemiologia molecolare atti a valutare l'emergenza di nuovi cloni antibioticoresistenti di *Salmonella* e *Campylobacter* a livello internazionale.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti saranno trasferiti all'SSN e alla comunità scientifica nazionale utilizzando veicoli ad ampia diffusione quali congressi nazionali e pubblicazioni affinché le conoscenze acquisite siano largamente fruibili. Nell'ambito dei laboratori facenti parte del sistema di sorveglianza i risultati prodotti saranno trasferiti in workshop e incontri periodici.

### **Sorveglianza dell'epatite E in Italia: malattia emergente nei Paesi industrializzati**

L'epatite E è una malattia emergente nei Paesi industrializzati nei quali è in aumento il numero di casi autoctoni. Il carattere sub-clinico dell'infezione e una non adeguata standardizzazione delle metodiche diagnostiche suggeriscono che il numero dei casi di epatite E acuta notificati in Italia, al SEIEVA, sia una sottostima del numero reale.

La maggior parte delle infezioni autoctone sono da genotipo 3, il quale presenta una prevalenza elevata in alcuni animali, principalmente i maiali, in cui dà un'infezione asintomatica. La stretta omologia genetica tra ceppi umani e animali suggerisce che l'epatite E possa essere considerata una zoonosi. La trasmissione potrebbe avvenire per un'esposizione occupazionale (ad esempio per gli allevatori di maiali) o attraverso il contatto diretto o l'ingestione di materiali contaminati dal virus.

Il progetto si pone l'obiettivo di confermare l'associazione tra infezioni autoctone e i suddetti fattori di rischio, valutare il reale *burden* dell'infezione e organizzare, avvalendosi della rete SEIEVA già esistente, una rete di sorveglianza per monitorare la zoonosi da HEV.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Stima dell'incidenza di epatite E per area geografica, età e sesso.
- Proporzione di casi non-A non-C positivi per HEV RNA mediante l'analisi della viremia in soggetti con epatite acuta non-A e non-C afferenti alla rete SEIEVA.
- Stima della proporzione di casi d'importazione e autoctoni, mediante stima delle proporzioni di diversi genotipi HEV circolanti in Italia con l'impiego di tecniche di caratterizzazione molecolare.
- Definizione dei fattori di rischio per HEV e caratterizzazione clinica.
- Sorveglianza della diffusione ambientale del virus HEV e correlazione con le infezioni autoctone e importate nell'uomo, utilizzando un network di 30-40 impianti di depurazione distribuiti in tutte le Regioni italiane.

### **Trasferibilità dei risultati**

Il sistema di sorveglianza consentirà di promuovere a livello territoriale l'esecuzione delle indagini di diagnosi sierologica. Inoltre con la collaborazione dei centri clinici afferenti alle ASL che segnaleranno i casi di epatite E, sarà possibile una più accurata descrizione dell'espressività clinica dell'infezione. Tutto ciò comporterà un'importante ricaduta in sanità pubblica, in quanto sarà possibile suggerire più efficaci e mirate strategie preventive e di controllo dell'infezione (come ad esempio il trattamento delle acque e dei prodotti alimentari) che potranno concretizzarsi in un'ulteriore riduzione della diffusione dell'epatite E in Italia. Al contempo si provvederà inoltre ad una standardizzazione dei test di diagnosi virologica (*Real time* PCR vs *Nested* PCR) e sierologica che porterà ad una riduzione della quota di falsi negativi.

### **Sorveglianza della resistenza ai farmaci antitubercolari in Italia**

La TB rappresenta un importante problema di sanità pubblica per l'aumentata circolazione di ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* resistenti almeno a isoniazide e rifampicina (*multidrug-resistant*, MDR) e resistenti a un fluorochinolone e ad un farmaco iniettabile, kanamicina, capreomicina o amikacina (*extensively drug-resistant*, XDR) isolati soprattutto da immigrati provenienti dall'ex Unione Sovietica, Africa, Asia. Con i fondi del Progetto CCM-Azione Centrale del Ministero della Salute, dal 2006 l'ISS ha arruolato 34 laboratori in 19 Regioni e ha eseguito: i) il controllo di qualità dell'antibiogramma di Mtb per i farmaci di prima e seconda linea, ii) la determinazione della resistenza ai farmaci in 5267 casi di TB nel periodo 2008-10, iii) l'allestimento di una ceppoteca MDR/XDR e l'avvio della tipizzazione molecolare e mappatura delle resistenze. L'obiettivo generale per il 2012-14 è di ampliare questa sorveglianza ad un maggior numero di laboratori, e, possibilmente, di creare un database in ISS per l'inserimento degli antibiogrammi direttamente dai laboratori interfacciabile con il sistema TESSy dell'ECDC. Verrà inoltre studiato il ruolo dell'immigrazione nella diffusione della TB MDR/XDR in Italia. Il controllo di qualità verrà integrato con il controllo di qualità per la pirazinamide (PZA) e con la diagnosi molecolare delle resistenze. Data la difficoltà di trattare la TB MDR/XDR, sarà determinata l'attività *in vitro* di nuovi farmaci (es. nitrocomposti) sui ceppi raccolti.

### **Risultati attesi nel triennio**

Sono attesi i seguenti risultati:

- Aumento della copertura territoriale e della rappresentatività dei laboratori che partecipano al controllo di qualità dell'antibiogramma e alla determinazione della resistenza nei nuovi casi/ritrattamenti e negli italiani/immigrati in Italia. Migliorare il controllo di qualità aumentando il numero di laboratori che determinano la sensibilità ai farmaci di seconda linea e introducendo il controllo di qualità genotipico e la determinazione della sensibilità alla PZA, non ancora eseguito dalla WHO.
- Immissione dei dati in un database centralizzato da parte dei laboratori della rete e analisi dei risultati epidemiologici per una migliore comprensione del ruolo dei flussi migratori nella diffusione della TB farmacoresistente in Italia.
- Studi microbiologici sui ceppi raccolti allo scopo di confermare la resistenza ai farmaci di prima linea (streptomina, isoniazide, rifampicina, etambutolo) ed eseguire saggi di resistenza ai farmaci di seconda linea (kanamicina, amikacina, capreomicina, ofloxacina, moxifloxacina, etionamide, linezolid) per quantificare l'entità della TB MDR e XDR in Italia. In collaborazione con l'Istituto San Raffaele di Milano verranno proseguiti gli studi di tipizzazione molecolare e di mappatura delle

resistenze. I dati della sorveglianza della TB farmacoresistente in Italia saranno inviati annualmente al Ministero della Salute, il quale li trasmetterà all'ECDC.

- Identificazione di nuovi farmaci, singoli e in combinazione, attivi verso i ceppi MDR/XDR.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati di queste attività saranno presentati in comunicazioni a congresso e in pubblicazioni scientifiche. I laboratori coinvolti in questo studio sono stati e verranno sempre informati sulle attività del Progetto allo scopo di mantenere e stimolare ancora di più l'interesse e la collaborazione verso queste attività del Ministero della Salute/ISS.

### **Sorveglianza delle forme cliniche neurologiche associate a virus trasmessi da artropodi e studio dei focolai naturali**

Negli ultimi anni, nel nostro Paese, l'aumento della temperatura ambientale ha provocato una maggiore densità delle popolazioni degli artropodi vettori con aumento dei casi di infezione. Anche i flussi migratori di alcune specie di uccelli dovrebbero aver svolto un ruolo importante nella ricomparsa di alcuni Arbovirus. Dal 2008 al 2011 sono stati registrati 42 casi di malattia neurologica da virus *West Nile* (WN) in cinque Regioni italiane. Nel 2009 sono stati riportati in Emilia Romagna i primi due casi di malattia neuroinvasiva da Usutu, Flavivirus correlato con il virus dell'encefalite giapponese (*Japanese Encephalitis Virus*, JEV) e il WN. È un Flavivirus anche il *Tick-borne encephalitis* (TBE), di cui si registrano ogni anno casi nel Nord-Italia. Tra i virus circolanti in Italia, responsabili di malattia neurologica, è un importante patogeno il Phlebovirus, Toscana (TOS), di cui, annualmente, si verificano casi in Regioni con presenza di flebotomi. È poi da considerare la possibile importazione di virus come il JEV e il virus *Rift Valley*, che sono per il nostro Paese una potenziale minaccia.

Obiettivi di questo studio:

- Valutazione del ruolo dei virus trasmessi da artropodi in casi di malattia neurologica.
- Caratterizzazione dei focolai naturali e analisi molecolare degli isolati.
- Valutazione del rischio occupazionale di infezioni virali vettori-trasmesse.
- Studio delle relazioni virus/vettore: valutazione della competenza vettoriale e dei meccanismi di trasmissione virale.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Si prevedono i seguenti risultati:

- Incremento della percentuale di diagnosi di casi di malattia neurologica causata da virus trasmessi da artropodi e in particolare virus TBE, WN, Usutu e virus Toscana.
- Definizione una mappa di rischio dell'infezione da virus trasmessi da artropodi in seguito al monitoraggio dell'infezione dei vettori nei focolai.
- Associazione di sintomatologie cliniche di differente entità con diverse varianti virali.
- Valutazione del rischio occupazionale in gruppi di forestali, agricoltori e allevatori che esercitano il loro lavoro in Regioni italiane in cui la circolazione di Flavivirus e Phlebovirus è già nota.
- Valutazione degli effetti della temperatura sui meccanismi molecolari e biochimici coinvolti nella competenza vettoriale e sui meccanismi di mantenimento dei virus nelle specie di artropodi circolanti in Italia.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- Disponibilità di metodi biologici e molecolari per il rilevamento di virus trasmessi da artropodi in campioni biologici.

- Disponibilità di metodi per la valutazione diagnostica in grado di discriminare tra i vari virus anche in caso di *cross*-reazioni.
- Valutazioni di nuove tecnologie che possono essere utilizzate per il rilevamento virale e per il miglioramento della capacità diagnostica.
- Elaborazione di misure di prevenzione, raccomandazioni e specifiche procedure per la tutela della salute dei lavoratori del settore agricolo-forestale esposti alla puntura di artropodi vettori.
- Diffusione dei risultati ottenuti mediante pubblicazioni su riviste scientifiche e partecipazione a convegni.

### **Sorveglianza delle infezioni da *Clostridium difficile* (CDI), aspetti epidemiologici e microbiologici**

In Italia non esiste un sistema di sorveglianza nazionale di queste infezioni, come accade in altri Paesi europei e in America. La necessità di disporre di un sistema di sorveglianza di queste infezioni è sottolineata dall'ECDC che ha recentemente avviato un progetto per migliorare la capacità dei Paesi membri di condurre la sorveglianza delle CDI, attraverso un'azione mirata a promuovere la capacità diagnostica di laboratorio e a definire un protocollo comune europeo.

Il Progetto, coordinato dall'Agenzia Sanitaria dell'Emilia Romagna, prevede l'attivazione di una sorveglianza pilota in alcune Regioni italiane per monitorare il trend epidemiologico della malattia, per caratterizzare i ribotipi prevalenti, per identificare tempestivamente la circolazione di ceppi ipervirulenti.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Dati epidemiologici sulla reale frequenza di CDI in alcune Regioni italiane, sui gruppi di popolazione/ambiti assistenziali più interessati, sulla tipologia di ceppi circolanti, sulla frequenza e caratteristiche degli eventi epidemici.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati verranno condivisi con le regioni interessate e con i laboratori ospedalieri di microbiologia. Inoltre, verranno trasmessi a tutte le altre Regioni italiane proponendo un protocollo nazionale di sorveglianza delle infezioni da *Clostridium difficile*.

Presentazioni a congressi nazionali e internazionali.

Pubblicazioni scientifiche su riviste nazionali e internazionali interessate alle infezioni ospedaliere.

### **Sorveglianza delle infezioni sostenute da *Bordetella pertussis* in ambito ECDC: identificazione di una rete di laboratori sul territorio nazionale per implementare la diagnosi della pertosse microbiologica e sierologica.**

L'aumento nel numero di casi di pertosse dovuta alla presunta diminuita protezione indotta dalla vaccinazione con i vaccini acellulari e alla circolazione di ceppi di *B. pertussis* varianti e l'aumento nel numero di casi tra gli adolescenti e adulti definiscono la pertosse una malattia re-emergente in diversi Paesi europei. Il confronto con questi richiede di implementare nel nostro Paese la capacità diagnostica, lo studio delle varianti dei ceppi circolanti, l'immunità protettiva nella popolazione e studiare l'impatto di questi cambiamenti sulla prevenzione e incidenza della malattia per valutazioni strategiche in ambito di sanità pubblica.

Questa è un'azione concertata in cooperazione con l'ECDC e nell'ambito delle reti europee che si occupano della sorveglianza delle malattie prevenibili con le vaccinazioni per l'infanzia. A livello europeo l'Italia è uno dei pochi Paesi che affida alla sola clinica la diagnosi di questa malattia infettiva. In ottemperanza delle direttive comunitarie, per valutare a livello nazionale ed europeo l'efficacia dei programmi vaccinali è in atto una variazione delle normative per introdurre anche in Italia una definizione di caso di pertosse, basata sulla conferma di laboratorio della diagnosi clinica. L'obiettivo è di uniformare i criteri diagnostici a livello europeo per avere un quadro più preciso dell'incidenza per questa patologia che ancora miete vittime in Europa soprattutto nella primissima infanzia.

#### **Risultati attesi nel triennio**

In quest'ambito, come *Lab contact person* dell'ECDC si intende verificare la capacità diagnostica dei laboratori attivi nell'SSN, di verificare a livello nazionale il tipo di diagnostica utilizzata e se questa diagnostica sia efficace, assistita da adeguati controlli di qualità e conforme alle richieste europee.

Abbiamo fatto una ricognizione dei laboratori in grado di fare diagnosi di pertosse per tracciare una rete che copra efficacemente tutto il territorio nazionale. Quindi si procederà all'introduzione o miglioramento della routine diagnostica e all'organizzazione di incontri per introdurre linee guida e criteri di accettabilità comuni per la conferma di laboratorio della diagnosi di pertosse in accordo alle linee guida dell'ECDC, in via di definizione. Si dovranno organizzare in ISS controlli di qualità, per le metodiche diagnostiche raccomandate dall'ECDC.

Parallelamente, abbiamo implementato in ISS la determinazione sierologica per la diagnosi di pertosse. La metodica è e sarà sottoposta a una continua validazione a livello europeo attraverso la partecipazione a programmi di *External Quality Assessment* (EQA). A livello europeo e nazionale c'è una grande eterogeneità sui metodi di laboratorio impiegati, è quindi necessario implementare una standardizzazione e armonizzazione dei criteri diagnostici utilizzati. Organizzeremo anche studi di sieroprevalenza sul territorio nazionale in collaborazione con i colleghi europei in modo da dare stime più attendibili sull'incidenza della malattia.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Rendere più accessibile e omogenea sul territorio italiano la capacità diagnostica per la pertosse per ottenere dati di incidenza più attendibili. Per ottemperare alle richieste europee è necessario anche in Italia una definizione dei casi di pertosse comune, basata sulla conferma di laboratorio. L'ECDC ha sottolineato l'importanza della conferma di laboratorio per la diagnosi di pertosse sia per il trattamento, la prevenzione e la sorveglianza. La partecipazione a studi di sieroprevalenza organizzati a livello europeo permetterà inoltre di definire meglio la diffusione della pertosse nella categorie più a rischio quali i neonati, dare stime di incidenza più attendibili ed eventualmente suggerire politiche vaccinali più efficaci sul territorio e in armonia con l'Europa.

Questa sorveglianza è iniziata nel triennio precedente ed è finanziata dal Ministero della Salute (CCM).

### **Sorveglianza delle malattie di importazione causate da virus trasmessi da artropodi**

La diffusione del turismo di massa in zone tropicali, la facilità di trasporto ha portato ad un incremento del numero di casi di malattia causata da virus cosiddetti "esotici", in particolare ad un aumento delle malattie trasmesse all'uomo dalla puntura di artropodi, in particolare zanzare.

La febbre di dengue e la dengue emorragica/dengue shock sindrome, (causate da quattro virus strettamente correlati appartenenti al genere *Flavivirus* della famiglia *Flaviviridae*), sono le più importanti tra queste malattie. La diffusione geografica comprende tutta l'America, l'Africa, l'Asia e l'Australia. Nelle stesse aree sono inoltre presenti altri virus patogeni per l'uomo tutti da considerare "emergenti" (il virus Chikungunya, il WN, il JEV) o "riemergenti", (Febbre Gialla). La diagnosi deve quindi essere confermata mediante analisi di laboratorio ed è basata su metodi *in house*, data l'assenza o l'elevato costo e la scarsa affidabilità dei kit commerciali.

Ogni anno arrivano in ISS circa un centinaio di richieste di diagnosi, ma è probabile che questo numero rappresenti solo una minoranza dei casi effettivi.

Attualmente il Reparto agisce da Laboratorio Nazionale di Riferimento per Dengue, Chikungunya e WN. In tale ambito, continuerà l'attività diagnostica sui campioni di pazienti che arriveranno tramite l'SSN.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Ci si attende:

- un incremento del numero degli ospedali che richiedono diagnosi (attualmente la quasi totalità delle richieste proviene da pochi ospedali, per lo più del Veneto e della Lombardia);
- un incremento della percentuale di diagnosi delle malattie infettive dei viaggiatori.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Miglioramento della capacità di diagnosi delle malattie infettive dei viaggiatori.

### **Sorveglianza di laboratorio della farmacoresistenza di *Neisseria gonorrhoeae* come malattia emergente: implementazione della rete di laboratori sul territorio nazionale e caratterizzazione microbiologica dei ceppi farmacoresistenti come richiesto da sorveglianza europea**

La letteratura scientifica ha, negli ultimi anni, evidenziato la diffusione di ceppi di *Neisseria gonorrhoeae* resistenti a uno o più antibiotici, considerando ormai il patogeno come emergente. In Europa si sta implementando il sistema di sorveglianza per gonorrea antibioticoresistente, considerata una importante infezione batterica a trasmissione sessuale. La situazione attuale e l'attuazione di piani specifici di monitoraggio a livello europeo richiedono una implementazione anche nel nostro Paese di una sorveglianza di laboratorio per la raccolta e per l'analisi microbiologica dei ceppi di gonorrea.

Il presente progetto si propone, quindi, di sviluppare e implementare la sorveglianza di laboratorio per i ceppi di *N. gonorrhoeae* antibiotico-resistenti. In particolare, si propone di valutare: i) la disseminazione dei ceppi di gonococco antibioticoresistenti; ii) la disseminazione dei ceppi di gonococco antibioticoresistenti in soggetti vulnerabili; iii) cloni emergenti.

Le soluzioni proposte nello studio sono: i) la determinazione dei valori di sensibilità verso un pannello di antibiotici comprendente anche le cefalosporine; ii) la determinazione di caratteristiche demografiche e/o cliniche che rendano più suscettibili alla malattia; iii) la determinazione della clonalità dei ceppi antibiotico resistenti, attraverso analisi molecolari specifiche che possano evidenziare la loro appartenenza a cloni già identificati in altri Paesi.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Si attendono i seguenti risultati:

- Incrementare e migliorare la raccolta di dati nazionali sull'antibioticoresistenza in gonorrea individuando strutture di laboratorio potenzialmente arruolabili nelle Regioni già coinvolte nel Progetto, o in altre, geograficamente rappresentative del territorio

nazionale. Creare un supporto qualificato attraverso l'aggiornamento continuo, e la realizzazione e diffusione di protocolli opportunamente validati e condivisi.

- Raccogliere i ceppi di *Neisseria gonorrhoeae* isolati da diversi campioni clinici e collezionarli presso l'ISS, Dipartimento MIPI per le indagini microbiologiche.
- Monitorare la suscettibilità a diversi antibiotici, seguendo i *breakpoint* suggeriti da EUCAST e fornire, a tutti coloro che lo richiederanno, le procedure standardizzate, training clinico/microbiologici e il materiale di riferimento, quali ceppi di gonorrea di riferimento, per i tests di antibiotico sensibilità.
- Individuare cloni emergenti attraverso una tipizzazione molecolare capace di categorizzare i ceppi seguendo nomenclature accettate a livello internazionale.
- Trasmettere i dati di farmacoresistenza alle Regioni partecipanti in modo da diffondere la conoscenza tra gli operatori sanitari coinvolti nella diagnosi e cura della gonorrea, e alla partecipazione all'invio dei dati ad organismi internazionali quali l'ECDC.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti da questo progetto avranno una ricaduta non solo come realizzazione di una rete di monitoraggio su tutto il territorio nazionale per l'isolamento dei ceppi di *Neisseria gonorrhoeae* ma anche come flusso di informazioni microbiologiche e epidemiologiche, tra i centri periferici e il centro di coordinamento presso l'ISS. Questo studio permetterà attraverso la pubblicazioni di lavori scientifici e presentazioni a congressi nazionali e internazionali di migliorare la conoscenza dei dati relativi alla circolazione di ceppi di gonococco resistenti o multiresistenti agli antimicrobici nel nostro Paese, per implementare una sorveglianza specifica per le resistenze antimicrobiche di questo patogeno, alla luce di dati internazionali che le riportino in progressivo aumento. Questi obiettivi sono anche quelli considerati di primario interesse nel mandato che l'ECDC sta portando avanti nell'ultimo periodo.

#### **Sorveglianza di laboratorio delle malattie prevenibili da vaccinazioni e rinforzo del Piano di eliminazione del morbillo e della rosolia congenita**

Nel 2001 la WHO ha messo a punto un piano strategico per assicurare a livello mondiale la riduzione della mortalità da morbillo, e compiere progressi significativi verso l'interruzione della sua trasmissione nelle aree in cui è prevista l'eliminazione della malattia, come l'Europa. L'attuale obiettivo della regione europea della WHO, infatti, è certificare l'eliminazione entro il 2015.

Tale piano è stato recepito dall'Italia con l'emanazione di un "Piano nazionale per l'eliminazione del morbillo e della rosolia congenita (PNEMoRc) 2010-2015", nel quale il Reparto Malattie virali e vaccini attenuati del Dipartimento MIPI dell'ISS è stato identificato come LNR. Per lo svolgimento di tale compito, a seguito di segnalazione si procederà alla raccolta dei campioni clinici che saranno recapitati al laboratorio virologico regionale, se questo ha capacità per effettuare isolamenti virali, o direttamente all'ISS. Si procederà poi all'isolamento e al sequenziamento virale, e/o alla diagnosi sierologica. Le sequenze del genoma virale saranno analizzate per la tipizzazione dei ceppi. L'ISS funge da centro di riferimento nazionale per la diagnosi di laboratorio del morbillo e della rosolia congenita, e come tale, effettuerà la tipizzazione dei ceppi virali e l'isolamento e la diagnosi sierologica per quelle Regioni che non dispongono di laboratori regionali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Sarà possibile costruire una mappa di distribuzione dei genotipi virali presenti in Italia. Tale mappa sarà continuamente aggiornata per identificare l'avvenuta interruzione della

trasmissione locale del virus del morbillo (secondo gli obiettivi del piano di eradicazione WHO). Sarà inoltre possibile valutare l'impatto della vaccinazione sulla circolazione di ceppi selvaggi e individuare casi importati.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La mappa della circolazione del morbillo e della rosolia permetterà di aggiornare valutare ed eventualmente modificare le strategie di vaccinazione.

### **Sorveglianza e prevenzione di virus dell'influenza suina in animali da allevamento e in lavoratori esposti**

I ceppi influenzali pandemici originano da specie animali. Tra queste il suino gioca un ruolo cruciale nella trasmissione interspecie dei virus influenzali di tipo A, e soprattutto nell'emergenza di nuovi ceppi influenzali, come il virus A/H1N1 (noto inizialmente come "influenza suina") emerso nell'aprile 2009 nella popolazione umana. In Italia l'infezione da virus influenzali è largamente diffusa negli allevamenti suinicoli dell'Italia settentrionale ed è sostenuta da tre distinti sottotipi virali circolanti in Europa H1N1 e H3N2, che nel corso degli anni sono andati incontro a fenomeni di *drift* antigenico e di riassortimento con acquisizione di geni aviari, e il più recente H1N2, che è probabilmente originato da fenomeni di riassortimento, tra virus umani, aviari e suini. Il progetto si propone di attivare un piano di sorveglianza a livello nazionale per sperimentare un sistema che consenta di evidenziare precocemente negli animali eventuali stipiti influenzali potenzialmente in grado di infettare l'uomo. Inoltre, si propone di attuare uno studio sierologico-epidemiologico in operatori del settore zootecnico (tecnici e medici veterinari) potenzialmente esposti ai medesimi virus influenzali, al fine di individuare misure di prevenzione e controllo in ambito occupazionale.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto si propone di:

- valutare il rischio biologico negli allevamenti suinicoli coinvolti nello studio, attraverso la ricerca di anticorpi sierici, specifici verso l'influenza suina, sia in lavoratori del comparto zootecnico professionalmente esposti al contagio sia in controlli non esposti;
- quantificare, attraverso la somministrazione di un questionario, il rischio biologico negli allevamenti suinicoli coinvolti nello studio, attraverso una valutazione del ruolo di fattori lavorativi, extralavorativi, individuali e ambientali nel modulare la positività anticorpale nei confronti dei virus influenzali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I dati ottenuti potranno avere evidenti ricadute in sanità pubblica fornendo anche indicazioni utili al miglioramento delle attività di prevenzione e controllo, con particolare riferimento al passaggio all'uomo di virus influenzali con potenziale pandemico. Il raggiungimento degli obiettivi proposti contribuirà ad una migliore pianificazione degli interventi preventivi sia in ambito veterinario che di sanità pubblica.

### **Staphylococcus aureus resistente alla meticillina (MRSA) come patogeno nosocomiale, comunitario e zoonosico**

Benché l'MRSA sia stato considerato il prototipo dei patogeni nosocomiali multi-resistenti, negli ultimi anni sono emersi particolari ceppi cosiddetti di comunità, *Community Associated MRSA (CA-MRSA)*, capaci di causare infezioni in soggetti senza fattori di rischio e senza contatti con le strutture sanitarie di assistenza. Inoltre sono stati evidenziati ceppi MRSA che colonizzano animali da allevamento, soprattutto suini, ma anche bovini,

polli e cavalli, e hanno la potenzialità di trasmettersi all'uomo. Questi ceppi sono stati definiti *livestock-associated* MRSA (LA-MRSA) e sono stati identificati come colonizzatori e responsabili di infezioni in individui esposti professionalmente o che vivono in prossimità di animali da allevamento. I ceppi CA-MRSA e quelli LA-MRSA si differenziano da quelli nosocomiali per una serie di caratteristiche microbiologiche oltre che epidemiologiche, in quanto posseggono marcatori genotipici e fattori di virulenza diversi. L'identificazione del tipo e dell'origine dei ceppi MRSA che colonizzano o infettano l'uomo è pertanto più complessa che nel passato ma è estremamente importante ai fini epidemiologici e di controllo della diffusione dei ceppi MRSA.

Lo scopo del progetto è quello di seguire l'evoluzione dei cloni MRSA più comuni nel nostro Paese, confrontandoli con quelli identificati nel progetto precedente e di individuare mediante marcatori genotipici i ceppi CA-MRSA e LA-MRSA.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio renderà possibile seguire il trend epidemiologico dei cloni di MRSA circolanti in Italia con particolare riguardo ai cloni responsabili di infezioni ospedaliere, di quelli di comunità e di quelli di probabile origine zoonotica. I risultati specifici consisteranno in:

- Relazione tra i cloni circolanti in ambito ospedaliero e comunitario. Questo dato è necessario alla comprensione dei flussi di ceppi tra i diversi ambiti, attraverso portatori nasali di MRSA (ad esempio soggetti dimessi dall'ospedale, o che vengono assistiti in regime di day hospital ecc., soggetti esposti ad animali di allevamento ecc.).
- Confronto con la circolazione di cloni in Europa e a livello globale. È noto che esiste un numero limitato di cloni MRSA diffusi a livello globale. D'altra parte, relativamente ai CA-MRSA e LA-MRSA esistono differenze tra Europa e resto del mondo e anche differenze che riguardano specificatamente l'Italia.
- Valutazione dei fattori di virulenza presenti nei ceppi in studio e relazione con la diffusione e/o trasmissibilità dei ceppi. Questo dato può contribuire a riconoscere rapidamente cloni più "pericolosi" verso i quali è necessario mettere in atto misure più stringenti di controllo della trasmissione.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti dal progetto saranno trasmessi all'SSN attraverso veicoli di ampia diffusione quali pubblicazioni dell'ISS o report *ad hoc*. La conoscenza dell'origine e della circolazione di questo importante patogeno, spesso multi-resistente è fondamentale per implementare protocolli e linee guida per il controllo delle infezioni da MRSA in ambienti diversi quali ospedali, altre strutture di assistenza sanitaria quali centri di riabilitazione e case di riposo e la comunità. I risultati riguardanti aspetti particolari collegati con i fattori di virulenza dei cloni saranno comunicati alla comunità scientifica internazionale mediante pubblicazioni su riviste indicizzate nel campo della microbiologia, biologia molecolare e infettivologia.

### **Stima dell'incidenza di HIV in individui con IST utilizzando l'indice di avidità (Avidity Index, AI) anti-HIV**

Identificare le infezioni recenti HIV in soggetti con IST misurando l'AI in un campione di siero. Partecipano allo studio sette centri clinici IST e cinque laboratori specializzati di virologia.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Stimare l'incidenza di HIV in pazienti con IST; ottenere informazioni socio-demografiche e cliniche associate alle infezioni recenti; ottenere informazioni sui ceppi virali di HIV circolanti e sulle resistenze ai farmaci antiretrovirali

### **Trasferibilità dei risultati**

Misurare l'incidenza di HIV utilizzando il test AI in tutti i soggetti con una nuova diagnosi di infezione da HIV applicandolo alla sorveglianza nazionale HIV. Valutare l'efficacia della prevenzione e degli interventi di controllo dell'infezione da HIV.

### **Strategie per migliorare l'immunogenicità del vaccino antinfluenzale**

Il rischio di insorgenza di pandemie originate da virus influenzali altamente patogeni è motivo di apprensione e comporta una costante azione di sorveglianza virologica nella popolazione umana e in altre specie animali. Il carattere altamente virulento di alcuni ceppi impone inoltre la preparazione di piani pre-pandemici che includano programmi di studio dedicati sia alla patogenesi che a forme straordinarie di profilassi vaccinale e di intervento farmacologico, come ad esempio il progetto UNIFLUVAC ancora in corso. Strategie in grado di migliorare l'efficacia del vaccino influenzale sono anche oggetto dello studio intrapreso nell'ambito del progetto CEE-FP7, "Identification of Mechanisms Correlating with Susceptibility for Avian Influenza" (IMECS). Parte di questo studio è mirato sia a stabilire relazioni di cross-reattività della risposta immune tra virus influenzali che all'identificazione di sostanze immunomodulanti in grado di favorire la *cross*-presentazione di vaccini inattivati e migliorare così il richiamo di linfociti T CD8+ ad azione antivirale. Il miglioramento di strategie di immunizzazione capaci di stimolare sulle mucose respiratorie una risposta anticorpale e cellulare verso proteine interne conservate del virus influenzale può incrementare significativamente l'immunità cross-protettiva nei riguardi dei diversi ceppi influenzali ed essere di importanza critica nell'efficacia delle campagne vaccinali contro virus influenzali altamente virulenti.

### **Risultati attesi nel triennio**

Alcuni nostri studi condotti in collaborazione con altri gruppi dimostrano che l'immunizzazione con proteine solubili o virus influenzali interi inattivati, combinata al trattamento con il farmaco antimalarico cloroquina, è in grado di stimolare efficacemente una risposta primaria di linfociti T citotossici. Questo farmaco è capace di migliorare la *cross*-presentazione di antigeni esogeni e costituisce prova del principio secondo cui una diminuzione della cinetica di degradazione degli antigeni può favorirne l'immunogenicità. Ulteriori studi sono necessari per valutare gli effetti della cloroquina in schemi di immunizzazioni ripetute con virus influenzali inattivati, ivi incluse altre droghe con azioni simili alla cloroquina. Tentativi di migliorare l'immunogenicità del vaccino influenzale sono anche da noi perseguiti attraverso lo sviluppo di vettori virali o anche di virus ingegnerizzati con proprietà biologiche modificate e in grado di indurre una efficace immunità umorale e cellulare, tali da poter essere utilizzati quali master strains nelle preparazioni vaccinali. L'applicazione di metodi e criteri di valutazione della risposta immune, basati sull'utilizzo di virus influenzali ricombinanti, animali transgenici e ceppi con diverso grado di virulenza, potrà inoltre consentire una dettagliata analisi delle proprietà antigeniche e immunogeniche di candidati vaccini influenzali.

### **Trasferibilità dei risultati**

Gli studi sopra descritti riprendono aspetti rilevanti della profilassi vaccinale all'influenza, riguardanti in particolare la comprensione di meccanismi che migliorino la *cross*-presentazione di vaccini non replicanti, attraverso possibili influenze su questo processo da parte di farmaci immunomodulanti, e mediante tentativi di ingegnerizzare nuovi ceppi virali utili a garantire l'induzione di una più efficiente immunità protettiva. L'esigenza di perseguire nuove ed efficaci strategie vaccinali riveste grande importanza nella medicina preventiva e può offrire ricadute sull'SSN sia in termini di nuove conoscenze che di natura

applicativa. L'individuazione di strategie favorevoli la risposta immune, particolarmente nei riguardi di una risposta cellulo-mediata, rappresenta un importante obiettivo per migliorare la vaccinazione antinfluenzale anche nell'ipotesi di comparsa di nuovi ceppi pandemici.

### **Studio degli effetti immunomodulatori dei farmaci antifungini**

Studi recenti hanno riconsiderato le proprietà immunomodulatorie dell'amfotericina B (AmB).

La capacità dell'AmB deossicolato di stimolare la produzione di citochine pro-infiammatorie da parte delle cellule dell'immunità innata è stata correlata sia agli eventi avversi legati alla somministrazione di questo farmaco che alla modulazione della risposta immunitaria alle infezioni fungine. Al contrario AmB in forma liposomiale attenua la risposta pro-infiammatoria e parallelamente induce eventi avversi più lievi.

Il nostro studio intende analizzare l'interazione di AmB in diverse formulazioni con cellule dell'immunità innata e adattativa con l'obiettivo di verificare se tale farmaco modula la risposta Th17 alla *Candida albicans* che gioca un ruolo fondamentale nelle risposte alle infezioni fungine.

Saranno eseguiti i seguenti esperimenti:

- Misurazione di citochine infiammatorie, anti-infiammatorie e prostanoide da parte di cellule dell'immunità innata infettate con *Candida albicans* in presenza di diverse formulazioni di AmB o di fluconazolo.
- Analisi degli effetti di diverse formulazioni di AmB su cellule T umane. Saranno misurate proliferazione e produzione di citochine Th1/Th2/Th17.
- Analisi del profilo citochinico di cellule T isolate da pazienti con infezioni fungine invasive in trattamento con diverse formulazioni di AmB o con altri antifungini.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati che si prevede verranno ottenuti in seguito allo svolgimento di questo studio sono:

- Valutazione degli effetti immunomodulatori di diverse formulazioni di AmB e di un'altra classe di farmaci antifungini (fluconazolo).
- Identificazione di un farmaco antifungino in grado di stimolare una risposta Th17 cruciale per la difesa dell'ospite contro le infezioni fungine.
- Elucidazione dell'immunofarmacologia di tali farmaci al fine di contribuire ad un disegno razionale terapeutico per le infezioni fungine.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti possono porre le basi per un approccio terapeutico razionale per le infezioni fungine, sfruttando le proprietà immunomodulatorie dei farmaci antifungini come alternativa pratica nel trattamento delle infezioni invasive.

La diffusione dei risultati avverrà attraverso i canali standard come la pubblicazione su riviste internazionali di forte impatto, l'invio di abstract a congressi nazionali e internazionali.

### **Studio dei fattori di trascrizione coinvolti nel differenziamento delle cellule Th17, Th9 e T regolatorie umane**

Gli IFN, oltre alla loro più nota attività antivirale, sono citochine ad attività immunomodulatoria e antitumorale e sono attualmente tra le citochine più utilizzate in pazienti oncologici. Tra i geni effettori delle risposte agli IFN, IRF1 è un fattore di trascrizione pleiotropico in grado di regolare diverse risposte cellulari. Nostri dati recenti

hanno evidenziato un ruolo cruciale di IRF-1 nello sviluppo delle cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Treg). In particolare, è stato descritto un ruolo diretto di IRF-1 sull'inibizione della trascrizione del gene Foxp3. Le cellule CD4<sup>+</sup> T *Helper* secernenti IL-17 Th17 sono state definite come sottopopolazione di cellule proinfiammatorie il cui sviluppo dipende da IL-6, TGF-beta, IL-21, e dal fattore di trascrizione RORgt. Dati recenti hanno messo in luce un antagonismo molecolare e una plasticità nei programmi di differenziamento delle cellule Th, tra cui Th9 e Th17 e delle cellule Treg indotte nel periferico. Le Th9 sono state recentemente ridefinite come un nuovo lineage CD4<sup>+</sup> T *Helper* indotto a differenziare e a produrre IL-9 tramite TGF-beta e IL-4. Inoltre è stato recentemente dimostrato che IL-9 è trascrizionalmente controllata da IRF-4. Obiettivo del progetto è pertanto lo studio del possibile ruolo di IRF-1 e di altri IRF nel differenziamento delle cellule Th17 e Th9 in relazione al suo ruolo esercitato sulle Treg nel sangue periferico umano.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Sono attesi i seguenti risultati:

- Studio del fenotipo delle popolazioni di cellule Treg Th17 e Th9 ottenute, e analisi dell'espressione di IRF-1 in relazione ai marcatori molecolari relativi.
- Determinazione del differenziamento delle cellule Th17 e Th9 in relazione alla modulazione dell'espressione di IRF1 mediante vettori lentivirali ingegnerizzati per l'espressione ectopica o silenziamento dello stesso gene.
- Individuazione di sequenze *consensus* regolatorie responsive al fattore di trascrizione IRF-1 nella sequenza 5'-UTR promotore dei gene RORgt e RORa e relativa valutazione della capacità di legame sui siti *in vivo* e *in vitro*. Saggi funzionali che dimostreranno il ruolo diretto di IRF-1 sulla trascrizione dei geni chiave per lo sviluppo delle Th17.
- Valutazione del ruolo diretto di IRF1 e altri IRF sulla trascrizione dei geni chiave per lo sviluppo delle Th9 tramite saggi funzionali di espressione.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'uso di cellule Th altamente specializzate manipolate *in vitro* rappresenta uno strumento potenzialmente molto efficace per la terapia di diverse patologie e sperimentazioni cliniche che sono già in atto. Gli studi proposti tendono a stabilire se il fattore di trascrizione IRF1, notoriamente Th1, possa essere efficacemente utilizzato come un bersaglio molecolare e strumento per modulare simultaneamente l'attività delle cellule Treg, Th17 e di cellule Th9. I risultati ottenuti permetteranno di sviluppare reagenti specifici quali siRNA interferenti o vettori di espressione in grado di reprimere un eccessivo sviluppo di cellule T reattive e/o cellule immunogeniche favorendo allo stesso tempo lo sviluppo di una marcata risposta T soppressoria e viceversa.

#### **Studio dei meccanismi di farmacoresistenza fenotipica in Mtb**

Mtb infetta un terzo della popolazione umana, con circa nove milioni di nuovi casi per anno. Il trattamento farmacologico prevede un mix di antibiotici della durata di sei mesi. Negli ultimi anni, l'insorgere di ceppi resistenti, multiresistenti (MDR) ed estremamente resistenti (XDR), principalmente dovuti a una scarsa aderenza alla terapia, è una delle principali minacce per il controllo di questa malattia. Oltre all'insorgere di ceppi geneticamente resistenti, una tematica molto meno studiata ma altrettanto importante riguarda la cosiddetta persistenza, che consiste in una resistenza ai farmaci non su base genetica ma esclusivamente fenotipica, e quindi transiente e non trasmissibile. In una popolazione batterica esistono cellule che si trovano in uno stato fisiologico particolare, non replicativo o dormiente, che in presenza di farmaco non vengono uccise. Tali batteri tuttavia,

se piastrati su un terreno solido contenente farmaco, a differenza dei genotipicamente resistenti, non sviluppano colonie. Tale fenomeno è stato particolarmente studiato in *E. coli*, mentre poco si sa su Mtb. Per caratterizzare microbiologicamente il fenomeno e capire i meccanismi molecolari della persistenza in Mtb verranno fatti i seguenti studi microbiologici e di espressione genica su popolazioni di cellule persistenti.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Si seguiranno i seguenti approcci sperimentali: i) incubazione di Mtb aerobio, in fase logaritmica e stazionaria o dormiente anaerobio con alte dosi di farmaco (rifampicina, moxifloxacina) per verificare il numero di cellule persistenti nelle diverse condizioni; ii) estrazione di RNA da cellule persistenti e caratterizzazione della loro espressione genica; iii) incubazione di Mtb con basse dosi di farmaco e successiva aggiunta di alte dosi per verificare l'inducibilità della persistenza; iv) studio dell'espressione genica di popolazioni indotte da basse dosi di farmaco per identificare i geni responsabili della persistenza per ogni farmaco, con particolare attenzione a identificare meccanismi di risposta già studiati in altri microrganismi.

Come in molte altre specie batteriche, in una numerosa popolazione di Mtb in coltura è attesa una percentuale di cellule persistenti, che dovrebbe variare con lo stato replicativo del batterio. Inoltre, studi utilizzando la moxifloxacina dovrebbero evidenziare un'affinità dei meccanismi di persistenza a livello genico con *E. coli*, in particolare il ruolo fondamentale della risposta SOS e dei geni *recA* e *lexA* che la regolano. In *E. coli* è stato inoltre osservata un'inducibilità della risposta SOS in presenza di basse dosi di farmaco, e sarà interessante verificare la presenza di questa induzione in Mtb. Infine si verificherà se tale risposta SOS è responsabile anche della persistenza a farmaci di prima linea, come ad esempio la rifampicina.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati di questi studi saranno divulgati con pubblicazioni e comunicazioni a congressi. Questi studi permetteranno di chiarire alcune caratteristiche fondamentali del micobatterio persistente, come il suo stato fisiologico, tramite lo studio dell'espressione genica, ma soprattutto l'identificazione dei geni coinvolti direttamente in questo fenomeno. Tale approccio potrà portare in futuro all'identificazione di farmaci nuovi capaci di andare a colpire specificamente le cellule persistenti.

### **Studio del proteoma espresso dallo stadio di oociste/sporozoita del protozoo parassita *Toxoplasma gondii***

*Toxoplasma gondii* è un protozoo parassita intracellulare del *Phylum Apicomplexa* che può causare aborto o gravi anomalie fetali, nonché encefaliti mortali in soggetti immunocompromessi. La rilevanza clinica della toxoplasmosi deriva dall'assenza di un vaccino, dall'impossibilità di diagnosticare la forma cronica dell'infezione e dalla parziale efficacia dei farmaci. Ciò suggerisce di espandere le conoscenze sui repertori molecolari espressi dagli stadi infettivi di *T. gondii*, onde facilitare lo sviluppo di nuove strategie di controllo. Il presente progetto mira alla definizione del proteoma espresso dall'ooziste/sporozoita, stadio che, sebbene responsabile della trasmissione ambientale della toxoplasmosi, è scarsamente caratterizzato a livello molecolare. L'analisi proteomica verrà condotta usando tecniche elettroforetiche mono- e bi-dimensionali associate a spettrometria di massa LC MS-MS. Saranno analizzati lisati proteici totali ottenuti da parassiti a diverso grado di maturazione, includendo cioè oocisti non sporulate e oocisti mature contenenti gli otto sporozoitii infettanti. L'identificazione di un ampio numero di proteine permetterà di ottenere la prima mappa proteomica globale dell'ooziste/sporozoita. Ciò metterà in luce gli

aspetti salienti e quelli peculiari della biologia di questo stadio epidemiologicamente assai rilevante e consentirà di selezionare proteine di particolare interesse per studi molecolari mirati.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Identificazione di un numero di proteine espresse dall'ooziste/sporozoita compreso fra 1.500 e 3.000 specie molecolari distinte.
- Identificazione di proteine specifiche dello stadio di ooziste/sporozoita.
- Definizione dei repertori proteici implicati in processi particolarmente rilevanti quali l'interazione con la cellula ospite, il processo di invasione, il metabolismo di molecole essenziali per la sopravvivenza del parassita e la resistenza ambientale dell'ooziste.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La caratterizzazione di un ampio spettro di proteine di *Toxoplasma gondii* espresse nello stadio di ooziste/sporozoita consentirà di espandere significativamente le attuali conoscenze di base su questo parassita. Più specificamente la disponibilità del proteoma dell'ooziste/sporozoita consentirà: i) di identificare nuovi antigeni per la messa a punto di un test sierologico in grado di stabilire se l'infezione è stata contratta tramite l'ingestione di oocisti piuttosto che tramite il consumo di carni contenenti cisti tissutali e ii) di identificare nuovi bersagli farmacologici o vaccinali.

### **Studio della diffusione delle IST in Italia**

Due reti sentinella: i) basata su 12 centri clinici per le IST che riporta i dati di pazienti sintomatici con IST; ii) basata su 13 laboratori di microbiologia che riportano i risultati di tutti i test effettuati per la ricerca di clamidia, gonococco, trichomonas.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Descrizione accurata e rappresentativa della diffusione delle IST in Italia; analisi e interpretazione degli andamenti delle IST in termini di tempo, di specifiche aree geografiche e di particolari caratteristiche socio-demografiche; identificazione dei fattori di rischio associati alle IST; monitoraggio dell'infezione da HIV in pazienti con IST.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Promuovere il miglioramento della qualità degli interventi di controllo mediante la diffusione di linee guida nazionali e specifici protocolli di trattamento. Programmare e valutare interventi efficaci di prevenzione primaria e secondaria diretti a gruppi target e predisporre interventi di supporto e allocazione mirata delle risorse finanziarie.

### **Studio della risposta anticorpale anti-HPV dopo vaccinazione**

L'Italia è stato il primo Paese europeo ad aver pianificato una strategia di vaccinazione pubblica contro i Papillomavirus umani HPV16 e 18, agenti causali di oltre il 70% dei tumori della cervice uterina, che ogni anno causano in Italia circa mille morti. Tale vaccinazione produrrà negli anni una progressiva immunizzazione della popolazione con un'auspicabile riduzione sia delle infezioni da parte dei genotipi HPV16 e 18 sia del cancro della cervice. Essendo il sistema immunitario mediatore della protezione antivirale, per meglio valutare l'impatto della vaccinazione HPV sull'incidenza del CC è necessaria la sorveglianza sierologica delle popolazioni vaccinate. A causa della mancanza di saggi sierologici commerciali la valutazione della risposta immunitaria anti-HPV richiede la messa a punto di test *in house*. Nel nostro laboratorio si studia la sierologia dei Papillomavirus e si dispone di saggi sierologici *in house* basati su proteine ricombinanti. Tali saggi sono in grado

di monitorare la risposta anticorpale sia dopo l'infezione naturale che dopo vaccinazione HPV. In collaborazione con l'Istituto per la prevenzione oncologica della Regione Toscana, Firenze, e del *Clinical trial Center* dell'Ospedale Bambino Gesù, Roma, i saggi messi a punto in ISS verranno utilizzati in due studi di coorte per analizzare la risposta anticorpale anti-HPV prima e dopo vaccinazione con Cervarix e Gardasil.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio in collaborazione con l'Istituto per lo Studio e la Prevenzione Oncologica (ISPO) prevede il monitoraggio della risposta anticorpale HPV-specifica di un gruppo di donne afferenti allo screening del carcinoma della cervice che acconsentiranno a ricevere il vaccino HPV.

Lo studio consentirà: i) di valutare la risposta anticorpale HPV-specifica prima della vaccinazione nei confronti dell'antigene L1; ii) di valutare la risposta anticorpale nei confronti di antigeni virali non presenti nel vaccino quali L2, E6 ed E7 prima della vaccinazione; iii) la comparazione dei risultati ottenuti con il saggio Elisa basato sulla proteina L1 espressa in *E. coli* con quello basato sulle VLP e validato dall'HPVlabnet.

Lo studio in collaborazione con l'Ospedale Bambino Gesù prevede il monitoraggio della risposta HPV-specifica in un gruppo di bambini e adolescenti HIV positivi.

Lo studio consentirà: i) di valutare la risposta anticorpale HPV specifica prima della vaccinazione con Gardasil; ii) di valutare l'induzione della risposta HPV specifica dopo vaccinazione con Gardasil; iii) di valutare il titolo e la persistenza degli anticorpi in un breve follow-up.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tali studi consentiranno la messa a punto e la validazione di metodi sierologici per il monitoraggio della risposta anticorpale nell'infezione naturale da HPV e dopo vaccinazione. Non esistendo a momento saggi commerciali tale attività potrebbe essere strategica per poter valutare l'impatto della vaccinazione HPV nella popolazione italiana.

### **Studio della risposta della memoria immunologica nell'ambito della farmacovigilanza dell'efficacia della vaccinazione contro malattie prevenibili**

L'efficacia della vaccinazione è associata ai livelli di anticorpi circolanti. La risposta T e la frequenza di cellule della memoria B e T è presa in considerazione raramente nella protezione indotta dalla vaccinazione. Considerando che le cellule della memoria B hanno bisogno dell'aiuto delle cellule Th per proliferare e differenziarsi in cellule produttrici anticorpi, è importante che parallelamente alla risposta anticorpale, sia valutata anche la risposta della memoria T e B. Questi approcci sono stati utilizzati dalle autorità preposte dell'AIFA per valutare la protezione residua indotta da un vaccino esavalente che presentava una capacità di indurre bassi livelli anticorpali verso l'epatite B. Sebbene il significato clinico non fosse noto è possibile che la durata della protezione non sia ottimale nel tempo, e i bambini vaccinati con quel vaccino, pur essendo protetti durante l'infanzia, potessero non esserlo adeguatamente durante l'adolescenza e l'età adulta. Da qui, la necessità di approfondire il grado di protezione indotta in questi bambini dalla vaccinazione. In questo ambito abbiamo valutato oltre alla presenza di una risposta anticorpale, il grado d'induzione di una risposta cellulare T e B della memoria specifica per la componenti vaccinale dell'epatite. Questo approccio sperimentale ha dimostrato come la memoria B (Rosado *et al. Eur J Immunol* 2011) e la memoria T (in preparazione) siano presenti anche in assenza di livelli anticorpali protettivi.

**Risultati attesi nel triennio**

Questo approccio sperimentale sarà applicato alla vaccinazione influenzale. Si intende valutare, in collaborazione con gli epidemiologi, la sicurezza d'uso e l'efficacia del vaccino pandemico nel prevenire l'influenza e le relative complicanze in un campione di donne in gravidanza. Dal punto di vista immunologico prenderemo in esame sia la risposta anticorpale che lo studio della persistenza dell'immunità T e B. Effettuare il follow-up attraverso uno studio caso-controllo di un campione di donne in gravidanza per valutare la persistenza di anticorpi e l'induzione e persistenza della memoria specifica T e B con particolare attenzione all'influenza dello stato di gravidanza sulla polarizzazione della risposta immune e sull'esito della vaccinazione. È noto infatti che in stato di gravidanze si ha una risposta generalmente polarizzata verso un profilo Th2. La caratterizzazione e persistenza della risposta immune cellulare indotta dalla vaccinazione influenzale è di per sé un aspetto innovativo. I risultati delle attività porteranno a meglio definire i correlati di protezione indotti dalla vaccinazione nei soggetti vaccinati e guariti dall'infezione. Inoltre questi approcci sperimentali serviranno anche a identificare i parametri da analizzare per saggiare l'efficacia di nuovi vaccini pandemici, fornendo importanti informazioni su come monitorare lo stato immunologico della popolazione che deve affrontare una nuova emergenza pandemica influenzale.

**Trasferibilità dei risultati**

L'ottenimento degli obiettivi permette l'individuazione di strumenti per valutare la risposta protettiva indotta dalla vaccinazione e di applicare questa strategia allo studio della risposta immune verso altre malattie prevenibili. Tali risposte sono scarsamente analizzate soprattutto negli studi clinici di vaste proporzioni. È cruciale la messa a punto di uno strumento che possa in tempo reale fornire informazioni circa l'efficacia dei vaccini influenzali stagionali che tutti gli anni sono preparati sulla base delle raccomandazioni della WHO e somministrati alla popolazione italiana. Le conoscenze acquisite grazie agli strumenti messi a punto nell'ambito del progetto potranno servire come valutazione *ex post* delle decisioni assunte e per affrontare al meglio un'eventuale nuova pandemia influenzale e dando informazioni importanti su come implementare una efficace strategia vaccinale per le autorità preposte.

**Studio delle proprietà adiuvanti di prodotti microbici derivati da *Bordetella pertussis***

L'individuazione di molecole in grado di promuovere, potenziare e modulare l'immunogenicità di un vaccino rappresenta una priorità per la ricerca biomedica.

*Bordetella pertussis* (Bp) esprime un vasto arsenale di fattori di virulenza che per le loro caratteristiche sono potenzialmente utilizzabili come adiuvanti. In particolare, il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che la tossina della Pertosse geneticamente detossificata (dPT) è in grado di stimolare la maturazione di DC umane, inducendo preferenzialmente citochine Th1, quali l'interleuchina (IL)-12 (Ausiello *et al.* *JID* 2002). Più recentemente abbiamo dimostrato la capacità della dPT di promuovere una polarizzazione mista di tipo Th1/Th17, potenzialmente efficace nel proteggere contro patogeni sia fungini che batterici (Nasso *et al.* *JJ* 2009).

I nostri studi hanno anche dimostrato che la tossina Adenilato Ciclasi (ACT) prodotta da Bp influenza l'attivazione delle DC attraverso l'accumulo di cAMP intracellulare. L'azione di questa tossina inibisce la produzione di IL-12 e limita la polarizzazione Th1 (Spensieri *et al.* *JID* 2006; Fedele *et al.* *PlosOne* 2010).

Un ulteriore fattore di virulenza di Bp che possiede la capacità di modulare la risposta immunitaria dell'ospite è l'emagglutinina filamentosa (FHA). Questa adesina è in grado di

indurre maturazione di DC, produzione di IL-10 e promuovere l'espansione di linfociti T regolatori (Braat *et al. Gut* 2007).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Si intende caratterizzare l'azione adjuvante di dPT, ACT, FHA utilizzando sia un modello di DC umane, che linee cellulari derivate da epitelii respiratori (A549, BEAS-2B), alla luce del ruolo centrale sia delle DC che dell'epitelio respiratorio nell'iniziare e orchestrare la risposta immunitaria.

DC umane saranno differenziate da precursori CD14 in presenza di GM-CSF e IL-4. L'attività di adjuvanza sarà studiata analizzando i parametri di attivazione indotti dai prodotti microbici e le vie intracellulari di trasduzione del segnale coinvolte. Particolare attenzione sarà posta alla produzione di citochine dell'asse Th1 quali IL-12, IFN di tipo I e II e IL-27, dell'asse Th17, quali IL-23, IL-1b e IL-6, e di citochine regolatorie (IL-10, TGF- $\beta$ ).

Gli studi condotti *in vitro* sulla cellule epiteliali respiratorie saranno volti a valutare la produzione di citochine pro- (IL-1b, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-25) e anti-infiammatorie (IL-10, IL-35, IL-22) e IFN di tipo I.

Una volta caratterizzati i meccanismi alla base della attività immunomodulante dei fattori di virulenza di Bp, sarà possibile saggiarne gli effetti *in vitro*. Ci proponiamo di valutare l'efficacia nel modulare e potenziare le risposte indotte *in vitro* dall'RSV e diversi ceppi influenzali in termini di: i) maturazione di DC, profilo citochinico indotto e capacità di polarizzare linfociti T-helper; ii) attivazione di una risposta pro- o anti-infiammatoria in cellule epiteliali A 549 e BEAS-2B.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'ottenimento degli obiettivi permetterà di definire i meccanismi cellulari alla base della capacità di polarizzazione della risposta immunitaria mediata da DC. Sarà inoltre possibile l'individuazione di nuove strategie di vaccinazione per patogeni che necessitano dell'induzione di risposte Th1/Th17, protettive nel caso di infezioni fungine o batteriche, e di risposte regolatorie importanti nelle patologie infettive croniche e nelle patologie tumorali.

La pubblicazione dei risultati su riviste internazionali di forte impatto, l'invio di abstract a congressi nazionali e internazionali, sono gli indicatori che si intende raggiungere. L'ottenimento d'ulteriori finanziamenti, soprattutto a livello europeo, di brevetti e di protocolli diagnostici sono punti focali della progettualità.

### **Studio dello stato redox della cellula epatica nel ciclo replicativo del virus dell'epatite C per l'identificazione di nuovi target molecolari di trattamento e patogenesi**

La variabilità del virus HCV rende necessario lo sviluppo di strategie anti-virali che riducano la probabilità che il virus acquisisca resistenza. È perciò importante considerare le interazioni virus-cellula ospite e indirizzare la scoperta di nuovi farmaci verso fattori cellulari essenziali alla replicazione virale, invece che verso strutture del virus. Molte *pathway* di *signalling* della cellula, coinvolte nella replicazione di HCV (MAPK, PI3K/Akt, mTOR, Ras/ERK), sono modulate da cambiamenti dello stato redox intracellulare. Studi clinici e *in vitro* hanno dimostrato che in varie infezioni virali, inclusa quella da HCV, c'è uno sbilanciamento dello stato redox verso condizioni pro-ossidanti, il che potrebbe avere un ruolo nella regolazione della replicazione virale e nella patogenesi della malattia HCV associata. A tutt'oggi ci sono risultati contrastanti riguardo al ruolo dello stress ossidativo nella replicazione di HCV. Proseguendo la collaborazione con il Dipartimento di Sanità pubblica e malattie infettive, Università Sapienza di Roma, ci si propone: i) di valutare la relazione fra stato redox della cellula e infezione da HCV in cellule Huh7

infettate con J6/JFH1; ii) di analizzare *in vitro* l'effetto di molecole ossidanti e anti-ossidanti sulla replicazione virale e i meccanismi molecolari coinvolti; iii) di valutare l'espressione di specifici microRNA regolatori delle molecole del sistema redox.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Dallo studio proposto si prevede di identificare il ruolo dello stato redox della cellula ospite nel modulare la replicazione di HCV e di identificare i meccanismi molecolari coinvolti. Inoltre, il trattamento con molecole ossidanti e anti-ossidanti e l'analisi del loro effetto sulla produzione di particelle virali *in vitro*, consentirà di verificare l'efficacia anti-virale di molecole dirette contro targets cellulari di interazione con il virus HCV.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati prodotti dallo studio descritto saranno divulgati su riviste internazionali sottoposte a *peer-review*. I risultati sull'effetto del trattamento con ossidanti/anti-ossidanti e l'identificazione dei microRNA specifici in colture cellulari infettate con HCV serviranno alla valutazione per un potenziale approccio terapeutico e costituiranno il punto di partenza per valutarne l'utilizzo nel trattamento dell'infezione da HCV, singolarmente o in associazione con la terapia convenzionale.

I risultati dell'indagine sui meccanismi coinvolti daranno un contributo all'identificazione di target molecolari di patogenesi.

### **Studio di campo sull'efficacia e sicurezza di un ulteriore vaccino per la protezione dall'infezione da Leishmania nel cane**

Obiettivi generali e specifici sono valutare l'efficacia e sicurezza di un preparato vaccinale anti-Leishmania nei cani mediante uno studio clinico a doppio cieco che coinvolga soggetti di sei mesi, residenti in un'area ad elevata trasmissione di leishmaniosi viscerale zoonotica. I soggetti verranno esposti a due stagioni consecutive di trasmissione.

Il vaccino, confezionato secondo GMP dalla Merial, verrà somministrato per tre volte, ad un mese di distanza, prima della stagione di trasmissione 2012. Né il veterinario somministratore né l'analista sarà a conoscenza della natura del prodotto somministrato (antigene o placebo). Il follow-up prevede numerose analisi per la valutazione dell'infezione e della malattia in un campione di soggetti vaccinati (n. 25) e di controllo (placebo) (n. 25). Periodicamente verranno effettuati esami sierologici (immunofluorescenza indiretta, IFAT), parassitologici (microscopia e coltura) e molecolari (*nested PCR*).

#### **Risultati attesi nel triennio**

L'outcome del progetto sarà un'accurata e rigorosa valutazione della protezione dall'infezione e/o dalla progressione della patologia nel cane a seguito della somministrazione di un prodotto vaccinale innovativo e sicuro.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La ricerca e valutazione di vaccini anti-Leishmania per il serbatoio canino della leishmaniosi viscerale umana costituiscono una priorità per il controllo della malattia in aree endemiche italiane. Qualora risultasse efficace, il vaccino andrebbe ad integrare le misure attualmente impiegate per il controllo della zoonosi, che presentano efficacia limitata (terapia dei soggetti infetti e controllo dei vettori).

### **Studio multicentrico europeo sui tic in bambini e adolescenti**

Lo studio EMTICS, finanziato dalla Comunità Europea all'interno dell'FP7, propone un approccio multidisciplinare e multifattoriale per lo studio delle possibili cause ambientali (incluse la colonizzazione o l'infezione faringea da parte dello streptococco beta emolitico

*Streptococcus pyogenes*) e predisposizioni genetiche che possano contribuire all'insorgenza o recrudescenza dei sintomi ticcosi in bambini e adolescenti.

A questo scopo due coorti di pazienti saranno oggetto di studi longitudinali. Una coorte, (studio ONSET) sarà costituita da 500 bambini fra i tre e i dieci anni che non presentino tic ma che abbiano genitori o fratelli con tic (popolazione ad alto rischio) che saranno seguiti per un periodo di tre anni dal momento dell'arruolamento.

La seconda coorte di pazienti (studio COURSE) sarà costituita da 700 bambini e adolescenti con tic che verranno seguiti per un anno dall'arruolamento. In entrambi gli studi longitudinali, i soggetti arruolati saranno sottoposti a visite mediche periodiche, inclusi prelievi ematici e tamponi faringei per la ricerca di *S. pyogenes*.

Infine, sarà selezionata una porzione di pazienti dello studio COURSE (colonizzati o con faringite acuta da *S. pyogenes*) per uno studio parallelo (studio TREATMENT) in cui verrà valutata l'efficacia della somministrazione di una terapia antibiotica nella remissione o attenuazione dei sintomi ticcosi.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I ceppi di *S. pyogenes* isolati dai tamponi faringei di bambini appartenenti alle due coorti di studio saranno analizzati tramite tecniche di tipizzazione molecolare avanzata per studiare la diffusione dei sierotipi e determinare la struttura genetica della popolazione batterica.

Verrà altresì studiata la distribuzione dei fattori di virulenza posseduta dai ceppi e loro variazioni alleliche tramite sequenziamento.

La possibilità di confrontare le caratteristiche di virulenza e di epidemiologia molecolare di ceppi di *S. pyogenes* isolati da bambini con tic o da bambini che non avranno mai sviluppato tic nel corso degli studi longitudinali permetterà di stabilire se particolari cloni o caratteristiche di virulenza possono essere associate all'insorgenza o recrudescenza dei sintomi ticcosi.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La dimostrazione di un'implicazione infettiva nell'insorgenza o recrudescenza dei sintomi della sindrome di Tourette aprirà nuove prospettive nel campo della prevenzione e terapia.

Nuovi protocolli terapeutici saranno disponibili per pediatri e neuropsichiatri infantili nel caso di bambini predisposti geneticamente e/o colonizzati a livello faringeo da *S. pyogenes*.

La descrizione della genetica di popolazione dei ceppi di *S. pyogenes* e delle caratteristiche di virulenza (possibilmente associate all'esordio o recrudescenza della sindrome di Tourette) potrà aiutare a capire gli aspetti patogenetici del batterio implicati nella sintomatologia ticcosa dei bambini.

### **Sviluppo di nuovi composti anti-influenzali ad ampio spettro diretti contro la RNA polimerasi virale**

Sono oggi disponibili, per uso clinico, due classi di farmaci anti-influenzali, gli adamantani che inibiscono la funzione della proteina virale M2 e gli Inibitori della Neuraminidasi (NAI) Oseltamivir e Zanamivir.

La già verificata resistenza agli adamantani della maggior parte dei virus circolanti nella popolazione umana, unita alla comparsa della farmaco-resistenza ai NAI tra gli isolati influenzali stagionali dimostrano che c'è una urgente necessità di sviluppare nuovi agenti antivirali da poter utilizzare per prevenire e/o trattare l'infezione da virus influenzali in caso di pandemia, prima che venga formulato un vaccino efficace, o come un'alternativa per quei soggetti che non sono o non possono essere vaccinati.

L'RNA polimerasi dei virus influenzali è un eterotrimerico costituito da PB1, PB2 e PA indispensabili per la replicazione del genoma virale. Diversamente dalle proteine strutturali,

il complesso della polimerasi virale è un elemento conservato tra i diversi ceppi di virus influenzali, inoltre, è stato dimostrato che le interazioni tra le subunità del complesso sono essenziali per la replicazione virale. L'inibizione di queste interazioni, quindi, potrebbe rappresentare una potenziale strategia per lo sviluppo di nuovi composti anti-influenza ad ampio spettro e quindi in grado di essere attivi anche verso le diverse varianti virali. Inoltre, a differenza degli inibitori della NA virale, tali composti sono meno proni allo sviluppo di resistenza.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Selezione e identificazione di composti attivi in grado di inibire le interazioni tra le subunità PA e PB1 dell'RNA polimerasi dei virus influenzali e, di conseguenza, di inibire la replicazione virale.

Inoltre, dal momento che il bersaglio virale è conservato tra i diversi sottotipi virali, ci attendiamo che tali composti siano attivi contro molti ceppi del virus dell'influenza e per questo motivo potrebbero rappresentare una base di partenza per lo sviluppo di nuovi farmaci anti-influenzali ad ampio spettro.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati delle ricerche saranno messi a disposizione della comunità scientifica nazionale e internazionale attraverso pubblicazioni scientifiche e partecipazioni a congressi.

### **Sviluppo di tecniche per la diagnosi di pertosse, come implementazione del sistema di sorveglianza**

L'aumento nell'incidenza di casi di pertosse in diversi Paesi europei, Australia, Canada e USA dovuta sia all'aumentato numero di ceppi di *B. pertussis* varianti sia ad un aumentato numero di casi tra gli adolescenti e adulti, richiede, anche nel nostro Paese, la necessità di mettere a punto tecniche rapide di diagnosi così come l'implementazione della diagnosi tramite coltivazione del ceppo batterico. In particolare, il progetto avrà lo scopo di validare protocolli per l'identificazione di *Bordetella pertussis* e altre Bordetelle da campioni clinici e di standardizzare metodi per la tipizzazione molecolare dei ceppi isolati. Lo studio si integra nell'"Azione Centrale" voluta dal Ministero della Salute come implementazione del sistema di sorveglianza.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto si integra nelle attività previste all'interno dell'Azione Centrale voluta dal Ministero della Salute come implementazione al sistema di sorveglianza nazionale e in quelle presenti nel network europeo Eupertstrain voluta da ECDC. Gli obiettivi principali e i risultati attesi sono quelli di aumentare le capacità diagnostiche così come di implementare della sorveglianza su tutto il territorio nazionale.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto offrirà uniche opportunità per migliorare i protocolli di diagnosi molecolare rapida e batteriologica di *B. pertussis* nonché per lo studio di ceppi batterici. L'armonizzazione delle tecnologie che verranno utilizzate permetterà di implementare le capacità diagnostiche per la pertosse. I risultati ottenuti permetteranno di fornire protocolli condivisi a livello europeo.

### **Antigeni e anticorpi per la diagnosi e la terapia delle micosi invasive**

Alla ricerca di approcci innovativi per la profilassi e la terapia delle micosi sistemiche tipiche del soggetto immunocompromesso, e di nuove e più affidabili metodiche diagnostiche, valuteremo in dettaglio le potenzialità applicative degli anticorpi

monoclonali(mAb) “universali” anti-beta 1,3 glucano, da noi generati, dotati di attività protettiva, in modelli preclinici, contro i maggiori agenti di micosi profonde (*C. albicans*, *A. fumigatus*, *C. neoformans*). In particolare, ne determineremo l’efficacia terapeutica nell’ospite normale o immunocompromesso e la capacità di sinergizzare con la terapia antimicotica e caratterizzeremo in dettaglio i loro effetti immunologici e i loro target molecolari per meglio comprenderne il meccanismo di azione. Estenderemo questi studi, nel modello candidosi, a nuovi mAb diretti contro ben noti fattori di virulenza di *C. albicans*. I mAb più promettenti verranno ingegnerizzati per creare un *panel* di reagenti “umanizzati” potenzialmente applicabili per studi clinici nell’uomo. Poiché sia il beta-1,3 glucano che molte proteine di virulenza sono attivamente secrete in corso di infezione, utilizzeremo i mAb per la messa a punto di test per la ricerca di antigeni fungini circolanti e sarà valutato, in campioni clinici, il valore diagnostico dei diversi *marker* di infezione. La disponibilità di vari antigeni fungini in forma purificata permetterà anche di monitorare la presenza, e il significato diagnostico, dei relativi Ab specifici nel siero di pazienti.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Dall’insieme di questa sperimentazione, ci si attende di sviluppare nuovi reagenti potenzialmente utili per l’uso clinico, e di porre le prime basi conoscitive per una valutazione razionale del loro impiego quali strumenti terapeutici o diagnostici per un miglior controllo delle candidosi e di altre micosi invasive dell’ospite immunocompromesso

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le informazioni ottenute permetteranno di razionalizzare future strategie sperimentali miranti allo sviluppo di kit diagnostici e di mAb umani ad attività profilattica e/o terapeutica applicabili per l’uso nell’uomo. I risultati di questi studi verranno trasferiti alla comunità scientifica mediante pubblicazione su riviste internazionali qualificate. I reagenti ottenuti saranno oggetto di brevetto internazionale.

### **Un difetto nell’espressione del gene TLR7 compromette l’immunità innata e adattativa nei pazienti affetti da SM: meccanismi intracellulari come bersagli terapeutici**

I Recettori Toll (TLR) rappresentano una famiglia di molecole in grado di iniziare le risposte innate immuni e di innescare l’immunità adattativa antigene-specifica. Anche se i ligandi dei TLR sono generalmente considerati essere ristretti a componenti microbiche, anche diverse molecole endogene, collegate a danno dell’ospite e funzioni di riparo, inducono la stimolazione di questi recettori. In particolare, gli acidi nucleici *self* sono riconosciuti dai TLR localizzati negli endosomi: il TLR3 riconosce l’RNA messaggero, il TLR7 l’RNA a singolo filamento, mentre il TLR9 il DNA a doppio filamento. Molte evidenze sperimentali indicano che i TLR possano contribuire allo sviluppo di diverse malattie autoimmuni, inclusa la SM. Questo disordine cronico infiammatorio e neurodegenerativo dell’SNC risulta da un’interazione tra fattori ambientali e genetici. In questo scenario è dato che mutazioni e polimorfismi a singolo nucleotide (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) nel gene che codifica per il TLR7 sono risultate coinvolte nello sviluppo di malattie autoimmuni come il Lupus Sistemico Eritematoso (LES), noi abbiamo valutato l’espressione genica del TLR7 attraverso la *real time* RT-PCR in PBMC ottenuti da pazienti affetti da SM recidivante-remittente (RRSM) e sorprendentemente abbiamo trovato un forte difetto nella trascrizione di questo gene a confronto con donatori sani.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Sulla base di queste evidenze nel nostro progetto ci proponiamo di:

- Determinare se l'espressione genica del TLR7 sia disregolata negli individui con SM. In primo luogo, verrà valutato se la trascrizione o l'attivazione dei fattori trascrizionali IRF1 e STAT1, coinvolti nella trascrizione del TLR7 come da noi evidenziato in passato, sia alterata nei pazienti. Un altro aspetto che verrà preso in considerazione è il possibile coinvolgimento del repressore trascrizionale BLIMP1 nella regolazione genica del TLR7 e se questi meccanismi siano modificati nei pazienti. Infatti in studi precedenti avevamo evidenziato che BLIMP1 silenzia geni IRF-regolati competendo con gli stessi IRF per i loro siti di legame sulle regioni promotrici dei geni bersaglio.
- Stabilire se vi siano modificazioni genetiche responsabili del difetto nell'espressione del TLR7 osservato nei pazienti. Inizialmente, valuteremo la possibile presenza di SNP nei geni IRF1 e STAT1 oppure nel gene o nella regione promotrice del TLR7 che potrebbero determinare la differente espressione di questo gene nei pazienti verso i sani. In secondo luogo, invece, esamineremo se vi siano modificazioni epigenetiche all'interno del promotore del TLR7 dei pazienti a confronto con i sani, responsabili di una metilazione aberrante del DNA.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Vi sono un certo numero di farmaci immunomodulanti o immunosoppressivi, approvati per l'uso nella terapia della SM, con vari gradi di efficacia. Vi è comunque un bisogno urgente di trattamenti più adeguati, basati su composti alternativi con nuovi meccanismi di azione in grado di rallentare la progressione della malattia e le complicazioni che ne derivano. Negli ultimi anni, è emerso un interesse crescente nell'utilizzo dei TLR come bersagli di farmaci per prevenzione e trattamento di numerose malattie, incluse quelle autoimmuni. Noi siamo convinti che i risultati del nostro studio sulla regolazione genica del TLR7 nei pazienti affetti da SM possano identificare nuovi target per lo sviluppo di approcci innovativi per il trattamento di questa malattia.

#### **Uso di vaccini e pressione selettiva sulla popolazione batterica target: variabilità di antigeni di meningococco B ed emergenza di *H. influenzae* non capsulato**

Il presente progetto si propone di valutare: i) impatto del nuovo vaccino anti-meningococco B di prossima registrazione sulla popolazione dei ceppi di meningococco circolanti sia nei malati che negli adolescenti portatori sani; ii) pressione selettiva esercitata da un uso più che decennale del vaccino Hib sulla colonizzazione da *H. influenzae* (Hi) in bambini con meno di cinque anni portatori sani e/o asintomatici e iii) eventuale presenza di genotipi emergenti.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Stima della percentuale degli adolescenti sani colonizzati da meningococco e percentuale di ceppi sierogruppo B rispetto ad altri sierogruppi.

Percentuale di *cross*-reattività tra gli antigeni proteici vaccinali e le proteine espresse in ceppi di meningococco B e in un campione rappresentativo di altri sierogruppi isolati da casi di malattia invasiva e da portatori.

Stima della frequenza delle varianti genetiche in ceppi di meningococco B e altri sierogruppi isolati da malati e da portatori rispetto alle proteine incluse nel vaccino antiB.

Stima della percentuale dei bambini sani e/o asintomatici colonizzati da Hi non capsulato.

Dati sulla prevalenza della colonizzazione da Hi non capsulato nel tratto genito-urinario di donne in gravidanza

### **Trasferibilità dei risultati**

I dati derivanti dallo studio saranno trasferiti sia a livello regionale che centrale per indirizzare strategie di controllo e prevenzione mirate.

## **Utilizzo di nanoparticelle nel trattamento delle infezioni da microrganismi biofilmogeni**

Le infezioni da microrganismi biofilmogeni sono particolarmente difficili da trattare con i protocolli terapeutici disponibili e possono essere soggette a fallimenti terapeutici, anche negli episodi infettivi sostenuti da agenti non provvisti di determinanti genetici di resistenza; questo a causa dell'incapacità dell'antibiotico di raggiungere e/o di attaccare efficacemente le cellule batteriche all'interno del biofilm. Obiettivo di questo studio è quello di utilizzare nanoparticelle/micro bolle, ottenute mediante una tecnica di deposizione a multistrato, nel trattamento dei biofilm batterici. Esperimenti preliminari hanno già dimostrato come micro bolle costituite da lisozima siano in grado sia di interferire con la formazione di biofilm da *Staphylococcus aureus* che di alterare la struttura di biofilm maturi. Il progetto si propone di valutare la migliore combinazione micro bolle/agente terapeutico in grado di interferire/distruocere biofilm formati o in formazione come alternativa alla terapia antibiotica classica.

### **Risultati attesi nel triennio**

I dati ottenuti permetteranno la valutazione di una nuova procedura, attualmente utilizzata con risultati promettenti in campo oncologico, nel trattamento delle infezioni causate da microrganismi biofilmogeni. Tale alternativa terapeutica permetterebbe la limitazione dell'applicazione dei prolungati protocolli terapeutici a base di antibiotici attualmente necessari, anche se di limitato successo, nel trattamento di queste infezioni.

### **Trasferibilità dei risultati**

Le informazioni ottenute con questi studi verranno trasmesse alla comunità scientifica, tramite pubblicazioni.

## **Vaccinazione per via nasale contro infezioni respiratorie in neonati**

Le infezioni respiratorie rappresentano un rischio importante per i neonati, in particolare la pertosse e l'infezione da RSV. Benché verso la pertosse esistano vaccini efficaci, l'infezione nei primi mesi di vita è responsabile di alti livelli di mortalità. A tutto oggi non ci sono disponibili vaccini contro l'infezione da RSV. Il vaccino proposto dal progetto ChildINNOVAC prevede una somministrazione per via nasale contro due importanti patogeni delle vie respiratorie dei neonati e consiste in un ceppo di *Bordetella pertussis* attenuata (BPZE1), in grado già dopo un primo inoculo di proteggere dall'infezione in un modello sperimentale. Durante il progetto è stato verificato l'innocuità del vaccino in volontari adulti in un trial di fase 1 e quindi nel proseguo dello studio sarà valutato il suo possibile uso anche come dose di richiamo negli adolescenti/adulti. Punto centrale del progetto è la caratterizzazione dei meccanismi immunologici di protezione indotti dal vaccino, che vede molto attivo il gruppo dell'ISS insieme ai gruppi francesi, belgi, olandesi e svedesi. Inoltre, è ormai chiaro che l'immunità innata esercita una profonda influenza sulla forza, durata e qualità della risposta immune e in particolare sulle cellule della memoria B e dell'immunità T. È quindi importante capire la dinamica delle cellule della memoria anni dopo la vaccinazione. Il progetto prevede inoltre la creazione di un vaccino attivo contro la bronchiolite da RSV.

### **Risultati attesi nel triennio**

Si prevede lo studio del ceppo BPZE1 come vettore per la presentazione di antigeni di RSV alla mucosa respiratoria (BPZE1-RSV). Tale ceppo è a disposizione di partner europei ma non si sa se sia in grado di indurre una protezione verso l'infezione sperimentale da RSV. Il dato promettente è che il ceppo BPZE1-RSV è immunogenico. In ISS ci occupiamo dello studio dell'immunità indotta da BPZE1-RSV in un modello umano *ex vivo* di cellule MDCC, valutando sia il profilo di citochine che il tipo di polarizzazione in grado di indurre in cellule T. La prosecuzione di questo studio prevede anche l'analisi dei processi infiammatori/immunitari in un modello di cellule epiteliali derivati dall'apparato respiratorio. È ormai chiaro che l'immunità innata esercita una profonda influenza sulla forza, durata e qualità della risposta immune e in particolare sulle cellule della memoria B e dell'immunità T (Th1/Th17-protettiva, Th2-allergia e T regolatoria. Lo studio prevede anche l'analisi delle cellule della memoria anni dopo la vaccinazione e l'infezione. Quest'analisi sarà studiata in bambini appartenenti a diverse classi di età proseguendo lo studio iniziato nel primo triennio. I risultati serviranno come base per la valutazione della necessità di una dose di richiamo.

### **Trasferibilità dei risultati**

Il raggiungimento dei risultati previsti dal progetto porterà all'allestimento di ulteriori trials clinici con BPZE1 e allo sviluppo di vaccini multivalenti da somministrare per via nasale per indurre una protezione contro differenti patogeni respiratori. La via per arrivare all'uso clinico di questo nuovo vaccino è lunga ma, considerato anche il minor costo per la produzione di questi tipi di vaccini, la sua realizzazione potrà contribuire alla diminuzione delle morti per affezioni respiratori anche nei paesi in via di sviluppo dove queste malattie mietono ancora un gran numero di vittime.

Questa linea di ricerca è iniziata nel triennio precedente finanziato con la ricerca UE (ChildINNOVAC) e continuerà per mantenere le collaborazioni instaurate con i partner europei nella prospettiva di nuovi progetti finanziate a livello europeo e nazionale (Ricerca finalizzata 2009).

## **Vaccino influenzale universale – UNIFLUVAC**

Il progetto UNIFLUVAC è finalizzato alla messa a punto e alla valutazione preclinica di vaccini antinfluenzali cosiddetti "universali", cioè in grado di superare i noti limiti del vaccino convenzionale, la cui ceppo-specificità impone un aggiornamento annuale della composizione vaccinale. Lo sviluppo di tali vaccini si basa sull'identificazione di regioni conservate dell'antigene virale di emagglutinina (HA), rese immuno-dominanti attraverso tecniche di manipolazione genetica. Le attività svolte dalle tre UO partecipanti hanno portato al raggiungimento di importanti risultati, con particolare riferimento alle caratteristiche di costrutti vaccinali *full-length*, che hanno mostrato una notevole capacità di proteggere gli animali immunizzati, nei confronti di infezione omologa, dimostrando la sua efficacia come possibile vaccino ricombinante di rapida produzione e di basso costo. In una prima fase di svolgimento del progetto le attività sono state finalizzate all'allestimento di costrutti vaccinali contenenti sequenze dell'intera proteina HA e della sua sub unità HA2. La possibilità di estendere il Progetto ad una seconda annualità permetterà di consolidare i risultati fin qui ottenuti, nonché di raggiungere ulteriori importanti obiettivi.

### **Risultati attesi nel triennio**

L'individuazione nella HA o in altre proteine virali di sequenze conservate e immunogeniche, comuni almeno ai principali sottotipi influenzali, umani e aviari da usare da sole o in associazione, è importante per la generazione di costrutti vaccinali mono o polivalenti. La tecnologia ricombinante applicata a vettori *Modified Vaccinia Ankara*

(MVA), messa a punto con successo nell'ambito del presente progetto, per lo sviluppo di vaccini contenenti l'HA-Full length può essere utilmente impiegata per lo sviluppo di vaccini pandemici e pre pandemici contenenti HA di virus aviari potenzialmente pandemici, quali H5, H7, H9. La possibilità di inserire in uno stesso vettore virale diverse HA costituirà il razionale per lo sviluppo di un unico vaccino polivalente ad ampio spettro nei confronti dei principali sottotipi di influenza aviaria. La generazione di vaccini di questo tipo terrà conto dei risultati della attività di sorveglianza e successiva caratterizzazione dei ceppi aviari attualmente circolanti nel mondo.

Le strategie vaccinali basate su questo approccio potranno dare un importante contributo allo sviluppo di vaccini universali e, quindi, essere di rilevante importanza per la sanità pubblica.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati delle ricerche saranno messi a disposizione della comunità scientifica nazionale e internazionale attraverso pubblicazioni scientifiche e partecipazione a congressi.

### **Validazione dell'uso di anticorpi in formato a singola catena per contrastare l'attività oncogena dei papilloma virus umani ad alto rischio.**

La stretta associazione tra Papillomavirus ad alto rischio e cancro è conoscenza consolidata ma molti sono i problemi da risolvere in ambito terapeutico. Il trattamento delle lesioni associate a HPV consiste attualmente in interventi chirurgici, radio- o chemioterapici. Gli anticorpi ricombinanti ottenibili tramite le biotecnologie consentono di bloccare le due principali oncoproteine virali, E6 ed E7, e rappresentano sia un approccio terapeutico valido sia uno strumento utile allo studio dei meccanismi carcinogenetici, non ancora chiariti. Alcuni anticorpi in formato a singola catena (scFv) sono stati selezionati da noi tramite *Phage-display* o, in collaborazione con la *Lay-line genomics*, tramite *Intracellular antibody capture technology*, contro le proteine E6 ed E7 del papilloma virus umano di tipo 16. Tutti gli anticorpi sono stati prodotti in sistema procariotico e caratterizzati per la loro stabilità e affinità per l'antigene, e ne sono stati mappati gli epitopi di legame sul loro bersaglio proteico. Alcuni anticorpi sono in parte già stati caratterizzati *in vitro* per la loro attività antiproliferativa su cellule SiHa e altri sono in fase di caratterizzazione per la loro attività pro-apoptotica. Nella prospettiva di un possibile impiego clinico di questi "anticorpi intracellulari" si sta portando avanti uno studio preclinico in modello tumorale murino per confermare la validità dell'approccio.

#### **Risultati attesi nel triennio**

L'espressione intracellulare di anticorpi selezionati contro antigeni associati a tumore quali le proteine virali E6 ed E7, e caratterizzati *in vitro* per la loro attività antiproliferativa, è una metodica vantaggiosa per bloccare gli antigeni bersaglio. Gli anticorpi scFv possono essere somministrati sia direttamente, in forma purificata, che tramite un sistema retrovirale. Le sequenze codificanti per gli anticorpi da saggiare, comprensive dei segnali per la localizzazione in diversi compartimenti cellulari, sono state clonate in vettori retrovirali. I retrovirus ricombinanti saranno prodotti e usati per infettare colture di cellule TC-1 (epiteliali murine trasformate da ras e immortalizzate da E6 ed E7). Sarà valutato *in vitro* l'effetto di tale trasduzione sulla proliferazione, la tumorigenicità e l'adesione/invasività come indicatori della capacità metastatizzante delle TC-1. Successivamente l'effetto *in vivo* dei retrovirus ricombinanti esprimenti gli anticorpi indirizzati ai vari compartimenti cellulari sarà valutato tramite la capacità di inibire o ritardare la crescita tumorale e l'insorgenza di metastasi in un modello murino basato su cellule TC-1 e topi C57 Black/6. I diversi anticorpi

scFv anti-E6 e anti-E7 potranno essere saggiati in associazione tra loro e in diverse combinazioni allo scopo di individuare la più efficace.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Lo studio descritto ha come possibile evoluzione l'applicazione sia in *gene therapy* che in *protein therapy*. Qualora l'efficacia *in vivo* degli anticorpi nel contrastare l'attività oncogena delle proteine virali venga confermata, le ricadute in ambito sanitario potrebbero essere notevoli. Infatti solo una bassa percentuale delle infezioni da HPV subisce una progressione tumorale e le terapie attualmente in uso sono altamente invasive e non indicate nel caso di lesioni di basso grado. Inoltre, il lungo periodo di latenza tra l'infezione e il tumore conclamato sottolinea la necessità di un intervento di tipo terapeutico/preventivo nei soggetti (immunodepressi, HPV-positivi) in cui la prevenzione attraverso il vaccino profilattico attualmente in commercio non può essere efficace.

Sarà inoltre possibile selezionare e produrre anticorpi contro proteine oncogene di altri papilloma virus ad alto rischio, ed estendere così lo spettro delle applicazioni possibili.

#### **Valutazione del potenziale allergenico dei pollini (PAP): definizione di un nuovo indicatore ambientale predittivo di effetto su popolazioni di soggetti atopici e studio della IL 33 come *marker* fenotipico nei soggetti asmatici**

I pollini sono la fonte prevalente di allergeni aerodispersi, per questo le pollinosi sono tra le più frequenti malattie allergiche.

Gli estratti allergenici da pollini sono studiati per sicurezza e/o appropriatezza d'uso diagnostico e terapeutico, e per vaccini innovativi. Inquinanti, stress e modifiche genetiche influenzano inoltre l'espressione delle componenti allergeniche dei pollini. Lo studio del PAP è quindi utile anche in studi di impatto ambientale e per la prevenzione del rischio respiratorio allergico.

Nel precedente triennio, è stato messo a punto un modello murino di allergia al polline di *Cupressus arizonica* (Ca), che fornisce una indicazione del PAP valutato *in vivo*. Ci si propone di elaborare un valore numerico che esprima quantitativamente il PAP così valutato, e mettere a punto una formula in grado di definire un nuovo indicatore ambientale predittivo di effetto sui soggetti atopici.

Gli estratti pollinici sono miscele di diverse componenti molecolari, alcune mostrano proprietà immunomodulanti che sembrano contribuire alla induzione della allergia e alla cronicizzazione dello stato infiammatorio a polarizzazione Th2. In particolare nel precedente triennio sono state identificate proprietà immunomodulanti dell'allergene maggiore del polline di Ca, nCup a1. Ci si propone di valutare l'utilità della IL33, indotta *in vivo* (nei topi) e *in vitro*, in seguito al trattamento con l'allergene nCupa 1, come *marker* fenotipico negli asmatici.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Elaborazione di una scala di *score* per il potenziale allergenico del polline e di un indicatore ambientale predittivo di aumentato rischio di sviluppare una sensibilizzazione allergica. Screening di una popolazione di soggetti allergici per la determinazione quantitativa di IL 33 nel siero.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Istituti pubblici di ricerca, monitoraggio e controllo, e strutture ospedaliere di diagnostica per:

- Possibilità di disporre di modelli animali standardizzati per la valutazione di protocolli terapeutici, per una valutazione *in vivo* del potenziale allergenico di pollini da piante

- geneticamente modificate (*genetically modified*, GM) e/o geneticamente selezionate e da piante sottoposte a fattori stressogeni, e per studi di meccanismo.
- Disponibilità di uno *score* di potenziale allergenico del polline per la elaborazione di un indicatore di rischio ambientale predittivo.
  - Informazioni volte al miglioramento della caratterizzazione fenotipica delle varie tipologie di asma.

### **Valutazione del ruolo dei microRNA come biomarcatori della risposta dei pazienti con SM alla terapia con IFN- $\beta$**

L'Interferone- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) è uno dei farmaci più indicati per il trattamento della SM, anche se i suoi meccanismi di azione non sono stati completamente caratterizzati. Negli ultimi anni, sta emergendo un ruolo chiave delle cellule B nella SM, una malattia che si è sempre creduto essere principalmente mediata dai linfociti T. Noi abbiamo visto che l'IFN- $\beta$  induce nei linfociti B uno stato antivirale e ne modula differenziamento e attivazione. Tra le molecole che possono regolare questi processi vi sono i microRNA, una classe di RNA non codificanti, che esplicano le loro funzioni mediando la destabilizzazione e l'inibizione della traduzione di mRNA bersaglio. È stato anche osservato che una disregolazione di queste molecole può predisporre a diverse malattie autoimmuni, inclusa la SM. Infatti un loro alterato profilo di espressione è presente nelle lesioni cerebrali attive o inattive, suggerendo la possibilità di utilizzare i microRNA come biomarcatori del decorso della malattia.

Il progetto si propone di:

- identificare una differenziale espressione dei microRNA nelle cellule B di pazienti con SM prima e dopo la terapia con IFN- $\beta$ ;
- valutare se specifici microRNA espressi nelle cellule B possano essere coinvolti nella mancata o ridotta risposta di alcuni pazienti al trattamento con IFN- $\beta$ , al fine di consentire la predizione degli individui responsivi o meno a questa terapia.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I pazienti arruolati verranno seguiti in uno studio longitudinale della durata di un anno a partire dall'inizio della terapia con IFN- $\beta$ . Sui linfociti B isolati dalle cellule mononucleate del sangue periferico sarà definito il profilo dei microRNA espressi prima e dopo la terapia attraverso *microarray*. Questa prima fase dello studio, attraverso l'utilizzo combinato di un approccio sperimentale e computazionale, potrebbe permettere l'identificazione di uno specifico set di microRNA modulati nelle cellule B dei pazienti in seguito al trattamento e portare alla luce il loro ruolo nella patogenesi della SM.

Nella seconda parte dello studio, invece, verranno discriminati gli individui responsivi e non-responsivi alla terapia sulla base di parametri clinici relativi a recidive, progressione della disabilità e produzione di anticorpi neutralizzanti. Dall'analisi dei *microarray* degli individui responsivi e non-responsivi verrà valutata la possibilità di associare l'espressione di specifici microRNA alla ridotta o mancata risposta alla terapia con IFN- $\beta$ . Il raggiungimento di questo obiettivo consentirà di stabilire se alcuni specifici microRNA possano rappresentare dei biomarcatori della risposta alla terapia rendendo possibile una veloce modificazione del trattamento, passo necessario verso una terapia individualizzata nella SM.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Dato il possibile ruolo dei microRNA nella patogenesi della SM e l'importanza dell'IFN- $\beta$  nel trattamento farmacologico di questa patologia e, allo stesso tempo, nella regolazione della biogenesi e del processamento dei microRNA, i risultati del nostro studio potrebbero aiutare a stabilire il coinvolgimento di specifici microRNA espressi nelle cellule B e regolati dall'IFN- $\beta$  differentemente modulati nei pazienti responsivi e non a questa terapia. Il nostro

studio potrebbe contribuire da un lato ad identificare biomarcatori affidabili per il monitoraggio della risposta e la valutazione dell'efficacia della terapia con IFN- $\beta$  e dall'altro a meglio comprendere i meccanismi molecolari responsabili della patogenesi della SM.

### **Valutazione dell'immunogenicità delle particelle fagiche che esprimono un antigene modello**

La maggior parte di patogeni invadono o causano malattia a livello delle mucose, quindi, lo sviluppo di vaccini mucosali è fortemente auspicato. Tuttavia, attualmente sono disponibili solo pochi vaccini mucosali per uso umano e nessuno di essi è costituito da proteine ricombinanti o subunità purificate e questo per la mancanza di adiuvanti e/o sistemi di *delivery* mucosali potenti e sicuri. Quindi nuovi approcci per indurre risposte immunitarie a livello delle mucose sono fortemente necessari. La capacità delle particelle fagiche di attivare diverse vie del sistema immunitario è stata precedentemente dimostrata. Con la presente ricerca si intende studiare la risposta immunitaria indotta da copie multiple di una proteina antigenica inserita nella regione amino-terminale della maggior proteina capsidica del batteriofago M13. La capacità di indurre delle risposte immunitarie sia a livello sistemico che mucosale sarà valutata dopo somministrazione delle particelle fagiche per via mucosale o sistemico.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Scopo del progetto è quello di indurre risposte immunitarie sia a livello mucosale che sistemico mediante l'utilizzo di particelle fagiche ricombinanti. Gli obiettivi di questo studio saranno quelli di valutare l'immunogenicità nei topi in seguito ad immunizzazione mucosale o sistemica delle particelle fagiche che esprimono un antigene modello e di confrontare le risposte immunitarie in seguito a vaccinazione mucosale o sistemica con particelle fagiche che esprimono una proteina antigenica e l'antigene in combinazione con un adiuvante mucosale nel topo. Le risposte immunitarie mucosali e sistemiche verso antigeni vaccinali verranno caratterizzate in termini di qualità, persistenza e induzione di memoria immunologica. La somministrazione di tali particelle sia per via mucosale che sistemica determinerà l'espansione, l'attivazione delle cellule del sistema immunitario, inducendo, a nostro avviso, una buona immunizzazione in grado di conferire protezione verso le infezioni. Questo approccio può contribuire a far progredire lo stato dell'arte della ricerca sugli adiuvanti attraverso l'induzione di risposte immunitarie mucosali e migliorare l'efficacia dei vaccini.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La validazione dell'uso di particelle fagiche come *delivery* vaccinali nel promuovere sia risposte sistemiche che mucosali può portare ad un miglioramento dei vaccini contro le infezioni. Il progetto potrà fornire nuove conoscenze relative ai meccanismi di azione di tali composti e a quelli di regolazione della risposta immune in corso di infezioni. La conoscenza di tali meccanismi sarebbe di sicura utilità per la ricerca applicata dell'intera comunità scientifica, non solo per lo sviluppo delle sostanze testate, ma anche perché permetterà di individuare, sulla base dei meccanismi identificati, nuove sostanze con funzione adiuvante/immunomodulatoria. Tale studio favorirà lo sviluppo di opportune strategie vaccinali atte a ripristinare una adeguata risposta immune in patologie di estrema importanza per la salute pubblica.

### **Valutazione *in vitro* di nuove molecole anti HCV: inibitori della polimerasi virale NS5B**

Il virus del HCV infetta circa il 3% della popolazione mondiale. I pazienti infettati sviluppano un'infezione cronica che, in alcuni casi, evolve in cirrosi e, nel 20% dei casi, in epatocarcinoma. La terapia anti-HCV attualmente in uso, basata sull'impiego di interferon ricombinante peghilato, in monoterapia o in combinazione con ribavirina, è efficace solo in circa il 55% dei casi e si associa ad effetti collaterali avversi. Pertanto, è urgentemente necessario lo sviluppo di nuove molecole antivirali specifiche per HCV. L'RNA polimerasi RNA-dipendente del virus, NS5B, è uno dei target virali più appetibili per lo sviluppo delle suddette molecole poichè è essenziale per la replicazione del genoma virale ed è virus-specifica.

Lo scopo del presente progetto sarà quello di saggiare nuove molecole anti NS5B che saranno opportunamente disegnate, selezionate e prodotte in base a studi di *docking* molecolare presso il Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco dell'Università di Roma Sapienza. Alcune delle molecole già prodotte e selezionate sono inibitori non nucleosidici, allosterici del sito catalitico di NS5B che saranno saggiati in un sistema *in vitro*, basato sulla trasfezione di RNA trascritto *in vitro* da un clone infettivo di HCV esprimente il gene luciferasi in frame con i geni virali. In tale sistema la misurazione della luciferasi consentirà di quantificare l'inibizione virale.

#### **Risultati attesi nel triennio**

L'analisi dell'efficacia degli inibitori allosterici di NS5B, testati nel modello pre-clinico di infezione virale consentirà di selezionare la/e molecole con maggiore efficacia nell'inibire la replicazione del virus intracellulare e la produzione di particelle virali nei sovrinatanti di coltura. Verranno identificate le concentrazioni efficaci (EC50) degli inibitori e la durata del trattamento. Dal presente studio ci si attende inoltre di identificare molecole anti-HCV che possano essere successivamente selezionate per le prove cliniche.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati dello studio saranno pubblicati su riviste internazionali sottoposte a *peer-review*.

I risultati sull'effetto del trattamento con gli inibitori di NS5B in colture cellulari infettate con HCV costituirà il punto di partenza per valutarne l'utilizzo nel trattamento dell'infezione da HCV, da soli o in associazione alla terapia convenzionale.

### **Valutazione nelle malattie infiammatorie croniche dell'intestino delle proprietà immunomodulanti di peptidi derivati dal grano**

Sulla base di recenti studi, dimostranti la capacità di un decapeptide derivato dal grano duro (p10mer, QPQDAVQPF) di stimolare in maniera antigene indipendente la produzione di IL-10 in linee T gliadina-specifiche, abbiamo valutato la capacità del peptide di prevenire/ridurre la severità della colite in modelli murini di malattie infiammatorie croniche intestinali. Abbiamo dimostrato che la somministrazione orale del decapeptide è in grado di ridurre la severità della colite da destrano sodio solfato (DSS). Ci si propone di valutare, negli stessi modelli sperimentali, altri peptidi ottenuti dal p10mer per sostituzione di singoli aminoacidi al fine di selezionare il peptide con la più alta attività di protezione dalla colite sperimentale.

### **Risultati attesi nel triennio**

Definizione della capacità della somministrazione orale/parenterale dei peptidi in studio di migliorare la colite sperimentale e selezione del peptide con più alta capacità di ridurre la severità della colite

### **Trasferibilità dei risultati**

Studio preclinico di efficacia propedeutico alla sperimentazione clinica in pazienti con morbo di Crohn e Colite ulcerosa.

## **Variabilità di antigeni di meningococco isolati da malati e da portatori**

Nell'ambito della sorveglianza delle malattie invasive da meningococco si intende studiare la variabilità genetica dei ceppi di sierogruppo C e di sierogruppo B isolati da malati e da portatori.

In particolare, per quanto riguarda la prevenzione delle meningiti/sepsi da meningococco, il progetto prevede di valutare la circolazione di varianti proteiche nei meningococchi di sierogruppo B isolati nel nostro territorio sia da malati che da portatori rispetto alle proteine incluse nel nuovo vaccino anti meningococco B, di analizzarne la *cross*-reattività e quindi di stimare la percentuale di casi prevenibili. È importante caratterizzare i ceppi a livello molecolare utilizzando saggi quali MLST al fine di evidenziare la presenza di cloni e/o *lineage* prevalenti nel nostro Paese. Per quanto riguarda i ceppi di meningococco di sierogruppo B sono attualmente in corso di valutazione nuovi candidati vaccinali corrispondenti a proteine di superficie individuate utilizzando l'approccio della *Reverse Vaccinology*. È tuttavia importante valutare la conservazione dei geni codificanti queste proteine tra ceppi di *N. meningitidis* responsabili di malattia invasiva. In particolare, si procederà all'analisi di sequenza di tre target molecolari: NMB2132 (287), NMB 1870 (741 o fHbp), NM1994 (NadA) su ceppi di meningococco B isolati negli ultimi due anni in Italia.

### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio sulla conservazione dei geni codificanti i nuovi candidati per il vaccino anti meningococco B permetterà di valutare se nel nostro Paese, così come è in corso di valutazione in altri Paesi europei, questi geni siano conservati all'interno della popolazione dei ceppi di meningococco di gruppo B.

Per quanto riguarda il vaccino anti-meningococco B, complessivamente, i risultati ottenuti permetteranno di stimare la percentuale di ceppi di meningococco B di recente circolazione nel nostro territorio verso i quali potrà esserci una efficace copertura vaccinale. L'analisi di sequenze codificanti le proteine in esame permetterà di valutare qualitativamente e quantitativamente la loro variabilità e le variazioni più frequenti.

Da questa ricerca si intende anche valutare se l'introduzione del vaccino anti meningococco C abbia contribuito a selezionare lineages di ceppi di gruppo C ipervirulenti e maggiormente rappresentati nel nostro Paese, responsabili di casi di malattia invasiva ad esito fatale.

### **Trasferibilità dei risultati**

I dati ottenuti da questo studio permetteranno, in primo luogo, di ottenere informazioni nuove sulle caratteristiche molecolari dei ceppi di meningococco isolati da casi e da portatori considerando le strategie vaccinali messe in atto nelle diverse Regioni italiane.

In secondo luogo, i risultati di questo studio permetteranno di valutare non solo l'incidenza dei casi dovuti a ceppi di gruppo B, ma anche di valutare e confrontare la conservazione di geni codificanti proteine in corso di valutazione come nuovi candidati per un vaccino anti meningococco B. Determinare la percentuale degli adolescenti sani colonizzati da meningococco e di questi quanti da meningococco B.

Valutare la *cross*-reattività tra gli antigeni proteici vaccinali e le proteine espresse in ceppi isolati da casi di malattia invasiva e da portatori di meningococco B e in un campione rappresentativo di altri sierogruppi mediante saggio ELISA MATS (*meningococcal antigen typing system*).

### **Verso una cura funzionale per HIV/AIDS**

Le terapie antiretrovirali hanno notevolmente allungato e migliorato la qualità della vita dei soggetti con HIV/AIDS, ma sono incapaci di ottenere la cura funzionale dell'infezione. La fuoriuscita dalla latenza virale può infatti determinare la perdita di controllo dell'infezione da parte del sistema immunitario. La latenza virale, il cui principale serbatoio è costituito dai linfociti T CD4+ *central e transitional memory* (TCM e TTM), è quindi un importante ostacolo al conseguimento della cura funzionale.

Il nostro approccio al problema HIV/AIDS si articola nei seguenti punti:

- intensificazione della ART (mega-ART: FTC, PMPA, RAL, DRV/r, maraviroc – MRV) *in vivo* in macachi cronicamente infettati con il virus SIVmac251;
- restrizione del serbatoio virale attraverso:
  - uso di composti pro-apoptotici e pro-differenzianti verso cellule a breve emivita: auranofin, pro-ossidante, che induce differenziamento e morte cellulare a carico del compartimento della memoria e butionina sulfossimina (BSO), che inibisce la sintesi intracellulare di glutatione;
  - riduzione del tasso di proliferazione delle cellule latentemente infettate TCM e TTM attraverso l'MRV (noto come inibitore del co-recettore CCR5). Esperimenti *in vitro* da noi effettuati sui linfociti T CD4+ hanno infatti evidenziato un'inibizione della proliferazione dose-dipendente dal MRV.
- simulazioni numeriche a partire da modelli matematici noti dell'infezione ed elaborazione di modelli matematici originali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

L'intensificazione della ART ha un ruolo preliminare, conducendo alla riduzione della carica virale e del DNA pro-virale *in vivo* al di sotto della soglia di rilevamento. Quest'ultimo risultato viene considerato una conseguenza dell'azione dell'MRV sulla proliferazione cellulare, coerentemente con recenti modelli matematici dell'infezione.

La combinazione di auranofin e BSO dovrebbe a questo punto condurre alla riduzione del serbatoio virale, agendo in particolar modo sui *pathway* cellulari dello stress ossidativo e dell'apoptosi.

A seguito della sospensione della terapia e della conseguente risalita della carica virale, un nuovo trattamento con mega-ART (limitato nel tempo), oltre a contenere nuovamente la carica virale al di sotto della soglia di rilevamento, dovrebbe portare al controllo spontaneo del virus da parte del sistema immunitario impedendo la ricostituzione del serbatoio virale. L'ultima fase potrebbe in seguito essere integrata da una nuova aggiunta di auranofin e BSO.

Le simulazioni da modelli matematici verranno usate regolarmente come supporto di interpretazioni biologiche di dati sperimentali. La modellizzazione originale avrà il compito di fornire stime numeriche di dati difficilmente accessibili con misure sperimentali e aiutare una migliore comprensione delle dinamiche quantitative tra le variabili in gioco.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il modello di macaco è ampiamente utilizzato nell'attività sperimentale per mimare la fisio-patologia dell'infezione da HIV nell'uomo. La prosecuzione naturale della cura funzionale prevista sul modello di macaco, quindi, consiste nell'attuazione di un trial clinico sull'uomo in pazienti affetti dal virus HIV.

Strategie potenzialmente in grado di condurre alla cura funzionale permetterebbero ai pazienti di abbandonare l'uso cronico di farmaci antiretrovirali, che determinano numerosi effetti collaterali. Inoltre, si otterrebbe un ingente risparmio di risorse da parte dell'SSN, dati gli ingenti costi di mantenimento del paziente con HIV.

Si prevede inoltre di ottenere nuovi brevetti (e di valorizzare brevetti esistenti), che potranno essere di grande interesse per l'industria farmaceutica.

### **Vettori micro-nanoparticellari con proprietà strutturali e di superficie specificamente progettate per la modulazione del sistema immunitario: l'immunoterapia delle allergie come *proof of concept***

Le nanotecnologie in biomedicina offrono numerosi vantaggi, quali la maggiore stabilità, biodisponibilità, biodistribuzione e la possibilità di indirizzo a specifici obiettivi. Micro-nanoparticelle (MNP) con funzione di veicolo per farmaci o vaccini possono essere specificamente ingegnerizzati per modulare nel senso desiderato le risposte immunitarie, agendo sulla loro dimensione, forma, superficie, carica, stato di aggregazione, solubilità. È fondamentale la valutazione del loro impatto sulle differenti popolazioni del sistema immunitario, al fine di ottimizzare il meccanismo di azione, e predire l'eventuale rischio immunologico.

In questo ambito, il progetto si propone di sviluppare i seguenti obiettivi:

- progettare, produrre e caratterizzare veicoli MNP con proprietà strutturali in grado di promuovere selettive interazioni con il sistema immunitario risultanti nella attivazione o modulazione della risposta immune;
- mettere a punto saggi *in vitro* per valutare la tossicità e il potenziale rischio immunologico associati a questi nanomateriali; valutare con studi *in vitro* e *in vivo* su modelli murini i meccanismi e gli esiti delle interazioni dei differenti veicoli MNP con il sistema immunitario, allo scopo di identificare i candidati ottimali per l'applicazione in immunoterapia;
- provvedere una *proof of concept in vivo* su modelli murini della capacità di tali veicoli di modulare la risposta allergica di tipo Th2 una volta complessati con l'antigene specifico.

#### **Risultati attesi nel triennio**

L'uso crescente di nanomateriali per applicazioni biomediche, come il trasporto di farmaci e vaccini o la diagnostica per immagini, è spesso in contrasto con la mancanza di adeguati dati relativi alla loro interazione con il sistema immunitario.

I risultati primari del progetto comprendono la produzione, caratterizzazione e valutazione funzionale di nuovi veicoli MNP di natura polimerica, che possono essere specificamente progettati per ottimizzare le desiderate interazioni con il sistema immunitario attraverso modificazioni delle proprietà chimico-fisiche di struttura e superficie. Questo consentirà la loro applicazione come presidi terapeutici per malattie infiammatorie e immuno-mediate o come vaccini per malattie infettive e tumori. Una *proof of concept* in modello murino del loro potenziale immunomodulatorio verrà inoltre fornito.

Un risultato secondario ma non meno rilevante sarà costituito dalla disponibilità di saggi *in vitro* adatti ed affidabili per la valutazione delle interazioni di MNP con differenti popolazioni cellulari del sistema immunitario, che potranno essere applicati alle valutazioni di immuno-sicurezza e all'identificazione di potenziali rischi immunologici.

### **Trasferibilità dei risultati**

Lo sviluppo di metodi per la valutazione di veicoli MNP in termini di immunotossicità, immunogenicità e proprietà immunomodulatorie contribuirà alla loro caratterizzazione preclinica dal punto di vista regolatorio, e all'implementazione di linee-guida specifiche.

La progettazione di nuove strategie di terapia e vaccinazione trarrà vantaggio dall'impiego di tali veicoli MNP, grazie alla possibilità di essere specificamente indirizzati a popolazioni cellulari del sistema immunitario sia per il trasporto dell'antigene che per il concomitante invio di segnali adiuvanti e immunomodulatori.

Lo sviluppo di soluzioni innovative per superare le limitazioni della corrente tecnologia vaccinale (stabilità e biodisponibilità degli antigeni implicati, problemi connessi a vie di somministrazione non invasive) produrrà strumenti applicabili alla immunoterapia e vaccinazione di massa, contribuendo a migliorarne l'efficacia e la sicurezza, di conseguenza risparmiando costi e risorse per la comunità.

### **Virus influenzali ricombinanti e strategie innovative di immunizzazione per HIV-1**

L'immunogenicità associata ai virus influenzali ricombinanti quali vettori di antigeni modello e il loro uso combinato con animali transgenici hanno consentito di stabilire relazioni fondamentali di immunobiologia. Nei nostri impieghi più diretti, i virus influenzali ricombinanti sono stati applicati all'analisi della risposta immune indotta attraverso le mucose genitali e specifica per patogeni sessualmente trasmessi quali il virus HIV-1. Nostri studi hanno dimostrato l'effettiva immunità protettiva inducibile con virus influenzali mediante infezione di topi per via vaginale. L'utilizzo di virus ricombinanti da noi recentemente ingegnerizzati e in grado di veicolare un polipeptido di 80 aminoacidi o la proteina Tat di HIV-1 rimarca l'efficacia di tale strategia nell'indurre una immunità cellulare e umorale rilevabile negli organi genitali. L'importanza di questi studi nella ricerca di un vaccino per HIV-1 è avvalorata dal generale consenso oggi raggiunto circa il possibile controllo della trasmissione sessuale del virus da parte di una immunità mucosale pre-esistente e dal parziale successo di un recente clinical trial di fase III, RV-144, che ha riaperto le speranze per un vaccino. I virusomi, derivati da virus ricombinanti, eventualmente implementati con antigeni esogeni, possono costituire un valido sistema di *delivery* vaccinale verso patogeni trasmessi sessualmente e rappresentano pertanto uno degli obiettivi principali della nostra ricerca.

### **Risultati attesi nel triennio**

La composizione antigenica ottimale di un vaccino per HIV-1 e i relativi correlati di protezione mancano ancora di una chiara definizione. Il consenso generale circa l'esistenza di una fase precoce dell'infezione vulnerabile ad un controllo dell'immunità delle mucose genitali è di grande rilievo e richiama la necessità di ulteriori studi riguardanti sistemi di *delivery* e proprietà associate allo stato di immunità delle mucose genitali quali sito induttivo di una risposta immune protettiva. Studi in modelli animali indicano che la protezione dall'infezione per via sessuale dipende fortemente da una continua e sostenuta immunità mucosale locale. È stato anche riportato che virusomi ricostituiti includendo la proteina gp41 di HIV-1 si sono mostrati capaci di indurre protezione contro l'infezione vaginale da *Simian-Human Immunodeficiency Virus* (SHIV). La strategia da noi adottata per generare virus influenzali ricombinanti e relativi virusomi che ne possono derivare appare nel giusto contesto degli studi in evoluzione diretti a definire loro proprietà immunogeniche e strategie di immunizzazione utili a mantenere un sostenuto livello di immunità a lungo termine. Tali approcci di studio, unitamente a collaborazioni con gruppi leader in queste problematiche e

L'ulteriore apporto di metodologie in grado di contribuire alla definizione e produzione di immunogeni specifici di HIV-1, possono costituire elementi promettenti per una reale valenza applicativa in questo contesto.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questa linea di ricerca si fonda sui virus influenzali ricombinanti, e virusomi da essi derivati, quale strumento per definire strategie di vaccinazione e protezione verso infezioni sessualmente trasmissibili in modelli animali. I virusomi ottenibili dai virus ricombinanti hanno alcune proprietà immunogeniche comparabili ai virus infettivi e possono costituire validi sistemi di *delivery* di antigeni con ricadute per l'SSN. I virusomi sono versatili, di facile manipolazione antigenica, largamente sperimentati nella vaccinazione influenzale e potenzialmente di grande utilità nel definire strategie per l'induzione di una immunità specifica a lungo termine contro patogeni sessualmente trasmissibili. L'applicabilità degli stessi principi e metodologie di studio indicate nel caso dell'HIV può essere mirata, attraverso programmi di studio nazionali, ad altri patogeni di elevato impatto sanitario quali il virus umano del papilloma e quindi costituire un valore aggiunto a questo tipo di studi.

#### **Computational virology: metodi matematici e filogenetici avanzati per predizioni virali**

Epidemie e pandemie virali hanno avuto un grande impatto nel mondo in termini economici sociali e politici. Molte volte gli scenari epidemici sono differenti a seconda del microorganismo che provoca l'epidemia. Tutto questo porta alla necessità di dover capire meglio il ruolo che gioca la diversità genetica, le specie presenti in misura minore, e le resistenze ai farmaci nella pratica clinica. Di grande importanza è anche aumentare la conoscenza circa i meccanismi associate alla trasmissione virale, alla resistenza ai farmaci, e le conseguenze associate. La disponibilità di analisi sofisticate dal punto di vista filogenetico e matematico, supportato dalla possibilità di avere dei dati clinici possono contribuire a migliorare le conoscenze dei meccanismi patogenetici correlati alla replicazione virale così come alla implementazione di terapie tagliate per paziente. I nuovi metodi di data mining costituiscono uno dei maggiori elementi di innovazione di questo progetto. L'applicazione di metodi filogenetici avanzati, di tipo Bayesiano e di *Maximum Likelihood*, saranno usati per ottenere importanti informazioni per il management clinico delle infezioni, in particolare per quelle sostenute da nuovi virus o da virus riemergenti che abbiano resistenze virali ai farmaci o che abbiano acquisito una abilità a difendersi dalle nuove strategie vaccinali

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi comprenderanno una migliore conoscenza degli aspetti virologici e nei metodi di analisi, nonché lo sviluppo di nuovi strumenti di analisi matematica e filogenetica. Nel progetto sarà anche possibile migliorare le conoscenze epidemiologiche di virus importanti come HIV, HCV ecc. Questo progetto servirà anche a sviluppare nuovi modelli predittivi per eventi epidemici e network di differenti *expertise* che possono interagire tra di loro. Sarà possibile classificare meglio ceppi virali e identificare mutazioni *multi locus*, stabilire le relazioni virus ambiente, sviluppare nuovi test binari e algoritmi per la risoluzione di problemi di classificazione virale. Questi metodi sono basati sull'uso di *Montecarlo Markov Chain* (MCMC) e *Probabilistic Cellular Automata* (PCA).

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati saranno utili per nuove strategie terapeutiche e vaccinali.

### **Gametocyte Assay for Malaria (GAM) for novel anti-transmission drugs**

Lo scopo del progetto GAM è quello di sviluppare saggi cellulari per misurare quantitativamente la maturazione e la trasmissione dei gametociti di *Plasmodium falciparum* (Pf GCT) in screening di composti anti-gametocita. Un *Dual Reporter Assay* (DR-GAM) è stato progettato per identificare inibizione in una fase iniziale o di una fase tardiva della gametocitogenesi. Il saggio misura simultaneamente attività di due luciferasi espresse da promotori gametocita-specifici. Verrà inoltre sviluppato un *Non-Transgenic Assay* (NT-GAM) basato su *imaging* cellulare, progettato per un'applicazione più ampia su diversi ceppi di laboratorio o isolati naturali di *P. falciparum*. Il saggio sarà basato su fluorescenza in gametociti e gameti con l'obiettivo di fornire informazioni sulla vitalità dei gametociti maturi. Lo sviluppo dei saggi sarà integrato dalla conduzione di esperimenti per misurare la capacità infettiva di gametociti in zanzara in infezioni sperimentali. La validazione dei saggi sarà ottenuta utilizzando farmaci antimalarici noti, prima della loro utilizzazione per lo screening di composti dalle collezioni disponibili. Il progetto sarà realizzato da un consorzio con esperienze sulla biologia dei gametociti di *P. falciparum* e lo screening cellulare di antimalarici, integrato da specifiche competenze in reporter bioluminescenti, saggi di luciferasi cellulari basati su e la tecnologia di *imaging* e da una *spin off* olandese.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Un *Dual Reporter Gametocyte Assay* per identificare il blocco in una fase iniziale o di una fase tardiva della gametocitogenesi in *P. falciparum*.

Un *Non-Transgenic Gametocyte Assay* basato su *imaging* di gametociti e gameti fluorescenti.

Validazione dei saggi con farmaci antimalarici noti.

Screening di piccole collezioni di composti per attività anti-gametocita.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Lo sviluppo su larga scala di un saggio per screening di sostanze anti-gametocita sarà trasferito ad agenzie in grado di sostenere lo screening *high throughput*. *Medicines for Malaria Venture* e la Glaxo SmithKline a Tres Cantos, Madrid sono i partner più probabili per la trasferibilità dei saggi GAM sviluppati in questo progetto

### **European West Nile Collaborative Research Project (EuroWN) (EU FP7)**

Zanzare del genere *Culex* sono vettori del virus della WN (WNV) e tra queste *Culex pipiens* s.l. sembra giocare un ruolo nel mantenimento e nella trasmissione del virus. È ancora in discussione se *Cx. pipiens* s.l. sia un complesso di specie o di forme geografiche con caratteristiche comportamentali ed ecologiche differenti. L'epidemiologia dell'infezione WNV coinvolge le due specie: i) *Cx. p. pipiens*, forma rurale e ornitofila, come vettore ponte di WNV tra uccelli migratori infetti e fauna aviaria indigena; ii) *Cx. p. molestus*, con preferenza alimentare per mammiferi e uomo, come vettore dell'infezione tra fauna aviaria indigena gli equini e l'uomo. Per valutare la competenza vettoriale popolazioni di *Cx. pipiens*, saranno testate per la suscettibilità al WNV mediante infezione sperimentale (metodo *membrane feeding*). Le alate ingorgate verranno monitorate per due-tre settimane per determinare la lunghezza del periodo d'incubazione del virus. Il potenziale di disseminazione e il tasso di trasmissione del virus da parte di *Cx. pipiens* verrà valutato esaminando la capacità delle femmine infette di trasmettere il virus a topini new-born (capacità vettoriale). Lo studio dell'overwintering sarà effettuato attraverso la ricerca del virus nella F1 delle zanzare. Esperimenti simili verranno effettuati anche su popolazioni di *Aedes albopictus* per valutare il possibile ruolo che questa specie, largamente diffusa in Europa, potrebbe giocare nella trasmissione e nel mantenimento del WNV.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Stabilizzazione di popolazioni di *Cx. pipiens* in condizioni di laboratorio.
- Dimostrazione della competenza vettoriale per il WNV di *Cx. pipiens* e *Ae. albopictus* attraverso la verifica dell'aumento del titolo del virus e della sua persistenza nei giorni successivi all'infezione sperimentale per via orale delle zanzare.

Dimostrazione della capacità di *overwintering* del WNV nel vettore attraverso la valutazione della presenza del virus nella F1 di femmine di *Cx pipiens* e *Ae. albopictus* infettate sperimentalmente.

### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- Valutare la competenza vettoriale di diverse popolazioni di *Culex pipiens*, che potrebbero presentare variazioni nella capacità di trasmettere il WNV.
- Messa a punto della tecnica d'infezione sperimentale orale con WNV di popolazioni di *Cx. pipiens* e *Ae. albopictus* con il metodo del *membrane feeding*.
- Raccolta e conservazione della progenie dal primo al terzo ciclo *gonothrophic* delle femmine infettate sperimentalmente.
- Pubblicazioni scientifiche in materia di competenza vettoriale di *Cx. pipiens* e *Ae. albopictus* per WNV.



**Dipartimento**  
**Malattie infettive, parassitarie e immunomediate**

---

**Attività di controllo, valutazione, parere**



### **Attività del Laboratorio Nazionale di Riferimento-Legionella**

Il Registro nazionale dei casi di legionellosi, presente nel Dipartimento MIPI, raccoglie le schede di sorveglianza dei casi di legionellosi notificati in Italia ed effettua attività di diagnosi su campioni clinici e ambientali, quando questi ultimi sono disponibili o quando viene richiesto dalle autorità sanitarie locali o in caso di eventi epidemici. Effettua altresì identificazione e tipizzazione su base fenotipica e genomica dei ceppi, effettuando confronti tra gli stipiti isolati dall'ambiente e quelli isolati dall'uomo al fine di risalire all'origine dell'infezione. Esso ha compiti di coordinamento e di riferimento diagnostico-microbiologico clinico-ambientale sia a livello nazionale, per i Laboratori regionali di riferimento, che europeo. È infatti il laboratorio di riferimento in Italia e per l'ECDC al quale riporta i dati nazionali relativi alla frequenza degli stipiti isolati e ai metodi diagnostici utilizzati. Queste informazioni si aggiungono poi a quelle epidemiologiche elaborate dal CNESPS con il quale il Registro presente nel Dipartimento MIPI lavora in stretta collaborazione.

#### **Attività programmata**

Nel triennio 2012-2014 continuerà l'attività di sorveglianza microbiologica della legionellosi e la tipizzazione dei ceppi soprattutto in relazione a *cluster* epidemici. Nel prossimo triennio è in programma inoltre uno studio di confronto tra il metodo colturale, la *Real Time* PCR e *viable Real Time* PCR per la ricerca di *Legionella* in campioni d'acqua. Nei prossimi tre anni parteciperemo a controlli di qualità per diagnosi di *Legionella* su campioni clinici e ambientali e a *proficiency* test per la tipizzazione di *Legionella* e per la ricerca di legionella in campioni clinici mediante *Real Time* PCR. Nel prossimo anno inoltre seguiremo l'iter per la pubblicazione delle nuove "Linee guida per il controllo e la prevenzione della legionellosi".

### **Attività del Supranational Reference Laboratory della WHO per la tubercolosi farmacoresistente**

Presso il Reparto Malattie batteriche respiratorie e sistemiche ha sede il *Supranational Reference Laboratory* (SRL) della WHO per la sorveglianza della TB farmacoresistente. A livello nazionale l'SRL coordina una rete di 34 laboratori in 19 Regioni presso i quali sono stati eseguiti cinque controlli di qualità per i farmaci antitubercolari di prima linea (Rifampicina, Isoniazide, Streptomina, Etambutolo) nel 1998, 2000, 2003, 2007, 2010, e un controllo di qualità per i farmaci di seconda linea (Kanamicina, Amikacina, Capreomicina, Ofloxacina) avviato nel 2010 in 12 laboratori. I risultati sono stati pubblicati nel 2011. Il laboratorio svolge, inoltre, attività di sorveglianza della TB farmacoresistente e diagnosi microbiologica dei ceppi. L'attività annuale di sorveglianza della TB farmacoresistente in Italia, avviata nel 2006, prevede la raccolta degli antibiogrammi dai 34 laboratori, che nel 2010 ha raggiunto una copertura del 59% delle notifiche nazionali. L'SRL, inoltre, analizza i dati e li trasmette al Ministero della Salute, il quale li invia all'ECDC, di cui il responsabile è *contact point*. Dai dati del 2010 si evince che la TB in Italia è un fenomeno correlato per il 65% all'immigrazione particolarmente dai Paesi dell'Europa orientale (Romania) e dell'ex Unione Sovietica (Ucraina, Moldavia). In 5.267 antibiogrammi del 2008-2010 si osserva che i ceppi di *Mtb* MDR circolanti in Italia sono stati isolati soprattutto da immigrati provenienti da Ucraina, Moldavia, Romania. Su richiesta degli ospedali, viene eseguito l'antibiogramma per i farmaci antitubercolari di seconda linea sui ceppi MDR e l'identificazione di ceppi di *Nocardia* mediante sequenziamento del gene *rRNA* 16S. Al fine di garantire una buona qualità del proprio operato, dal 1997 l'SRL di Roma partecipa annualmente ai controlli di qualità della WHO per la determinazione della

sensibilità ai farmaci antitubercolari di prima e seconda linea. Dal 2010 l'SRL di Roma partecipa inoltre al controllo di qualità organizzato dal *National Reference Laboratory* di Borstel (Germania), per la ricerca di Mtb nell'espettorato, l'identificazione molecolare delle specie micobatteriche, la determinazione fenotipica e molecolare della sensibilità di Mtb ai farmaci di prima e seconda linea. Tale attività (programma INSTAND) si iscrive nell'ambito del Progetto dell'ECDC *European Reference Laboratory Network* (ERLN), di cui l'ISS è partner. Le attività internazionali dell'SRL riguardano soprattutto il controllo di qualità dell'antibiogramma in Albania, Kosovo, Bulgaria, Macedonia, Turchia, Oman, Qatar, Bahrain. Finora sono stati eseguiti quattro controlli di qualità per i farmaci di prima linea (2002-03, 2005-06, 2007-08, 2010), e un controllo di qualità per i farmaci di seconda linea (2010). I risultati dei primi due *round* di controllo di qualità sono stati pubblicati nel 2008.

#### **Attività programmata**

A livello nazionale si prevede di continuare le attività di controllo di qualità, raccolta dati e coordinamento nel triennio 2012-2014 allo scopo di ampliare la rete attuale dei laboratori sentinella in Italia, strumento importantissimo per la sorveglianza epidemiologica della TB e delle sue forme farmacoresistenti. Si pensa inoltre di aumentare le attività di controllo nella rete dei laboratori introducendo il controllo di qualità molecolare per l'antibiogramma e per l'identificazione delle specie micobatteriche. A livello internazionale si prevede di continuare a partecipare ai controlli di qualità del WHO e dell'INSTAND, nonché di proseguire l'attività internazionale di controllo di qualità verso gli otto Paesi stranieri sopra citati.

#### **Attività di consulenza parassitologica per l'SSN**

Nei laboratori parassitologici del Dipartimento vengono svolte attività di consulenza per l'SSN nell'ambito della diagnostica, convenzionale e avanzata, e della terapia delle parassitosi endemiche e d'importazione. Saranno adoperate metodologie tradizionali morfologiche, immunologiche e di biologia molecolare.

#### **Attività programmata**

Le attività di consulenza e diagnostica parassitologica saranno continuate con le metodologie sopra indicate. Anche sulla base della pregressa esperienza, si stima che dette attività comporteranno l'esame di circa 600 campioni per anno.

#### **Attività di controllo e valutazione del Reparto di Malattie parassitarie gastroenteriche e tissutali**

Il Reparto di Malattie parassitarie gastroenteriche e tissutali conduce da tempo attività di controllo e valutazione sia a livello nazionale che internazionale sulle zoonosi parassitarie da elminti e protozoi trasmesse attraverso gli alimenti. Dal 27/7/2006, il Reparto è accreditato secondo la norma EN ISO/IEC 17025:2005 (numero di accreditamento SINAL 0689). Dal 1/7/2006, il Reparto è stato nominato Laboratorio Comunitario di Riferenza per i Parassiti (CRLP) per un periodo di cinque anni. Dal 13/11/2006, il Reparto è stato anche nominato dal Ministero della Salute quale LNR per *Trichinella*. Sono stati accreditati quattro metodi diagnostici (due sierologici, uno molecolare e uno parassitologico). Nel triennio 2006-2008 sono state eseguite le diagnosi (parassitologica, P; sierologica, S; molecolare, M) per le seguenti malattie parassitarie protozoarie ed elmintiche: i) per l'SSN: cisticercosi (S) (336), filariasi (S) (154), trichinellosi (S) (93), opisthorchiasi (P, S, M) 53, anisakiasis (M) (3), echinococcosi (M) 25, giardiasi (P) (51), criptosporidiosi (P) (62); ii) per il CRLP:

tipizzazione (M) di 673 isolati ed esame sierologico (S) di 354 sieri umani. Sono stati sviluppati nuovi test diagnostici per la tipizzazione molecolare dei parassiti dei generi: *Opisthorchis*, *Echinococcus*, *Anisakis* e *Pseudoterranova*. Inoltre sono stati forniti ceppi di riferimento ai laboratori esteri e nazionali di diagnostica e a centri di ricerca di 12 Paesi europei ed extraeuropei. Altre attività svolte dal personale del Reparto pareri di competenza su problemi sanitari.

#### **Attività programmata**

Nel triennio 2012-2014 si prevede l'accREDITAMENTO di nuove metodiche diagnostiche nel campo della sierologia, biologia molecolare e della parassitologia classica. Si prevede inoltre di continuare il supporto diagnostico e tecnico-scientifico all'SSN, agli Stati membri dell'UE e ai Paesi in via di sviluppo per le malattie parassitarie trasmesse con gli alimenti secondo quanto stabilito dal contratto tra l'ISS e la CE.

#### **Attività di controllo e valutazione su patogeni gram-positivi incluso corinebatteri**

Il Reparto provvede a fornire su richiesta di laboratori e ospedali dell'SSN l'identificazione e la tipizzazione molecolare di ceppi di batteri gram-positivi di rilevanza clinica nonché la determinazione della resistenza agli antibiotici con saggi fenotipici e genotipici. In particolare, si esegue la tipizzazione sierologica di ceppi di *Streptococcus pneumoniae*, data la rilevanza per la valutazione del vaccino glicoconiugato correntemente in uso, la determinazione genotipica della resistenza alla vancomicina in ceppi di enterococco, e la tipizzazione molecolare e ricerca di tossine (es. la leucocidina di Pantone-Valentine) in ceppi di *Staphylococcus aureus*. Un particolare compito è quello di centro di riferimento per la difterite: per il riconoscimento di ceppi tossigeni e non-tossigeni di *Corynebacterium diphtheriae* è stato messo a punto e utilizzato un metodo rapido di *real time* PCR. Inoltre il Reparto provvede alla diagnosi mediante tecniche tradizionali e/o molecolari di infezioni da patogeni difficilmente coltivabili quali clamidie, bartonelle, borrelie, rickettsie e l'agente eziologico del morbo di *Whipple*.

#### **Attività programmata**

Le attività sopra descritte continueranno nel prossimo triennio. In particolare si prevede di implementare le tecniche di diagnostica molecolare, soprattutto *real time* PCR per la diagnosi rapida di infezioni il cui riconoscimento precoce è essenziale per il paziente e per la Sanità Pubblica, nonché per la diagnosi di infezioni rare o da batteri difficilmente coltivabili. Tecniche molecolari soprattutto tecniche *sequence based* saranno routinariamente affiancate alle tecniche tradizionali di identificazione e sierotipizzazione.

#### **Attività di diagnostica**

Il Dipartimento MIPI svolge attività di diagnostica di diverso tipo. Viene richiesto un test diagnostico specifico da parte di centri ospedalieri in base al sospetto clinico. Nella maggior parte dei casi si tratta di ricerca di aspetti parassitari o batterici. Nei restanti casi, come avviene per il morbillo e la malaria, si tratta invece di conferme diagnostiche nell'ambito di sistemi di sorveglianza. Globalmente si tratta di oltre 200 esami effettuati ogni anno.

#### **Attività programmata**

Si prevede, anche per il prossimo triennio, un carico di lavoro costante sia di prime diagnosi che di conferme di test effettuati da centri periferici.

### **Attività di parere e valutazione (DL.vo 24/4/2006, n. 219)**

L'Unità varicella svolge un'attività di parere e valutazione per tutte le problematiche di competenza riguardanti i vaccini antivaricella, sia a livello nazionale che europeo. L'Italia svolge, da diversi anni, il ruolo di Stato di riferimento (RMS) per le procedure di mutuo riconoscimento e per tutte le annesse variazioni relative al Vaccino VARIVAX prodotto dalla Merck e commercializzato dalla Sanofi Pasteur.

#### **Attività programmata**

L'attività di parere e valutazione proseguirà per tutto il triennio.

### **Centro di Riferimento nazionale per la sorveglianza delle meningiti batteriche**

Mediante lettere circolari (n. 400.2/15/5709 del 29/12/1993 e n. 400.2/15/3290 del 27/7/1994) il Ministero della Sanità istituì e rese operante nel 1994 una rete di sorveglianza delle meningiti batteriche sul territorio nazionale sotto il coordinamento dell'ISS. Nel 2007 il Ministero della Salute ha ampliato, e quindi inglobato, quella sorveglianza nella "Sorveglianza Nazionale delle Malattie Batteriche Invasive" coordinata dal Dipartimento MIPI e dal CNESPS dell'ISS. I principali obiettivi della sorveglianza microbiologica sono: i) quantificare il contributo relativo dei tre principali batteri per i quali sono disponibili vaccini per l'infanzia (*Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, e *Streptococcus pneumoniae*); ii) raccogliere presso il Dipartimento MIPI i ceppi di *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* per una tipizzazione fenotipica e genotipica al fine di individuare cloni responsabili di focolai epidemici; iii) conoscere il sierogruppo/sierotipo prevalente per una mirata profilassi vaccinale; iv) analizzare il trend della sensibilità agli antibiotici per una corretta terapia e profilassi; v) conoscere l'incidenza nazionale e per Regione per anno; vi) riconoscere la nuova introduzione nel Paese di sierogruppi/tipi non comunemente circolanti; vii) riconoscere il *replacement* di sierogruppo/tipo a seguito di pressione vaccinale; viii) confrontare le caratteristiche dei ceppi coinvolti in differenti *cluster* o *outbreak*; ix) inviare i dati italiani nel database europeo coordinato dall'ECDC di Stoccolma per decisioni condivise a livello comunitario.

#### **Attività programmata**

Tutte le attività elencate verranno proseguite nel triennio e i rendiconti annuali inviati al Ministero della Salute, agli Assessorati delle Regioni e all'ECDC.

### **Centro nazionale per le Leptosirosi umane**

La leptosirosi è una zoonosi di grande rilevanza sia economica che sociale diffusa in tutto il mondo, in particolare nei paesi tropicali e sub-tropicali. La leptosirosi è attualmente considerata una malattia riemergente. Il rinnovato interesse è in gran parte dovuto ai numerosi episodi epidemici che si sono verificati negli ultimi anni in diverse parti del mondo; alcuni legati a competizioni sportive, altri associati ad alluvioni e inondazioni.

Il Centro nazionale per le Leptosirosi, operante presso il Dipartimento MIPI dell'ISS, ha attivato un sistema di sorveglianza diretto alle infezioni umane da *Leptospira*. Il sistema di sorveglianza prevede:

- conferma sierologica dei casi di sospetta leptosirosi segnalati dalle unità ospedaliere, mediante il metodo di referenza (microagglutinazione-MAT con leptospire vive) o kit ELISA commerciali;
- ricerca di DNA specifico su campioni biologici tramite PCR classica o *real time* PCR;
- raccolta e caratterizzazione molecolare ad antigenica dei ceppi isolati dai pazienti al fine di identificare i *serovar* circolanti sul territorio nazionale;

- verifica dell'adeguamento della batteria di ceppi utilizzata nella MAT in Italia per la sierodiagnosi della leptospirosi o di una eventuale introduzione di ceppi “nuovi” per il territorio;
- valutazione della sensibilità e della specificità di tecniche diagnostiche commerciali al fine di identificare quelle più idonee;
- indagini epidemiologiche nel campo delle infezioni umane o animali da *Leptospira* mirate.

#### **Attività programmata**

Le attività sopra descritte continueranno nel prossimo triennio. Le tecniche molecolari saranno affiancate alle tecniche tradizionali di sierotipizzazione. In particolare si prevede di implementare le tecniche di diagnostica e caratterizzazione molecolare dei ceppi esistenti nella ceppoteca e di eventuali nuovi isolati clinici. Saranno implementate soprattutto tecniche basate sul sequenziamento genico (MLST) e sull'identificazione di specifici marcatori (VNTR).

#### **Controllo di qualità nazionale delle tecniche immunogenetiche**

La qualità della tipizzazione HLA, effettuata sia con tecniche sierologiche che con tecniche genomiche, viene valutata annualmente sui laboratori italiani che funzionano da centri regionali di riferimento per i trapianti di organo e/o da registri per il trapianto di midollo osseo, più quelli che hanno ottenuto un accreditamento internazionale (al momento un totale di 40 laboratori). Tale attività, iniziata nel 1995 con la tipizzazione sierologica prima e quella molecolare dopo, nel 2002 si è arricchita di nuovi controlli di qualità per la prova di compatibilità pre-trapianto di organi solidi (*crossmatching*) e per la ricerca di anticorpi anti-HLA nei pazienti in lista di attesa di trapianto (PRA). Recentemente è stato introdotto lo schema sul monitoraggio del chimerismo, analisi effettuata dopo trapianto di cellule emopoietiche per valutare lo stato di attecchimento del trapianto. A tali programmi hanno aderito anche otto laboratori stranieri: Zagabria, Vienna, Bucarest, Tirana, Praga, Belgrado, la città serba di Novi Sad e quella rumena di Cluj. L'ISS svolge tale attività su delega del CNT, che ha il compito di definire i protocolli e i criteri di valutazione della qualità delle prestazioni in immunogenetica dei laboratori partecipanti, secondo la legge sui trapianti 91/99 e che sostiene le spese del controllo di qualità da alcuni anni. Si avvale, anche, della collaborazione dell'Immunoematologia del Policlinico Umberto I, Sapienza Università di Roma, che fornisce le sacche di sangue di donatori, necessarie per i diversi tipi di controlli, e di quattro accreditati che svolgono la funzione di laboratori di riferimento. La valutazione dei risultati segue le regole definite dalla *European Federation for Immunogenetics* (EFI) che ha come obiettivo quello di garantire l'uniformità della qualità della tipizzazione nei Paesi europei e promuovere scambi di organi tra di essi. I risultati vengono comunicati, tramite lettera, ai Direttori Generali e Sanitari delle AO, agli Assessorati alla Sanità e ai Coordinatori regionali per i trapianti d'organo. In caso i risultati non fossero soddisfacenti per due anni consecutivi, il laboratorio viene sospeso dall'attività per un minimo di due anni. Il controllo di qualità sulla tipizzazione HLA è strumento essenziale per: i) definire il livello della qualità della tipizzazione HLA nel nostro Paese; ii) rendere la qualità omogenea su tutto il territorio; iii) favorire contatti e scambi tra i laboratori; iv) valutare l'efficienza dei prodotti commerciali e non che vengono generalmente utilizzati. La partecipazione al controllo di qualità è condizione necessaria per la richiesta di accreditamento internazionale da parte dei laboratori.

### **Attività programmata**

Per il triennio 2012-2014 si prevede l'attività di controllo come sopra descritto. Il programma nazionale dei controlli di qualità in immunogenetica ha avviato le procedure per ottenere l'accreditamento EFI nel corso del 2012, con una validità triennale e successiva richiesta di rinnovo. L'accreditamento EFI è l'unica certificazione di validità internazionale esistente per questo tipo di programma.

### **Controllo di Stato (*Batch Release*) dei vaccini virali per uso umano (DM 7/4/1997 e DM 11/1/1999)**

Il Dipartimento si occupa del controllo di Stato dei vaccini antimorbillo, antiparotite, antirosolia monovalenti e polivalenti e del vaccino antivaricella. Per il vaccino antivaricella l'Italia funge da *Reference Member State* e provvede al *Batch release* per il mercato europeo.

Si occupa, inoltre, della valutazione dei dossier tecnici per i seguenti vaccini:

- vaccini antimorbillo, antiparotite, antirosolia monovalenti e polivalenti;
- vaccino antivaricella;
- vaccino tetravalente antimorbillo, antiparotite, antirosolia, antivaricella (per questo vaccino l'Italia funge da *Reference Member State*);
- vaccino antirabbico;
- vaccino contro la febbre gialla;
- vaccino contro l'encefalite trasmessa da zecche (TBE);
- vaccino contro l'encefalite giapponese;
- vaccino antivaaioloso.

### **Attività programmata**

L'attività sopra descritta proseguirà per tutto il triennio.

### **Controllo di stato vaccini per uso umano**

In qualità di laboratorio ufficiale di controllo (OMCL) esegue il controllo di Stato (*batch release*) dei vaccini antivaricella per il mercato nazionale ed europeo. Le procedure di *batch release*, secondo le linee guida dell'EDQM, prevedono l'esame critico dei protocolli di produzione e controllo relativi ad ogni singolo lotto, nonché un'attività sperimentale finalizzata a verificare la rispondenza del vaccino, in termini di qualità e sicurezza, ai requisiti stabiliti dalle Farmacopee italiana ed europea. Vengono eseguiti il saggio di *potency* e di *identity* su ogni lotto infialato di vaccino antivaricella pervenuto a controllo.

### **Attività programmata**

Proseguiranno le attività di controllo e valutazione del vaccino antivaricella secondo quanto previsto dai decreti legislativi. Si prevede che tale attività comporterà il controllo di circa dieci lotti infialati l'anno.

### **Controllo e certificazione dei dispositivi Medico-Diagnostici *in vitro* in base al DL.vo 8/9/2000 n.332 e CTS 2002/364/EC del 7/5/2002**

L'attività nel settore viene svolta, come servizio reso a pagamento (tariffe aggiornate: DM 30/4/2004 e 30/3/2005), con le seguenti modalità: i) controllo dei kit diagnostici (elencati nell'allegato II della Direttiva 98/79/CE) in fase di registrazione e di modifiche di registrazione, ai fini della commercializzazione; ii) controllo dei singoli lotti di produzione per i kit di rilevamento di marcatori dell'infezione da HIV (HIV-1/2), HTLV I e II e dell'epatite B, C e D. Le attività che dovranno essere svolte, in base alla normativa inclusa nella Direttiva 98/79/CE e relativo annesso tecnico (*Common Technical Specifications*: CTS

2002/364/EC del 7/5/2002 e CTS 2009/108/EC del 3/2/2009) includono la valutazione, con differenti modalità, di tutti i prodotti inclusi nell'Allegato 2, e pertanto, in aggiunta ai marcatori di infezione da HIV e da virus dell'epatite (Elenco A), anche di quelli di infezioni da rosolia, toxoplasmosi, citomegalovirus e clamidia (Elenco B). L'Allegato 2 include inoltre kit relativi alla determinazione dei gruppi sanguigni, di malattie ereditarie (fenilchetonuria, trisomia 21) di marcatori tissutali e tumorali (Elenco B). Per i prodotti relativi all'Elenco A sono previste le più stringenti condizioni di valutazione (controllo dei singoli lotti), per i prodotti inclusi nell'Elenco B valutazioni in fase di registrazione. Le valutazioni includono l'esecuzione di prove di laboratorio come previsto dalla CTS 2002/364/EC del 7/5/2002 e CTS 2009/108/EC del 3/2/2009); l'esame di documentazione tecnica come previsto dall'Allegato 1 della Direttiva. Tale documentazione deve includere i dati relativi a: i) produzione e controllo di qualità dei reagenti; ii) saggi di valutazione di efficienza e affidabilità; iii) studi di validazione clinica. Le valutazioni sono finalizzate alla definizione della: i) conformità ai requisiti essenziali previsti dalla normativa per la progettazione e per il processo di produzione; ii) conformità del prodotto ai requisiti previsti dalla normativa tecnica; iii) conformità del Sistema di Qualità, applicato anche ai fini della rintracciabilità. Il controllo è effettuato mediante: il controllo dei prodotti in fase di autorizzazione per la messa in commercio includente controlli di laboratorio ed esteso ai singoli lotti per i prodotti a rischio inclusi nella lista A dell'allegato 2 della Direttiva; il controllo del Sistema di Qualità messo in atto dalle ditte (attraverso visite e ispezioni). Le modalità tecniche e amministrative sono riportate nella Direttiva. È prevista l'attività permanente di un Comitato Tecnico-Scientifico della Direttiva per la continua revisione delle specifiche tecniche di ciascuna classe di prodotti a cui partecipano esperti dell'ISS. È previsto lo sviluppo di sistemi di sorveglianza in analogia a quanto applicato per la Direttiva 93/42/CE.

#### **Attività programmata**

Il programma prevede l'aggiornamento delle metodologie, finora eseguite sulla base delle regolamentazioni nazionali (DM 3/3/1987, DM 12/12/1992, DM 6/10/1998; CM 30/10/2000 e DM 21/1/2001), secondo i criteri della Direttiva 98/79/CE.

Le attività, per il triennio 2012-2014 includeranno il completamento del lavoro relativo all'iter registrativo. Le fasi successive saranno rivolte all'implementazione e allo sviluppo del programma in base ai contatti e alle richieste delle ditte produttrici di dispositivi medico-diagnostici *in vitro*.

#### **Controllo post-marketing dei vaccini anti-epatite A e anti-epatite B afferente al programma di controllo annuale della composizione dei medicinali; DL.vo 18/2/1977, n. 44**

In relazione all'attuazione del DL.vo 18/2/1977 n. 44 (attuazione della Direttiva 93/39/CEE che modifica le direttive 65/66/CEE, 75/318/CEE e 75/319/CEE relative ai medicinali) viene svolto, presso il Reparto Epatiti virali, il programma annuale di controllo dei vaccini anti-epatite A e anti-epatite B nell'ambito di convenzioni annuali del Ministero della Salute, AIFA e ISS. Tale controllo post-marketing viene effettuato, sui vaccini virali per uso umano, durante il periodo di validità dei vaccini, allo scopo di verificare eventuali presenze di alterazione delle caratteristiche chimico-fisiche che dovessero renderli non più idonei alla somministrazione. Tali evenienze renderebbero questi prodotti ad elevato rischio di non efficacia protettiva nei confronti di infezioni virali per alcune delle quali è anche prevista l'obbligatorietà della vaccinazione a scopo di profilassi (vaccino anti-epatite B). Sui

prodotti prelevati dal commercio vengono pertanto eseguiti i saggi di *potency*. L'attività comporta il controllo di circa nove lotti per anno.

**Attività programmata**

È previsto il controllo annuale su un totale di circa nove lotti di vaccini virali prelevati dal commercio ad opera del Ministero della Salute (NAS) e corrispondenti alle tipologie di: vaccino antiepatite-B, vaccino antiepatite-A, vaccino antiepatite-A+B, vaccino antiepatite B combinato con vaccini batterici. I lotti sono relativi a vaccini di differenti ditte produttrici e paesi di produzione. La selezione viene effettuata tenendo conto dei vaccini commercializzati in Italia. Su ciascun lotto di vaccino viene eseguito un saggio di *potency* con l'utilizzazione di tecnologie di titolazione con metodi di determinazione dell'immunogenicità *in vivo* (topo) e con metodi immunoenzimatici.

**Esame di richieste di autorizzazione alla sperimentazione animale, in deroga ai sensi degli art. 8-9 del DL.vo 116 del 27/1/1992**

Espressione del parere di competenza microbiologica, chemioterapeutica, immunologica e in particolare allergologica sulle autorizzazioni alla sperimentazione animale, inviate al Ministero della Salute da gruppi di ricerca pubblici e privati italiani, mediante analisi della documentazione relativa. In base alle competenze del responsabile, tale attività si esplica principalmente riguardo a protocolli sperimentali relativi allo studio di patologie immunomediatae o allergiche effettuato mediante opportuni modelli animali

**Attività programmata**

L'attività dipenderà esclusivamente dalle richieste del Settore per la Sperimentazione animale dell'ISS.

**Network europeo per la sorveglianza delle infezioni batteriche da agenti di bioterrorismo**

Presso il Dipartimento MIPI è operativa una unità che ha il compito di implementare la diagnosi microbiologica e la sorveglianza delle specie batteriche potenzialmente utilizzabili a scopo bioterroristico (*Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Coxiella burnetii*, *Burkholderia pseudomallei* e *Burkholderia mallei*) e che agisce per il potenziamento delle attività dell'SSN inerenti alla diagnosi tempestiva, all'identificazione definitiva e al monitoraggio ambientale di tutti i batteri patogeni di classe A mediante distribuzione di protocolli, collezioni batteriche e DNA estratti.

L'unità ISS partecipa dal 2007 al network europeo di 25 laboratori di 22 Paesi "Establishment of Quality Assurances for Detection of Highly Pathogenic Bacteria of Potential Bioterrorism Risk" coordinato dal *Robert Koch Institut* di Berlino, Germania (*Agreement* n. 2007 204/EAHC 2007), rifinanziato dall'*Executive Agency for health and Consumers* (EAHC; *Agreement* QUANDHIP n. 2010 21 02) per il periodo 2011-2013.

Il Network europeo finanzia la partecipazione a controlli di qualità ed esercitazioni basate sulla diagnostica tempestiva di batteri di classe A in matrici ambientali e da campioni clinici.

**Attività programmata**

Si prevede:

- Mantenimento e miglioramento delle attuali procedure di rilevazione rapida per l'identificazione in campioni clinici e ambientali onde specificamente rilevare la sorgente d'attacco.

- Implementazione e mantenimento delle procedure messe a punto per la rapida tipizzazione del ceppo usato per l'attacco bioterroristico e il confronto molecolare con i ceppi noti.
- Aggiornamento delle metodologie rapide molecolari per l'individuazione degli isolati d'attacco.
- Partecipazione annuale all'*European Quality Assurance* (EQA) di diagnostica coordinato dal *Robert Koch Institut* di Berlino

### **Network europeo per la sorveglianza delle infezioni batteriche invasive**

Il Dipartimento MIPI rappresenta attraverso i suoi esperti nelle malattie invasive da meningococco ed emofilo il laboratorio di riferimento nazionale per l'ECDC di Stoccolma. Le attività della sorveglianza nazionale vengono a scadenza raccolte e tradotte in formato Tessy, il nuovo sistema europeo di sorveglianza delle malattie infettive, trasmesse al Ministero della Salute e quindi all'Unità "Invasive Bacterial Diseases" dell'ECDC.

Nell'ambito di questa sorveglianza dell'ECDC un esperto del laboratorio di riferimento è stato nominato *contact person* per gli aspetti microbiologici specifici relativamente a *N. meningitidis* e *H. influenzae* con il compito di partecipare alle riunioni a livello europeo, di rispondere alle allerte comunitarie, di contribuire alla programmazione e alla stesura di specifici programmi in ambito comunitario.

Il laboratorio di riferimento ha raccolto, attraverso la sorveglianza nazionale, 2.121 notifiche di isolamenti di meningococchi, emofili e pneumococchi. Sono stati inviati circa 300 ceppi di meningococchi ed emofili da tipizzare come fenotipo e da caratterizzare a livello molecolare inviati dai laboratori periferici nazionali.

È stato istituito un sito web dedicato alla sorveglianza e un sistema di immissione online dei dati da parte dei laboratori di riferimento regionali (<https://www.simiweb.iss.it/sitomeningiti/>). Questo approccio permetterà una conoscenza in tempo reale delle caratteristiche dei ceppi responsabili di queste patologie nel territorio nazionale e quindi di confrontarle con i ceppi circolanti in Europa.

#### **Attività programmata**

L'attività di sorveglianza, controllo e valutazione sopra descritta proseguirà a livello nazionale e internazionale con gli stessi obiettivi e le stesse modalità.

In particolare:

- sarà implementato a livello delle singole ASL il sistema di notifica online al fine di rendere massima la tempestività della trasmissione dei dati da parte dei laboratori periferici;
- i ceppi di *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae* che perverranno al Laboratorio di riferimento nazionale continueranno ad essere sub tipizzati con metodi fenotipici e molecolari;
- i dati verranno trasmessi regolarmente al Ministero della Salute e all'ECDC nell'ambito dell'*European Invasive Bacterial Infections Surveillance Network*. Gli esperti per l'ECDC parteciperanno alle attività programmate da Stoccolma e alle riunioni europee.

### **Pareri per la Registrazione di presidi medico-chirurgici (Insetticidi e Ratticidi)**

Nei laboratori parassitologici del Dipartimento vengono rilasciati pareri per la registrazione di presidi medico-chirurgici, soprattutto di natura insetticida e raticida. Il rilascio di questi pareri avviene attraverso il coinvolgimento delle specifiche competenze parassitologiche.

### **Attività programmata**

Le attività di consulenza proseguiranno secondo le metodologie sopradescritte. Sulla base della pregressa esperienza, si stima che le domande di registrazione e i relativi pareri possono ammontare nel triennio a circa 350.

### **Partecipazione a studi collaborativi internazionali nell'ambito dell'attività di controllo**

Il monitoraggio della performance di un laboratorio che opera in un sistema di qualità è un requisito fondamentale per assicurare l'affidabilità delle metodiche analitiche utilizzate. Infatti la Farmacopea europea organizza annualmente programmi di valutazione esterna di qualità. In tale ambito il Reparto partecipa agli studi collaborativi di standardizzazione biologica (BSP), organizzati dall'EDQM.

### **Attività programmata**

Continuerà la partecipazione regolare agli studi di standardizzazione biologica organizzati annualmente dall'EDQM. Sono previsti nuovi studi di standardizzazione di metodiche per la valutazione dell'attività del virus vaccinale della varicella e dei virus morbillo, parotite e rosolia.

### **Partecipazione al Gruppo di lavoro ISS sui nanomateriali**

Il mondo dei nanomateriali abbraccia molteplici aspetti della realtà scientifica e produttiva. Allo stato attuale è uno dei settori di ricerca e sviluppo con le ricadute più interessanti dal punto di vista delle innovazioni tecnologiche. L'ISS ha costituito nel 2011 il Gruppo di lavoro "Nanomateriali e Salute" per raccogliere le competenze e le esperienze di esperti da sei Dipartimenti e Centri (AMPP, TES, SPVSA, FARM, MIPI, CSC), che vanno dalla ricerca preclinica e clinica, allo sviluppo di metodologie appropriate per la caratterizzazione dei NM e la valutazione del rischio ad essi associato, all'attività regolatoria per la sicurezza e il controllo di qualità.

### **Attività programmata**

Nell'ambito del Gruppo, l'esperienza del Dipartimento MIPI sull'immunologia e sulle malattie immunomediate consentirà nei prossimi anni lo sviluppo di metodologie per lo studio delle interazioni di NM con il sistema immunitario. Infatti, l'impiego crescente di NM a fini biomedici (veicoli per diagnostica per immagini, *carrier* per farmaci e vaccini, ecc.) è tuttora limitato dalla mancanza di dati relative alle loro interazioni con le varie componenti del sistema immunitario. I risultati di questi studi contribuiranno a migliorare la caratterizzazione preclinica, dal punto di vista del rischio immunologico e della immunotossicità, di NM destinati ad applicazioni biomediche, e in parallelo ad implementare le linee-guida necessarie a fini regolatori.

### **Programma di controllo annuale della composizione dei medicinali**

L'AIFA, su proposta dell'ISS, sentita la Commissione Unica del Farmaco (CUF) e il CSS, predispone annualmente un programma di controllo della composizione dei medicinali, la cui attuazione è affidata all'Istituto. In questo ambito il Reparto effettua i controlli post-marketing sui lotti di vaccini antivaricella, antimorbillo, antiparotite e antirosolia già immessi sul mercato allo scopo di verificare se, durante il periodo di validità, possano verificarsi situazioni in cui l'attività biologica del farmaco subisca alterazioni.

### **Attività programmata**

La partecipazione all'attività di sorveglianza post-marketing verrà eseguita secondo un programma annualmente concordato con l'AIFA.

### **Programma di controllo annuale della composizione dei medicinali (DL.vo 18/2/1977, n. 44)**

In relazione all'attuazione del DL.vo 18/2/1977 n. 44 (attuazione della Direttiva 93/39/CEE che modifica le direttive 65/66/CEE, 75/318/CEE e 75/319/CEE relative ai medicinali) viene svolto, presso il Reparto Epatiti virali, il programma annuale di controllo dei vaccini anti-epatite A e anti-epatite B nell'ambito di convenzioni annuali del Ministero della Salute, AIFA e ISS. Tale controllo post-marketing viene effettuato, sui vaccini virali per uso umano, durante il periodo di validità dei vaccini, allo scopo di verificare eventuali presenze di alterazione delle caratteristiche chimico-fisiche che dovessero renderli non più idonei alla somministrazione. Tali evenienze renderebbero questi prodotti ad elevato rischio di non efficacia protettiva nei confronti di infezioni virali per alcune delle quali è anche prevista l'obbligatorietà della vaccinazione a scopo di profilassi (vaccino antiepatite B). Sui prodotti prelevati dal commercio vengono pertanto eseguiti i saggi di *potency*. L'attività comporta il controllo di circa nove lotti per anno.

### **Attività programmata**

È previsto il controllo annuale su un totale di circa nove lotti di vaccini virali prelevati dal commercio ad opera del Ministero della Salute (NAS) e corrispondenti alle tipologie di: vaccino antiepatite-B, vaccino antiepatite-A, vaccino antiepatite-A+B, vaccino antiepatite B combinato con vaccini batterici. I lotti sono relativi a vaccini di differenti ditte produttrici e paesi di produzione. La selezione viene effettuata tenendo conto dei vaccini commercializzati in Italia. Su ciascun lotto di vaccino viene eseguito un saggio di *potency* con l'utilizzazione di tecnologie di titolazione con metodi di determinazione dell'immunogenicità *in vivo* (topo) e con metodi immunoenzimatici.

### **Revisione d'analisi di infestazione entomatiche di alimenti e identificazione di contaminanti in preparati medicinali**

La presenza di artropodi negli alimenti può costituire non solo un limite per la commerciabilità del prodotto, venendo a mancare i requisiti igienici, ma essere anche causa di danni per la salute umana. Il Reparto di Malattie trasmesse da vettori e sanità internazionale esegue le revisioni di analisi dei controcampioni di alimenti giudicati in prima istanza non regolamentari perché contaminati da parassiti in base alla L. n. 283 del 30/4/1962, art. 5, comma d. Le analisi vengono eseguite su diverse categorie di prodotti alimentari, fra le quali pasta, funghi, sfarinati, riso, datteri, sono le matrici con un numero maggiore di campioni esaminati. L'esame entomatico dei campioni è condotto sia con metodi di micro-analisi quali il *filth-test* applicato agli sfarinati e ai prodotti di trasformazione (GU n. 186 del 10/8/1994), sia con le più comuni tecniche di diagnosi macro e microscopica. In particolare, per la determinazione delle impurità entomatiche nei funghi, il metodo fa riferimento ad una procedura operativa standard in uso presso il Reparto.

### **Attività programmata**

Le attività saranno continuate con le metodologie esposte nel prossimo triennio con una frequenza stimata sulla base dell'esperienza pregressa in un numero di circa 25 per anno.

### **Sorveglianza della malaria d'importazione**

La malaria è una malattia a notifica obbligatoria in Italia. I laboratori delle ASL effettuano una diagnosi di malaria su strisci ematici dei casi clinici osservati. I casi positivi vengono notificati dalle Autorità sanitarie regionali al Dipartimento della Prevenzione del Ministero della Salute, Ufficio V, Malattie infettive e profilassi internazionale. Gli strisci ematici e la scheda di notifica standard (contenente dati demografici, epidemiologici, clinici e parassitologici) per ogni caso di malaria sono inviati al Reparto di Malattie trasmesse da vettori e sanità internazionale per la conferma della diagnosi.

#### **Attività programmata**

Le attività proseguiranno secondo le metodologie sopradescritte. Sulla base della pregressa esperienza, si stima che i preparati emoscopici che saranno esaminati possono ammontare nel triennio a circa 2.700.

### **Sorveglianza dell'AIDS e dell'infezione da HIV**

In Italia, la raccolta dei dati sui casi di AIDS è iniziata nel 1982, nel giugno 1984 è stata formalizzata in un Sistema di sorveglianza nazionale a cui pervengono le segnalazioni dei casi di malattia diagnosticati dalle strutture cliniche del Paese. Con decreto 28/11/1986 n. 288 l'AIDS è divenuto in Italia una malattia infettiva a notifica obbligatoria. Dall'inizio dell'epidemia a dicembre 2010, in Italia sono stati notificati 62.617 casi cumulativi di AIDS con un tasso di letalità totale del 62,8%. L'incidenza dei casi di AIDS è andata aumentando nel corso degli anni sino al 1995; in seguito si è verificata una tendenza alla diminuzione. La maggiore sopravvivenza delle persone HIV positive si traduce in un numero sempre più elevato di persone infette viventi, che prolungando il periodo di trasmissione, potrebbe preludere ad una riemergenza dell'epidemia. All'interno di elaborate strategie di controllo della pandemia da HIV/AIDS, appare chiaro che la sorveglianza dei casi di AIDS viene superata dalla sorveglianza dell'infezione da HIV che acquista un valore estremamente importante per descrivere i fattori di rischio e la vulnerabilità di chi contrae questa patologia. Raccogliere e analizzare i dati relativi all'incidenza, prevalenza, impatto stratificato per sesso ed età, definire i fattori sociali, culturali ed economici significa verificare e aumentare la possibilità che politiche di controllo appropriate cambino veramente il grado di rischio di tutta la popolazione. Il Ministero della Salute, con Decreto in data 31/3/2008 (GU n. 175 del 28/7/2008), ha promosso l'attivazione del sistema di sorveglianza delle nuove diagnosi di infezione da HIV, provvedendo ad aggiungere l'infezione da HIV all'elenco della Classe III delle malattie infettive sottoposte a notifica obbligatoria. Come indicato nel decreto, l'ISS ha il compito di raccogliere, gestire e analizzare tali dati e di assicurare un pronto ritorno delle informazioni. La sorveglianza delle nuove diagnosi di infezione da HIV, che riporta i dati relativi alle persone che risultano positive al test HIV per la prima volta, nel 2010 è stata attivata in tutte le Regioni italiane. I dati riportati da questo sistema di sorveglianza indicano che nel 2010 sono stati diagnosticati 5,5 nuovi casi di HIV positività ogni 100.000 residenti. L'incidenza è maggiore al centro-nord rispetto al sud-isole.

#### **Attività programmata**

Nel prossimo triennio proseguirà l'attività di controllo attraverso il Registro nazionale AIDS per monitorare la diffusione della malattia conclamata e verrà potenziato il controllo delle nuove diagnosi di infezione da HIV, attraverso il Sistema di sorveglianza HIV. Nel triennio 2012-2014 proseguirà: i) la verifica dei decessi in soggetti HIV-positivi (con AIDS e non) per studiare le cause di mortalità, per stimare la sottotifica dei casi di AIDS, e per elaborare accurate stime di sopravvivenza; ii) il lavoro di sviluppo di modelli matematici per ricostruire l'incidenza dell'infezione da HIV e per valutare con buona approssimazione le

dimensioni dell'epidemia HIV; iii) l'analisi dei dati delle nuove diagnosi di infezione da HIV relativi alla popolazione straniera e per valutare le reali dimensioni dell'infezione in questa popolazione; iv) la raccolta di informazioni attendibili sulla prevalenza di HIV/Sifilide/HBV/HCV e di comportamenti a rischio tra MSM, mediante l'utilizzo di metodi non invasivi (test su fluido orale) e di un questionario; v) lo studio per valutare la prevalenza HIV nelle donazioni di sangue eseguite presso i Centri trasfusionali italiani. È stata, inoltre, programmata uno studio per raccogliere informazioni sulle caratteristiche (socio-demografiche, comportamentali, cliniche, viro-immunologiche, terapeutiche) delle persone che vivono con infezione da HIV/AIDS in Italia, che coinvolgerà alcuni centri clinici.

### **Sorveglianza e controllo delle infezioni da patogeni enterici**

Presso il Dipartimento MIPI è attivo da molti anni un laboratorio di riferimento nazionale per le infezioni da patogeni enterici con i seguenti compiti:

- sorveglianza di laboratorio (Enternet Italia);
- consulenza diagnostica per le strutture dell'SSN (conferma dei ceppi isolati dai laboratori periferici, controlli di qualità, tipizzazioni fenotipiche e molecolari);
- intervento in caso di episodi epidemici;
- didattica.

In particolare il laboratorio: i) conduce indagini diagnostiche su casi sporadici ed epidemici di infezione da patogeni enterici quali *Salmonelle*, *Campylobacter*, *Vibrio*, *Shigelle*, ii) tipizza con tecniche fenotipiche e molecolari ceppi isolati da casi clinici, alimenti e animali, iii) fornisce stipiti di riferimento a laboratori dell'SSN, iv) ospita per brevi periodi di addestramento alle tecniche di laboratorio operatori di laboratori dell'SSN, v) organizza iniziative didattiche anche in collaborazione con altri enti o società scientifiche.

I dati raccolti nell'ambito della sorveglianza Enternet vengono regolarmente tradotti in formato Tessy, il nuovo sistema europeo di sorveglianza delle malattie infettive, trasmessi al Ministero della Salute e quindi all'Unità "*Foodborne and Waterborne Zoonotic Diseases*" dell'ECDC di Stoccolma.

Nell'ambito della sorveglianza europea *Foodborne and Waterborne Zoonotic Diseases* dell'ECDC un esperto del laboratorio di riferimento è stato nominato *contact person* per gli aspetti microbiologici specifici relativi a *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia* e *Shigella* con il compito di partecipare alle riunioni a livello europeo, di rispondere alle allerte comunitarie, di contribuire alla programmazione e alla stesura di specifici programmi in ambito comunitario.

#### **Attività programmata**

L'attività di sorveglianza, controllo e valutazione sopra descritta proseguirà a livello nazionale e internazionale con gli stessi obiettivi e le stesse modalità.

Sarà implementato il sistema di notifica on line al fine di rendere massima la tempestività della trasmissione dei dati da parte dei laboratori periferici.

I ceppi di *Salmonella* e *Campylobacter* che perverranno al Laboratorio di riferimento Nazionale continueranno ad essere sub tipizzati con metodi fenotipici e molecolari.

I dati verranno trasmessi regolarmente al Ministero della Salute e all'ECDC nell'ambito del *Foodborne and Waterborne Disease Network*.

L'esperto per l'ECDC parteciperà al workshop annuale e alle riunioni programmate.

## **Sorveglianza sentinella delle malattie a trasmissione sessuale (MST)**

Le Infezioni Sessualmente Trasmesse (IST) costituiscono un vasto gruppo di malattie infettive molto diffuse in tutto il mondo, che può essere causa di gravi complicanze per milioni di persone ogni anno, e le cui cure assorbono ingenti risorse finanziarie. La maggior parte delle IST si verifica nei Paesi in via di sviluppo ma queste sono molto diffuse anche nei Paesi più sviluppati, come l'Europa occidentale e gli Stati Uniti. In questi Paesi, dagli anni settanta alla fine del secolo scorso, si è assistito, da un lato ad un progressivo aumento delle IST virali (*Papillomavirus* umano, *Herpes simplex virus* di tipo 2, HIV) e, dall'altro ad una sostanziale diminuzione delle IST batteriche (sifilide, gonorrea, linfogranuloma venereo). Dopo il 2000, insieme al persistente aumento della diffusione delle IST virali, si è verificato anche un nuovo e inaspettato aumento della circolazione delle IST batteriche, soprattutto nelle grandi metropoli e in alcuni gruppi di popolazione maggiormente a rischio (es. maschi omosessuali). Per questi motivi, recenti direttive di organismi internazionali (ECDC, WHO) hanno raccomandato agli Stati dell'UE di migliorare i sistemi di sorveglianza epidemiologica delle IST, al fine di: standardizzare la raccolta dei dati; migliorare i flussi informativi per un più rapido monitoraggio delle incidenze; estendere la sorveglianza anche a patologie a larga diffusione ma più spesso asintomatiche (es. infezione da *Chlamydia trachomatis*); incrementare la consapevolezza pubblica del ruolo delle IST nella trasmissione/acquisizione del virus dell'HIV; aumentare l'impegno delle istituzioni nella prevenzione e nel controllo delle IST. In Italia, un Programma Integrato di Sorveglianza e Controllo delle IST e dell'infezione da HIV è stato avviato nel 2006 (finanziato dal CCM del Ministero della Salute) e ha consentito di sottoporre il Sistema di sorveglianza nazionale delle MST, attivato nel 1991, sotto il coordinamento del Centro Operativo AIDS (COA) dell'ISS e con la collaborazione di centri clinici specializzati, ad alcune integrazioni metodologiche, migliorandone la raccolta e l'invio dei dati. Inoltre, sia per rispondere alle recenti direttive in tema di sorveglianza e controllo delle IST, sia per migliorare le conoscenze sulla diffusione di queste infezioni nel nostro Paese, il COA, in collaborazione con l'Associazione Microbiologi Clinici Italiani, ha avviato nel 2009, una seconda sorveglianza delle IST basata sulla segnalazione di nuovi casi di infezione da *Chlamydia trachomatis*, da *Neisseria gonorrhoeae* e da *Trichomonas vaginalis*, da parte di una rete sentinella di laboratori di microbiologia. Presso tali laboratori pervengono campioni biologici di provenienza diversa, che riflettono un'utenza territoriale molto ampia e più simile alla popolazione generale, diversamente dai centri clinici IST specializzati nella gestione di soggetti più a rischio.

### **Attività programmata**

L'attività parallela delle due Reti sentinella consentirà di: analizzare e interpretare gli andamenti delle IST; identificare i fattori di rischio associati; stimare la prevalenza e l'incidenza delle IST; condurre una sorveglianza dei comportamenti nei pazienti con IST; monitorare l'andamento dell'infezione da HIV nei pazienti con IST; promuovere il miglioramento della qualità degli interventi di controllo mediante la diffusione di linee guida nazionali e specifici protocolli di trattamento; programmare interventi efficaci di prevenzione primaria e secondaria diretti a gruppi target; predisporre interventi di allocazione mirata delle risorse finanziarie. Verranno realizzati tre rapporti tecnici a scadenza annuale (*Notiziario dell'ISS*) e due articoli internazionali. Continuerà l'adeguamento dei contenuti preventivi, dei linguaggi e degli strumenti di diffusione dell'informazione e dell'educazione alla salute sessuale nonché della possibilità dell'anticipo diagnostico di alcune malattie (es. screening per Ct nelle giovani donne), attraverso la collaborazione con esperti del settore e la partecipazione a corsi su IST. L'elevato standard dei dati raccolti, sia dai centri clinici che dai laboratori, consentirà all'Italia di integrare e

confrontare i propri dati con quelli raccolti dalle altre sorveglianze europee, contribuendo alla sorveglianza europea delle IST coordinata dall'ECDC.

### **Sorveglianza sulle infezioni invasive da streptococchi beta-emolitici**

L'unica forma di malattia infettiva da streptococco beta emolitico che rientra nel sistema di notifica di malattie infettive di classe II, secondo il DM 15/12/1990, è la scarlattina. Pur nella consapevolezza che certe forme morbose anche molto gravi quali la fascite necrotizzante o lo shock settico non sono malattie comunitarie con pericolo di insorgenza epidemica (con qualche eccezione) la malattia invasiva da streptococco beta emolitico (streptococco di gruppo A, B, C e G) costituisce un evento non raramente fatale o invalidante con pesanti ricadute socio-economiche. Il Reparto ha coordinato nel passato due sorveglianze passive sulla malattia invasiva da streptococco di gruppo A: una nel triennio 1994-1996 su mandato ministeriale a seguito dell'allerta proveniente dai paesi del nord Europa dove, soprattutto nel Regno Unito, si era registrato un drastico aumento di casi di fascite necrotizzante e l'altra negli anni 2003-2005 come partecipante al progetto STREP-EURO, finanziato dalla Comunità europea. Inoltre, il Reparto ha coordinato il primo studio policentrico sulla malattia invasiva neonatale da streptococco di gruppo B in Italia nel triennio 2007-2010, finanziato dal Ministero della Salute. Mentre alcuni Paesi europei hanno stabilito dei centri di riferimento nazionali per la notifica dei casi di infezione invasiva da streptococchi beta emolitici e, in Inghilterra particolarmente, dal 2010 l'infezione invasiva da streptococco di gruppo A è stata inclusa tra le malattie ad obbligo di notifica, la reale incidenza della malattia in Italia rimane sconosciuta e le segnalazioni sono su base volontaria. Il Reparto provvede a fornire su richiesta degli ospedali l'identificazione e la tipizzazione sierologica e molecolare di ceppi di streptococco beta emolitico da infezioni invasive in adulto e neonato. Nel caso in cui le tecniche microbiologiche convenzionali non siano in grado di fornire una identificazione soddisfacente, vengono utilizzate tecniche molecolari quali il sequenziamento del gene per l'rRNA ribosomiale 16S e analisi filogenetiche, oppure l'amplificazione di regioni cromosomali specie-specifiche. In particolare, le attività di tipizzazione comprendono per lo streptococco di gruppo A, C, G la determinazione del tipo di proteina M tramite un saggio di amplificazione genica e sequenziamento (*emm typing*) e screening dei geni per superantigeni; per lo streptococco di gruppo B (*Streptococcus agalactiae*) la determinazione del sierotipo tramite metodi sierologici e un test molecolare di multiplex PCR sviluppato dal nostro gruppo, screening per fattori di virulenza e analisi delle varianti alleliche. Viene anche determinata la resistenza agli antibiotici eritromicina, clindamicina e tetraciclina con saggi fenotipici e genotipici.

#### **Attività programmata**

Si prevede la continuazione e implementazione delle capacità diagnostiche, di tipizzazione e determinazione della resistenza agli antibiotici di streptococchi beta emolitici. A conclusione dello studio policentrico sulla malattia invasiva neonatale da Guillain-Barre Syndrome (GBS), l'attività di sorveglianza e ricerca proseguirà con la raccolta di segnalazioni volontarie delle infezioni e aborti per sepsi streptococcica e, possibilmente, dei ceppi batterici per la tipizzazione microbiologica, promuovendo l'iniziativa presso gli Assessorati della Sanità regionali e i centri nascita pubblici e privati. L'attivazione di un Registro nazionale della malattia neonatale invasiva da GBS sarà quindi particolarmente utile per una valutazione sempre più realistica di quanto questa infezione incida sulla salute del neonato e della mamma nel nostro Paese. L'analisi dei sierotipi batterici responsabili della malattia invasiva neonatale e della mamma colonizzata, quando possibile, permetterà di monitorare la diffusione e le caratteristiche di virulenza dei cloni circolanti. La disponibilità

di dati epidemiologici e sulle caratteristiche della malattia potranno essere inoltre estremamente utili in considerazione del fatto che la messa a punto di un vaccino (di cui uno sviluppato in Italia) potrebbe a breve essere disponibile per l'utilizzo nella popolazione.

### **Vaccini antinfluenzali: attività di controllo, valutazione e consulenza**

Le principali attività del Reparto riguardano lo studio dei virus influenzali circolanti nella popolazione umana e in ospiti animali, con particolare riferimento a quelli coinvolti nella trasmissione all'uomo di virus pandemici. Visto il carattere fortemente zoonotico dell'influenza e le molteplici e complesse interrelazioni esistenti tra influenza umana e animale, le linee di attività risultano strettamente collegate e finalizzate al raggiungimento di un comune obiettivo, che consiste nella prevenzione dell'influenza nelle sue diverse forme epidemiche e pandemiche. Nell'ambito del Programma Mondiale di Sorveglianza dell'Influenza della WHO, il Reparto fa capo al Centro Nazionale Influenza (NIC), collegamento istituzionale tra ISS e Ministero della Salute. Il NIC fa parte, su designazione del Ministero, della rete internazionale mondiale di oltre 130 Laboratori di riferimento nazionale, coordinati dalla WHO per lo svolgimento delle attività del *Global Influenza Programme* (GIP). In qualità di WHO-NIC (Centro di Riferimento nazionale della WHO) e su designazione del Ministero della Salute, il GIP proseguirà nelle attività finalizzate allo studio dei virus influenzali circolanti nella popolazione sia in periodo epidemico che pandemico. Gli studi saranno prioritariamente finalizzati all'aggiornamento annuale del vaccino stagionale, nonché alla messa a punto di vaccini pandemici. Tutti i laboratori del Network WHO vengono regolarmente validati, attraverso lo svolgimento di *External Quality Assessment Projects* (WHO-EQAP), effettuati semestralmente nell'ambito di *External Quality Assessment Programme for the Detection of Influenza Virus Type A by PCR*. I risultati ottenuti sono inviati presso l'ECDC di Stoccolma. A livello nazionale, l'attività del NIC si avvale della collaborazione di una rete di laboratori accademici e/o ospedalieri (Rete Influnet), presenti nella maggior parte delle Regioni italiane. Ulteriori attività svolte dal Reparto comprendono attività regolatorie e di parere che riguardano: i) risposta ad interrogazioni parlamentari; ii) formulazione di pareri, su richiesta del Ministero della Salute su tutte le problematiche relative alla qualità dei vaccini influenzali e al loro impiego; iii) valutazione di dispositivi diagnostici per la diagnosi di laboratorio dell'infezione da virus influenzali umani circolanti in periodo epidemico, per l'identificazione delle varianti antigeniche emergenti, da includere nel vaccino di nuova formulazione. Le attività del Reparto, inoltre, vengono espletate nell'ambito di numerosi Progetti di ricerca finanziati a livello nazionale e/o europeo.

#### **Attività programmata**

Il Reparto si occuperà principalmente delle infezioni da virus influenzali, umani e animali. Nell'ambito del WHO-GIP il NIC svolgerà: sorveglianza virologica dei virus influenzali nella popolazione italiana (omologia antigenica e genetica fra ceppi circolanti e vaccinali); pianificazione nazionale della campagna annuale di immuno-profilassi; predisposizione del Piano Pandemico Nazionale; standardizzazione di nuove tecniche diagnostiche e addestramento di personale dei Centri periferici di collaborazione; invio dei dati necessari all'aggiornamento settimanale dei siti web nazionali (Ministero della Salute) e internazionali (WHO ed ECDC); validazione semestrale da parte della WHO attraverso lo svolgimento di EQAP; collaborazione con la Rete dei Laboratori Periferici (Influnet) distribuiti sul territorio nazionale e con la rete di medici sentinella che forniscono campioni biologici e informazioni cliniche, per le indagini virologiche ed epidemiologiche; attività di

monitoraggio della farmaco-suscettibilità dei virus influenzali stagionali circolanti in Italia. Il Reparto svolgerà inoltre le attività regolatorie e di consulenza, precedentemente descritte.

### **Valutazione dell'ammissibilità alla sperimentazione clinica di fase I di nuovi farmaci**

Una importante attività svolta dall'ISS è quella connessa al rilascio dell'autorizzazione alla sperimentazione clinica di fase I di nuovi farmaci, per il cui svolgimento è stata istituita nel 2002, in accordo con i DL.vi 211/2003 e 200/2007 e con il DPR n. 439, la commissione AIFA-Ministero della Salute per l'ammissibilità alla sperimentazione clinica di fase I. La Commissione si avvale di una lista di esperti (*Assessor*) ISS, chiamati a dare il loro parere di competenza per la valutazione dei dati di qualità, farmacotossicologia preclinica, protocolli clinici che costituiscono i dossier relativi ai farmaci sottoposti ad autorizzazione.

#### **Attività programmata**

Numerosi esperti del Dipartimento MIPI, nominati dal Presidente, partecipano e continueranno a partecipare nel prossimo triennio contribuendo con le loro specifiche competenze a questa attività di valutazione nel rispetto della normativa, assicurando un elevato profilo scientifico dei pareri nel rispetto dei principi di indipendenza e trasparenza nonché di rispetto dei tempi di valutazione.

### **Valutazione e controllo disinfettanti e biocidi**

Presso il Dipartimento MIPI è stato istituito un gruppo di lavoro (comprendente esperti del MIPI e del CRIVIB) che ha il compito di esprimere su richiesta del Ministero della Salute, pareri tecnici sull'efficacia di prodotti disinfettanti relativamente all'attività battericida, fungicida e virucida, necessari per la registrazione come presidi medico chirurgici. Il Dipartimento MIPI e il CRIVIB inoltre partecipano, attraverso due rappresentanti (con funzioni, rispettivamente, di esperto per l'attività battericida e fungicida, e di esperto per l'attività virucida e *Convenor* del *Virus Task Group*, VTG), ai lavori del CEN – *Technical Committee 216/ Disinfectant* che produce le Norme europee per la regolamentazione della dimostrazione di efficacia di questi prodotti.

#### **Attività programmata**

Proseguimento dell'attività di valutazione dei dossier per la registrazione a seconda delle richieste pervenute dal Ministero della Salute. Preparazione di un nuovo standard europeo per la valutazione dell'attività virucida dei disinfettanti su superficie (esperto del CRIVIB).

Proseguimento dell'attività di valutazione di efficacia dei disinfettanti come presidi medico chirurgici. Il numero dei prodotti sembra rimanere costante negli anni.

L'esperto per l'attività virucida e *Convenor* del VTG (CRIVIB) fungerà da coordinatore di un *Ring Trial*, per la messa a punto di un saggio per la valutazione dell'attività virucida dei disinfettanti su superficie, cofinanziato dall'*European Free Trade Association* (EFTA) e dal CEN.



**Dipartimento**  
**Sanità pubblica veterinaria e sicurezza alimentare**

**Attività di ricerca**



### **Messa a punto e validazione di un metodo biomolecolare per la ricerca del virus dell'epatite E nei molluschi eduli lamellibranchi**

I molluschi bivalvi sono tra le principali cause di epidemie di origine alimentare sostenute da virus. In questi ultimi anni, alle più note malattie alimentari sostenute da Norovirus ed epatite A, l'attenzione della sanità pubblica sta volgendo verso un "nuovo" patogeno: il virus dell'epatite E. Alcuni dati relativi alla sua diffusione in umana sono forniti dal SEIEVA, che ha attribuito al virus dell'epatite E (HEV) quasi il 10% dei casi di epatite acuta diagnosticati in unità di malattie infettive in Italia e in Francia. Scopo di questa ricerca è lo sviluppo, la validazione e la standardizzazione di un metodo di biologia molecolare che assicuri un buon livello di sensibilità e specificità per la diagnosi di HEV in molluschi bivalvi. L'utilizzo della metodica per un monitoraggio delle produzioni di molluschi eduli lamellibranchi prodotti negli specchi d'acqua della Campania, consentirà la valutazione dell'eventuale circolazione del virus dell'epatite E nella zona con conseguente primo approccio ad una valutazione del rischio della popolazione che per abitudini alimentari è solita mangiare tale prodotto crudo o poco cotto.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Sviluppo, validazione e standardizzazione di un metodo di *Real time* PCR per la determinazione dell'epatite E nei molluschi bivalvi.
- Valutazione dell'eventuale circolazione dell'HEV nelle zone di allevamento dei molluschi della regione Campania con conseguente primo approccio ad una valutazione del rischio della popolazione che per abitudini alimentari è solita mangiare tali prodotti crudi o poco cotti.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Acquisizione di dati utili per la valutazione del rischio riguardo alla presenza di HEV nella filiera dei molluschi bivalvi.

### **Safe Food for Europe – Coordination of research activities and dissemination of research results of EC funded research on food safety (FOODSEG)**

Questo progetto di *coordination and support action* ha l'obiettivo di diffondere lo stato dell'arte riguardo i risultati della ricerca nella sicurezza alimentare attraverso l'organizzazione o la partecipazione a una serie di simposi, incontri di gruppo di lavoro di esperti e attraverso la creazione di una piattaforma online. Inoltre tale progetto ha il fine di costruire proposte per la preparazione di attività future in cooperazione tra le varie istituzioni partecipanti al progetto con il fine di partecipare a progetti finanziati dalla CE nel VII PQ e in altri progetti incentrati sulla sicurezza alimentare.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Quest'azione di coordinamento porterà alla preparazione di progetti di ricerca altamente innovativi nel campo della sicurezza alimentare.

FOODSEG collegherà gli istituti di ricerca e le imprese di produzione in campo alimentare dei Paesi aderenti alla CE e ai Paesi candidati, al fine incrementare la collaborazione tra loro.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le *review* preparate nell'ambito di questo progetto saranno trasferite a tutti gli operatori coinvolti nella sicurezza alimentare in Italia attraverso l'organizzazione di corsi o convegni.

### **Additivi alimentari: valutazione dell'esposizione della popolazione italiana**

La presenza di additivi nei prodotti alimentari è fondata sul principio della verifica di innocuità delle sostanze utilizzate.

Al fine è stato definito l'obbligo di procedere a studi per valutare l'esposizione della popolazione al fine di individuare eventuali problemi di ordine sanitario.

Una *task* della UE ha definito criteri armonizzati per la stima delle assunzioni di additivi con la dieta e ha identificato le sostanze che necessitano di metodologie di stima più raffinate.

Lo studio prevede la determinazione dei livelli di presenza di acido benzoico, solfiti e edulcoranti artificiali negli alimenti attraverso lo sviluppo di metodi di analisi e la successiva valutazione della esposizione della popolazione generale e dei segmenti di popolazione più vulnerabili (bambini, adolescenti) mediante metodi di combinazione binari tra dati di consumo e livelli di presenza degli additivi con descrizione dell'assunzione totale.

L'acido benzoico è stato scelto a in funzione della sua potenziale intrinseca tossicità e del suo utilizzo in molti alimenti consumati preferibilmente da bambini e adolescenti.

I solfiti sono stati selezionati per la grande diffusione di impiego in diversi gruppi di alimenti e alle sue potenzialità allergizzanti.

Gli edulcoranti costituiscono una categoria funzionale particolare; la possibilità di libero impiego nelle produzioni di alimenti e bevande ha determinato negli ultimi dieci anni un crescente uso di tali sostanze.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Obiettivo dello studio è l'individuazione di eventuali situazioni di rischio correlate all'uso di tali additivi nelle produzioni alimentari e la definizione di un criterio metodologico di stima delle esposizioni a sostanze potenzialmente tossiche presenti negli alimenti eventualmente trasferibile ad altre problematiche analoghe (aromi, coloranti).

#### **Trasferibilità dei risultati**

Trasferimento dei metodi di analisi ai laboratori del controllo ufficiale dei prodotti alimentari; trasferimento dati di esposizione in ambito comunitario per eventuali revisioni della normativa.

### **Predisposizione e attuazione del programma regionale di audit presso i Servizi competenti in materia di sicurezza alimentare della Regione e della ASL della Valle d'Aosta, ai sensi dell'art. 11 bis della Legge regionale 28/4/1998, n. 18**

Il progetto si pone l'obiettivo di allineare le procedure della Valle d'Aosta a quanto previsto dai regolamenti comunitari attraverso il costante monitoraggio dei bisogni formativi del personale coinvolto con addestramento all'uso degli strumenti previsti dai Regolamenti 882/2004 e 854/2004, anche attraverso l'elaborazione dello standard di funzionamento regionale sulla base del lavoro svolto dal gruppo di lavoro Ministero/Regioni/ISS.

Revisione delle procedure gestionali e attuazione dei programmi di audit presso i servizi competenti.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Implementazione di un sistema di gestione che permetta di predisporre e attuare il piano regionale di audit presso i servizi competenti in materia di sicurezza alimentare della Valle d'Aosta.

### **Trasferibilità dei risultati**

Trasferimento delle conoscenze e degli opportuni strumenti tecnici agli operatori della Regione Valle d'Aosta.

Supporto tecnico-scientifico all'Autorità competente.

### **Aggiornamento della equazione di conversione per la determinazione della carica batterica nel latte crudo da metodo optofluorimetrico**

Il Reg 1664/2006 consente l'impiego di metodi alternativi per la conta delle colonie a 30°C nel latte crudo (metodo di riferimento EN ISO 4833) purché convalidati secondo EN ISO 16140 e con rapporto di conversione tra metodo alternativo e metodo di riferimento secondo ISO 21187. A tutt'oggi nessuno dei metodi alternativi per la determinazione della flora totale nel latte crudo è stato coerentemente validato, pertanto al XIII workshop degli LNR per il latte, l'EU-RL *for milk and milk product* si è fatto carico della preparazione di un documento per i criteri di validazione secondo EN ISO 16140. Attualmente in Italia è disponibile una equazione di conversione per il calcolo della conta batterica totale del latte a partire da risultati ottenuti da metodo optofluorimetrico. Tale retta, prodotta dal Centro di riferimento per il latte bovino (IZS della Lombardia e dell'Emilia Romagna – LER), risente del fatto che non è pienamente rappresentativa del territorio nazionale, non è aggiornata e, nell'ottica della realizzazione di una retta unica europea da parte dell'LNR, dovrebbe essere corroborata da una casistica maggiore di dati. È stato quindi predisposto un progetto (in collaborazione con IZS-LER e IZS del Lazio e della Toscana – LT), per aggiornare tale retta. Sono stati censiti tutti i laboratori italiani che utilizzano il metodo optofluorimetrico e invitati alla raccolta dati, fornendo risultati per 20-100 con i due metodi, secondo protocollo accuratamente standardizzato. L'elaborazione statistica sarà effettuata dall'IZS-LER.

### **Risultati attesi nel triennio**

Definizione di una equazione di conversione per la determinazione della carica batterica nel latte crudo da metodo optofluorimetrico, a valenza nazionale e comprensiva dei diversi parametri (qualità del latte, profilo microbiologico del latte, area geografica, stagionalità).

### **Trasferibilità dei risultati**

La nuova equazione di conversione sarà di immediato utilizzo in quanto validata rispetto alla UNI EN ISO 4833, di valenza nazionale perché elaborata da dati raccolti su tutto il territorio nazionale e, alla luce del progetto comunitario di sviluppare una retta unitaria, sarebbe pienamente rappresentativa della realtà italiana

### **Alimenti irradiati: qualità e identificazione di alimenti di origine vegetale con effetti benefici sulla salute**

Nel corso degli ultimi anni si è assistito ad un sempre più crescente interesse da parte del consumatore e dell'industria per gli alimenti di origine vegetale con effetti benefici per la salute tra cui gli integratori a base di erbe. Gli effetti benefici di tali integratori sono dovuti alla presenza di minerali, vitamine e composti bioattivi ai quali viene attribuita una elevata attività antiossidante e una varietà di potenziali meccanismi di azione nella prevenzione di diverse malattie. Gli ingredienti vegetali utilizzati, vengono generalmente sottoposti a diversi trattamenti di decontaminazione tra cui quello con radiazioni ionizzanti. La sicurezza d'uso degli alimenti irradiati è stata più volte ribadita da diverse autorità internazionali. Numerosi studi sono stati effettuati su vitamine (radio-sensibili) e su diversi alimenti ma pochi studi sono stati condotti sui principi attivi presenti nelle piante e sulla loro capacità antiossidante *in toto*.

Il progetto si propone di studiare gli effetti dell'irraggiamento sulla composizione degli integratori a base di erbe e/o loro ingredienti al fine di valutare le eventuali modifiche radio-indotte che possono influenzare negativamente le caratteristiche salutistiche del prodotto. Parallelamente, verranno messi a punto e ottimizzati i metodi per la rilevazione del trattamento con radiazioni ionizzanti così come fortemente raccomandato dalla Commissione della Comunità europea.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Nel corso del triennio verranno messi a punto i metodi in grado di misurare la capacità antiossidante, il contenuto totale dei polifenoli e il contenuto dei singoli composti bioattivi (antocianine, catechine, acidi fenolici) che caratterizzano le matrici oggetto di studio. Tali metodi (spettrofotometrici e cromatografici) saranno applicati alle matrici trattate a diverse dosi, nel tipico range di trattamento, e a differenti tempi dall'irraggiamento per valutare la stabilità delle modificazioni radio-indotte.

Una valutazione degli effetti dell'irraggiamento sarà quindi effettuata attraverso una analisi statistica dei risultati ottenuti. La parte sperimentale sarà preceduta dalla selezione degli integratori da valutare basata sulla composizione in composti bioattivi, sui loro effetti benefici e sulla loro presenza sul mercato nazionale.

Inoltre, differenti metodi per il rilevamento dell'irraggiamento nelle matrici selezionate, basati sulle tecniche di foto e termoluminescenza saranno applicati a campioni non irradiati e irradiati a differenti dosi al fine di sviluppare e validare idonei protocolli da applicare nel controllo ufficiale. La validazione dei protocolli verrà effettuata attraverso test-interlaboratorio condotti con alcuni IZS partecipanti al progetto.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- Divulgazione dei risultati scientifici ottenuti sulla qualità degli integratori a base di erbe trattati con radiazioni ionizzanti all'industria, ai consumatori e alle autorità scientifiche nazionali ed europee.
- Diffusione dei protocolli per il rilevamento dell'irraggiamento nelle matrici selezionate presso i laboratori deputati al controllo ufficiale.
- Rafforzamento del sistema di controllo del Ministero della Salute.

### **Applicazione di metodologie diagnostiche per la determinazione di contaminanti chimici e biologici nelle matrici vegetali: razionalizzazione delle strategie di validazione per l'accreditamento ai fini dei controlli ufficiali**

Il progetto è finalizzato alla predisposizione e organizzazione di attività intervalutativa tra i laboratori per la valutazione dei metodi di analisi utilizzati per la determinazione di metalli pesanti (arsenico, cadmio, piombo e mercurio) in alimenti vegetali al fine di armonizzare le attività sul tutto il territorio nazionale valutando il livello di conformità alle normative vigenti di tutti i soggetti coinvolti.

In particolare saranno predisposti opportuni materiali di riferimento, preliminarmente testati attraverso i saggi di omogeneità, che costituiranno i campioni di controllo per i laboratori al fine di soddisfare quanto previsto al punto 5.9 della norma ISO 17025:2005.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Validazione dei metodi di analisi utilizzati nel controllo ufficiale di alimenti vegetali per la determinazione di metalli pesanti.
- Caratterizzazione dei materiali di riferimento.
- Stima dell'incertezza di misura attraverso prove di riproducibilità.

### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- Diffusione dei metodi di analisi validati e valutati.
- Distribuzione ai laboratori nazionali dei materiali di riferimento da utilizzare nel controllo di qualità.

### **Aspetti epidemiologici e molecolari delle salmonellosi in Italia: studio dell'interazione tra uomo, animali, alimenti e ambiente**

Le salmonelle sono considerate un'importante causa di tossinfezione alimentare per l'uomo, rappresentando così un importante problema di sanità pubblica. Le salmonelle hanno un'ecologia complessa, che coinvolge animali domestici e selvatici che si comportano da serbatoi dell'infezione, ambiente, in cui le salmonelle si trovano e possono diffondersi e alimenti, che si possono contaminare lungo le varie fasi di produzione e causare infezioni nell'uomo. La sorveglianza nei confronti delle zoonosi trasmesse dagli alimenti si è attivata a livello di Comunità europea (Direttiva 99/2003/CE). Il controllo dei serbatoi animali e alimentari, per completare la valutazione del rischio di esposizione nell'uomo e di diffusione negli animali, deve essere associato ad un controllo delle salmonelle in ambiente. L'attività di sorveglianza delle salmonellosi nell'uomo in Italia ha rilevato l'insorgenza di fenomeni epidemici causati da sierotipi (S. Napoli, S. 4,[5],12:i:-) legati a particolari serbatoi animali o ambientali, evidenziando l'esigenza di acquisire ulteriori informazioni su questi aspetti. Il progetto si propone di studiare le caratteristiche degli isolati di *Salmonella* ottenuti da varie fonti (uomo, animali, alimenti, ambiente) cercando di investigare sia ceppi epidemici che endemici nelle popolazioni e nell'ambiente, per valutare le possibili correlazioni tra i casi umani e le possibili fonti di esposizione. Saranno inoltre studiati gli aspetti epidemiologici ed ecologici.

### **Risultati attesi nel triennio**

Questa attività si propone di effettuare un'analisi sui principali sierotipi di *Salmonella* circolanti, di individuare eventuali serovar emergenti e di studiare i ceppi epidemici e le loro correlazioni con particolari serbatoi sia di origine animale che ambientale. In particolare l'utilizzo di tecniche microbiologiche classiche e metodiche molecolari innovative permetterà di identificare:

- correlazioni filogenetiche tra gli isolati per definirne l'ecologia, l'epidemiologia e valutare il rischio di esposizione per l'uomo;
- fattori di virulenza utili a chiarire il loro ruolo nella patogenesi e la loro associazione con particolari serovar;
- la presenza di eventuali nuovi cloni circolanti associati a particolari serbatoi animali e ambientali;
- la capacità di alcuni serovar di crescere e sopravvivere in nuovi serbatoi;
- la presenza di nuove resistenze agli antibiotici;
- l'utilizzo dei dati molecolari come la presenza di determinanti di virulenza e l'individuazione di cloni circolanti nelle diverse origini, potrebbe permettere di identificare le possibili fonti di esposizione per l'uomo.

### **Trasferibilità dei risultati**

I dati raccolti durante questo studio permetteranno in generale di aumentare le conoscenze sulle infezioni da *Salmonella* nell'uomo, sulle probabili nuove fonti di infezione e sulla loro ecologia. Lo sviluppo di tecniche innovative per l'individuazione dei fattori di virulenza, delle resistenze agli antibiotici e di nuovi cloni circolanti con caratteristiche di trasmissibilità animale/ambiente/uomo è un ulteriore strumento per ottimizzare le reti di

sorveglianza dei patogeni a trasmissione alimentare e per la resistenza agli antibiotici sia nella medicina umana che veterinaria. Le informazioni raccolte saranno utili anche per aiutare organismi competenti nel settore della prevenzione e controllo delle malattie zoonotiche sulla scelta degli eventuali interventi da utilizzare.

### **Bio-preparedness measures concerning prevention, detection and response to animal bio- terrorism threats (AniBioThreat)**

Il progetto è sviluppato al fine di migliorare le misure in materia di prevenzione, rilevamento e risposta alle minacce di bioterrorismo e ai reati connessi in questo campo. Il progetto servirà inoltre a rafforzare la cooperazione e a promuovere la creazione di reti di laboratori in ambito europeo al fine di incrementare la sicurezza sia nel campo della salute animale che umana. Gli obiettivi del progetto si basano principalmente sulle raccomandazioni riportate nel report del 2009 dalla task *Chemical, Biological, Radiological and Nuclear* (CBRN) della Direzione Giustizia, Libertà e Sicurezza della Comunità Europea, principalmente riguardo le minacce sugli animali, sugli alimenti e sui mangimi. Le attività dell'unità ISS sarà focalizzata principalmente nello sviluppo di metodi analitici per la determinazione di agenti biologici che possono essere causa di malattia nell'uomo o nell'animale, e che possono ritrovarsi negli alimenti o nei mangimi naturalmente o aggiunti deliberatamente

#### **Risultati attesi nel triennio**

I principali risultati del progetto saranno:

- Avviare l'attività di una rete europea composta da laboratori idonei, attrezzati e forniti di personale specializzato e metodi atti a rispondere a atti di bioterrorismo.
- Sviluppare strumenti di rilevazione che possono essere utilizzati per l'individuazione di malattie, come il botulismo e le malattie virali negli animali e nell'uomo.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I metodi sviluppati per l'individuazione di malattie, come il botulismo in animali, e delle malattie virali (virus dell'influenza aviaria nel pollame, norovirus nell'uomo e negli animali e infine virus ancora "sconosciuti" nei vegetali) saranno distribuiti ai laboratori veterinari dell'SSN italiano con un incontro dedicato alla fine del progetto da tenersi presso la sede dell'ISS.

### **Biosensore avanzato a cellule batteriche ingegnerizzate per lo screening di residui chinolonici nel latte come biomarker per il controllo del tempo di sospensione nelle produzioni bovine**

La somministrazione degli antibiotici chinolonici agli animali da reddito pone il problema della presenza dei residui di tali sostanze nel latte oltre i limiti massimi residuali accettabili (Reg. 470/2009).

Il progetto consiste nello sviluppo di un dispositivo sensoristico automatizzato a microrganismi ingegnerizzati per il monitoraggio da campo semiquantitativo degli stessi. Il progetto prevede dunque l'ingegnerizzazione di opportuni ceppi batterici con vettori plasmidici disegnati *ad hoc*. Grazie alla presenza di geni codificanti proteine luminescenti posti sotto il controllo di un promotore inducibile dai chinoloni, si avrà la produzione di un segnale bio-ottico in risposta alla presenza dell'antibiotico specifico nel *milieu* extracellulare. La misura del segnale sarà effettuata dal dispositivo sensoristico SNOOP (brevetto italiano RM2011A000193 del CNR). Il prototipo progettato è anche integrabile nella piattaforma

multi sonda BEST (Brevetto europeo PCT/2009/000293 dell'ISS), in grado di rilevare in continuo e in parallelo l'esposizione a sostanze tossiche.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Tramite l'impiego di opportune tecniche di ingegnerizzazione genica, ci aspettiamo di ottenere ceppi batterici in grado di produrre, attraverso il costrutto promotore-gene reporter inserito, segnali bio-ottici in risposta alla presenza del contaminante chinolonico fino ai limiti di interesse e in tempi relativamente brevi. Mediante analisi condotte in parallelo sul medesimo campione di latte, la performance analitica del dispositivo sarà confrontata con quella dei test ELISA e dei metodi per lo screening di routine dei chinoloni nel latte, soprattutto in termini di limite di rilevabilità, sensibilità, specificità e tempi di risposta.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il dispositivo proposto potrebbe costituire un tassello tecnologico innovativo nel sistema di tracciabilità di filiera, paragonabile ai metodi tradizionali di screening/post screening in termini di accuratezza e riproducibilità, e in grado di affiancare e potenziare gli strumenti di controllo documentali e procedurali ad oggi in uso. Utilizzabile sia in produzione primaria che all'interfaccia con la post-primaria, il dispositivo consentirebbe di evitare la presenza in filiera di prodotti potenzialmente pericolosi per i consumatori e di prevenire i danni economici dovuti a produzioni inadatte al consumo. La progettazione di questo tipo di dispositivo può rappresentare inoltre il punto di partenza per la messa a punto di biosensori per lo screening simultaneo di più famiglie di antibiotici. Saranno valutate le possibili strategie per ottimizzare costi e tempi di esecuzione della prova così da favorire e garantire un'alta prestazione del dispositivo sul mercato.

### **Brucellosi animali: studio di nuove misure di sorveglianza sierologico-epidemiologica e di presidi immunizzanti innovativi**

Gli obiettivi della nostra ricerca riguardano la messa a punto di tecniche diagnostiche innovative per il rilievo della risposta anticorpale e cellulo-mediata indotta dai diversi ceppi, anche rugosi, di *Brucella* e l'individuazione di ceppi di *Brucella* idonei all'allestimento di vaccini innovativi.

In particolare, sono in corso studi su ceppi di *B. melitensis* con fenotipo rugoso. Tale specie è considerata la più indicata per l'allestimento di un vaccino unico, in grado di proteggere tutte le specie animali da tutte le specie patogene di *Brucella*.

Sulla base dei nostri studi preliminari, il ceppo rugoso *B. melitensis* B115 ha dimostrato di possedere caratteristiche particolarmente favorevoli per un suo utilizzo come vaccino (ha virulenza residua ridotta, non induce anticorpi che interferiscono nella diagnosi di routine, è protettivo nei confronti di diverse specie di *Brucella*, possiede una peculiare mutazione che consente una identificazione certa).

Il prosieguo dell'attività di ricerca, riguarderà quindi la valutazione dell'innocuità, immunogenicità ed efficacia di *B. melitensis* B115 sugli animali target. Le prove saranno condotte sulla specie ovi-caprina e poi su altre specie da reddito (bovini e suini). A tal fine, è stato avviata una collaborazione con il Centro di Vigilanza Sanitaria Veterinaria (VISAVET) dell'Università di Madrid, che effettuerà le prove di innocuità ed efficacia di B115 su un numero significativo di pecore, anche gravide.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi riguardano:

- messa a punto di test diagnostici potenziati in grado di rilevare con maggiore sensibilità e specificità la risposta anticorpale e cellulo-mediata indotta da ceppi di *Brucella* spp anche a fenotipo rugoso;

- messa a punto di test diagnostici, sierologici e non, che consentano una diagnosi differenziata rispetto alle infezioni causate da germi cross-reagenti con *Brucella* spp;
- messa a punto di presidi immunizzanti innovativi, allestiti con ceppi rugosi, vivi, di *Brucella*, che non interferiscono nei test sierologici previsti dai piani di sorveglianza e caratterizzati da bassa patogenicità, efficacia nei confronti di tutte le specie di *Brucella* e presenza di *marker* genetici che consentono una identificazione certa su base molecolare;
- acquisizione di informazioni sul ruolo epidemiologico svolto dalla specie canina nelle brucellosi dei ruminanti. In particolare, si vuole verificare se il cane esposto ad una infezione brucellare può effettivamente rappresentare un fattore di rischio sia per gli animali dell'allevamento, svolgendo un ruolo di vettore "attivo" dell'infezione, che per l'uomo.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le acquisizioni specifiche che gli studi previsti dal progetto dovrebbero produrre, contribuirebbero significativamente al rafforzamento delle misure di sorveglianza sierologico-epidemiologica previste dai piani di eradicazione delle brucellosi animali.

#### **Controllo e prevenzione del botulismo: creazione di un network nazionale per la raccolta e la disseminazione delle informazioni sulle diverse forme della malattia, sia alimentare che infettiva. Sviluppo e diffusione di metodi diagnostici rapidi e innovativi, definizione di protocolli terapeutici**

Il botulismo è una grave sindrome neuro-paralitica.

La diagnosi viene effettuata su base clinica e confermata in laboratorio. La precoce formulazione del sospetto clinico è essenziale per una rapida diagnosi e un efficace trattamento.

La conferma di laboratorio viene effettuata mediante ricerca di tossine e clostridi neurotossigeni nei campioni biologici e nei residui alimentari.

Pur esistendo presente un sistema nazionale di sorveglianza i casi restano sottostimati, di qui la necessità di creare un network coordinato dal Ministero della Salute, dal Centro Nazionale di Riferimento e dal Centro Anti Veleni (CAV) di Pavia che effettui:

- sviluppo, standardizzazione e validazione di metodiche analitiche;
- formazione del personale coinvolto nella diagnosi clinica e di laboratorio;
- organizzazione di circuiti interlaboratorio e produzione di materiale di riferimento;
- isolamento e sub-tipizzazione dei ceppi e mantenimento di una ceppoteca a valenza nazionale;
- raccolta, elaborazione e diffusione mediante sito web dei dati epidemiologici, clinici e di laboratorio;
- redazione di linee guida per la corretta valutazione e gestione del rischio botulismo sia in preparazioni domestiche che artigianali e industriali;
- definizione di un protocollo terapeutico specifico per le diverse forme della malattia;
- formazione dei medici coinvolti nella diagnosi clinica;
- assistenza alle strutture mediche dell'SSN per la terapia;
- follow-up dei casi confermati.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Diffusione di metodiche analitiche validate mediante circuito interlaboratorio nazionale.

- Raccolta dei ceppi di clostridi produttori di tossine botuliniche circolanti nel territorio nazionale.
- Definizione delle relazioni filogenetiche esistenti tra gli isolati provenienti da tutto il territorio nazionale.
- Creazione di un database a valenza nazionale contenente i profili filogenetici degli ceppi di clostridi produttori di tossine botuliniche.
- Miglioramento della capacità di formulazione del sospetto diagnostico soprattutto nelle fasi iniziali della malattia.
- Diagnosi di casi lievi e subclinici di botulismo infantile.
- Diagnosi dei casi di botulismo da ferita in pazienti tossicodipendenti.
- Diffusione di protocolli terapeutici.
- Definizione dei nuovi fattori di rischio per le varie forme della malattia.
- Studi di follow-up dei pazienti.
- Definizione di linee guida per la corretta preparazione e gestione delle conserve alimentari di produzione casalinga.
- Definizione di linee guida per la corretta gestione del rischio botulismo presso l'industria alimentare e presso le strutture agrituristiche.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- aumento della capacità diagnostica delle forme lievi e subcliniche;
- miglioramento delle tecniche di gestione dei pazienti e conseguente riduzione dei costi di ospedalizzazione dei pazienti affetti da botulismo;
- razionalizzazione dei costi legati all'uso non corretto dell'antidoto;
- miglioramento della capacità di conferma di laboratorio presso le strutture territoriali degli IZS;
- riduzione dei casi di botulismo alimentare correlati ad una non corretta preparazione e gestione delle conserve di produzione casalinga;
- miglioramento della qualità microbiologica delle semi-conserve e delle nuove formulazioni alimentari di produzione industriale destinate al consumo nazionale e all'esportazione.

#### **Convenzione Camera dei Deputati-ISS. Valutazione della qualità igienico-sanitaria degli alimenti e sorveglianza delle tossinfezioni alimentari**

Monitoraggio microbiologiche delle materie prime e dei prodotti finiti mediante prelievo a sondaggio delle merci disponibili destinate alla preparazione e/o somministrazione dei pasti della Camera dei Deputati. Il monitoraggio comporta la valutazione di conformità ai criteri di sicurezza e di igiene di processo definiti in un capitolato tecnico messo a punto da questo Istituto

#### **Risultati attesi nel triennio**

Acquisizione di dati relativi alla esposizione ai contaminanti microbiologici responsabili di tossinfezioni alimentari. Validazione dei piani di controllo in uso nel sistema di ristorazione collettiva, per la prevenzione del rischio di tossinfezioni alimentari.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Implementazione della qualità igienica delle materie prime alimentari e igiene delle tecnologie di trasformazione e manipolazione degli alimenti

**Convenzione con il Ministero della Salute per l'attuazione di programmi in materia di contaminanti inorganici nella dieta e valutazione dell'esposizione nella popolazione italiana**

Un'accurata stima dell'esposizione è un pilastro imprescindibile della valutazione del rischio, che proprio attraverso il confronto fra l'esposizione stimata e le dosi massime ammissibili rende possibile la caratterizzazione del rischio per i consumatori. L'Italia è l'unico fra i principali paesi europei a non prevedere nel proprio sistema di sorveglianza e valutazione del rischio un monitoraggio su base periodica dell'assunzione di elementi in traccia con la dieta da parte della popolazione generale. Questo è tanto più necessario se si tiene conto della grande varietà geoambientale e di stili alimentari che caratterizza il nostro Paese, che richiede una valutazione delle diverse realtà nel contesto di una visione complessiva. Questa convenzione intende avviare un percorso per la realizzazione del primo studio di dieta totale italiano su elementi in traccia e radionuclidi. Opererà a tal fine il network di laboratori con competenze specialistiche costituitosi per la realizzazione del "Programma di monitoraggio per la ricerca di contaminanti chimico-fisici nelle derrate alimentari provenienti dalla Bosnia-Herzegovina e dal Kosovo", sotto la direzione scientifica dell'ISS.

**Risultati attesi nel triennio**

Individuazione dei livelli di presenza di elementi essenziali/tossici (e loro specie) e di radionuclidi nei prodotti alimentari ed elaborazione di stime di assunzione per la popolazione generale, per i bambini, gli anziani e altri gruppi a rischio. Elaborazione di stime di assunzione per la popolazione residente in aree specifiche, ad. es. impattate da contaminazioni puntuali. Individuazione di un *benchmark* rispetto al quale valutare nel tempo trend nei livelli di presenza negli alimenti e nell'assunzione da parte della popolazione. Individuazione di rischi emergenti.

**Trasferibilità dei risultati**

Messa a punto di strumenti per la prevenzione a beneficio della popolazione generale e con ricadute sul sistema sanitario nazionale. Disponibilità di una base conoscitiva (livelli di presenza, esposizione) per la valutazione/gestione del rischio a livello nazionale ma di utilità per *risk assessor* (EFSA) e *risk manager* (CE) a livello UE. Nuove opportunità comunicative con consumatori e produttori aperte dalla disponibilità di tale base conoscitiva. Pianificazione di interventi mirati volti a prevenire il rischio in specifiche aree, categorie della popolazione o filiere produttive.

**Development of guidelines, management systems and new methodologies for GMOs traceability, own-checks procedures and official control in the food and feed supply chain with respect to EU legal requirements**

Studio finanziato dal bando Ricerca finalizzata 2009 e riguardante: i) campionamento sperimentale mediante procedura dinamica e statica; ii) identificazione dei punti critici della procedura di campionamento in termini di praticabilità e sicurezza (es. costi, necessità di attrezzature specifiche, adozione di pratiche e precauzioni per la prevenzione di rischi per la sicurezza degli operatori, praticabilità del carico di lavoro analitico); iii) verifica della possibilità di ottimizzare le procedure di campionamento in termini di praticabilità e sicurezza dell'operatore; iv) valutazione conclusiva della praticabilità della procedura di campionamento; v) stesura di una procedura pratica per il campionamento; vi) identificazione di possibili strategie volte al miglioramento dell'efficienza e dell'efficacia del controllo analitico; vii) sviluppo e/o validazione intralaboratorio di procedure analitiche; viii) prevalidazione di procedure analitiche con un numero limitato di laboratori; ix) piena

validazione di procedure analitiche con la rete italiana dei laboratori per Organismi Geneticamente Modificati (OGM); x) sviluppo di sistemi di accreditamento di laboratorio con campo di accreditamento flessibile da attuarsi nell'ambito del controllo analitico di alimenti e mangimi geneticamente modificati; xi) studio della teoria, e di casi di applicazione pratica eventualmente disponibili, di sistemi di accreditamento a scopo flessibile.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono: i) definizione di una strategia di campionamento basata sul rischio lungo la filiera di produzione-trasformazione anche in relazione alle prevalenze osservate nei Paesi d'origine e alle quantità di prodotto importate annualmente in Italia; ii) sviluppo di procedure analitiche efficaci ed efficienti in termini di numero di specie vegetali analizzate, iii) numero di eventi geneticamente modificati rilevati e quantificati, riduzione di costi e tempi di esecuzione di analisi; iv) linee guida per l'applicazione del campo di accreditamento flessibile; sviluppo di una banca dati per archiviare tutte le informazioni.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il Reparto OGM e xenobiotici di origine fungina dell'SPVSA è membro dello *European Network GMO (Genetically Modified Organism) Laboratories* (ENGL) e fa parte della rete nazionale del controllo ufficiale effettuando analisi di seconda istanza. Gli obiettivi previsti dal progetto costituiscono un adempimento dell'attività prevista da normative specifiche. Inoltre permettono di:

- aggiornare costantemente le competenze in questo settore;
- trasferire al sistema sanitario nazionale gli output derivanti da queste attività.

### **Convenzione tra l'Unione seminativi e l'ISS per l'attuazione del Progetto "Rete qualità seminativi 2010-2013"**

Il progetto si propone: l'acquisizione di informazioni sullo stato di contaminazione dei cereali relativamente alle micotossine: la raccolta dei campioni riguarderà alcuni siti situati nell'ambito del network; la correlazione dei dati ottenuti con quelli derivanti da campionamenti utilizzati per la valutazione di altri parametri qualitativi; l'individuazione delle azioni operative per la certificazione nelle azioni di campionamento dei centri modello (norma ISO 24333).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Acquisizione di database aggiornati per il trasferimento dei dati alle autorità competenti e all'EFSA.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Aggiornamento delle conoscenze sullo stato di contaminazione da micotossine nei cereali a paglia.

### **Effetti di diete ricche in acidi grassi omega-3 e polifenoli sull'attività antiossidante endogena in individui ad elevato rischio di diabete e malattie cardiovascolari**

Le malattie cardiovascolari rappresentano la più importante causa di morbilità e mortalità nei Paesi industrializzati. Tra i fattori di rischio cardiovascolare, vi sono l'obesità e il diabete di tipo 2. Tali patologie sono caratterizzate da alterazione dello stato redox (presenza di lipoproteine a bassa densità, *Low-Density Lipoprotein* – LDL ossidate (oxLDL), diminuite capacità antiossidanti) e aumento di processi infiammatori. Studi epidemiologici dimostrano che la dieta può avere un ruolo fondamentale nel prevenire o correggere diversi fattori di rischio cardiovascolare. Tra i vari componenti della dieta efficaci nell'influenzare in modo

vantaggioso il rischio cardiovascolare vi sono gli acidi grassi omega-3 e i polifenoli, che comprendono una grande varietà di composti presenti in alimenti di origine vegetale. Tali effetti benefici sarebbero da attribuirsi soprattutto alla capacità degli omega-3 di avere un'azione anti-infiammatoria a livello endoteliale, e dei polifenoli, nel combattere lo stress ossidativo. In particolare, i composti fenolici contenuti negli alimenti di origine vegetale, oltre a prevenire il danno ossidativo, possono modulare l'espressione genica e la trasduzione del segnale regolando specifici *pathway* (GPx, GR, GSH/GSSG, Nrf2, CD36, LOX1, TLR2/4). Lo studio si propone di valutare e confrontare gli effetti di diete ricche in acidi grassi omega-3 e/o polifenoli su parametri antiossidanti in pazienti sovrappeso/obesi ad elevato rischio di diabete e malattie cardiovascolari.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio sarà eseguito secondo un disegno sperimentale randomizzato a quattro gruppi paralleli su 80 pazienti: i) dieta di controllo a basso contenuto in acidi grassi omega-3 e polifenoli; ii) dieta ricca in acidi grassi omega-3 e povera in polifenoli; iii) dieta ricca in polifenoli e povera in acidi grassi omega-3; iv) dieta ricca sia in acidi grassi omega-3 sia in polifenoli. Il trattamento durerà otto settimane. La randomizzazione dei pazienti sarà stratificata in base a sesso, età. Oltre alla determinazione di parametri metabolici e infiammatori, saranno valutati l'attività di enzimi coinvolti nell'equilibrio redox (glutazione perossidasi, glutazione reduttasi, superossido dismutasi, catalasi), e i livelli di glutazione (*glutathione*, GSH) e *oxidized glutathione* (GSSG). Queste determinazioni permetteranno di definire se le diete in oggetto possano avere un effetto sulla funzionalità del sistema antiossidante endogeno.

Nei monociti/macrofagi verrà valutata l'espressione di CD36, LOX-1, e *Toll-like receptor* (TLR2/4). Questi studi definiranno l'influenza della dieta sulla capacità di formazione delle *foam cell*, sull'espressione dei recettori scavenger per le oxLDL, e sulla regolazione di *pathway* di segnale coinvolti nel processo infiammatorio associato ad arteriosclerosi. Inoltre sarà definita l'espressione di Nrf2, fattore di trascrizione ubiquitario che regola le difese antiossidanti e antinfiammatorie, la cui attività può essere influenzata da componenti dietetici.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questo studio fa parte di un progetto europeo (*Etherpaths FP7 Collaborative Project*) teso a sviluppare modelli di biologia sistematica che possano facilitare lo studio di interventi dietetici tesi a modulare l'omeostasi lipidica. Lo studio *in vivo* è la caratteristica qualificante del progetto. Infatti, sebbene l'interesse per componenti funzionali degli alimenti va aumentando, difficilmente i dati ottenuti *in vitro* dalla ricerca di base vengono confermati con studi di intervento, che sono i soli a poter fornire indicazioni sulla loro reale efficacia e meccanismo d'azione. Questo studio darà, in particolare, informazioni sui *pathway* di segnale modulati da specifici componenti dietetici, permettendo di identificare nuovi target terapeutici per la prevenzione/cura delle malattie cardiovascolari e delle patologie ad esse associate.

### **Effetto protettivo/terapeutico degli antociani della dieta nei confronti dell'insulino-resistenza e dei disordini metabolici ad essa correlati**

Si stima che il 25% della popolazione occidentale sia affetto da insulino-resistenza (IR), cioè da una diminuita risposta all'insulina da parte di cellule target come gli adipociti. L'IR è uno dei principali fattori di rischio per lo sviluppo di diabete di tipo 2 (T2D) ed è generalmente associata ad obesità e disfunzioni immunitarie. Alterazioni della funzionalità degli adipociti possono provocare un'abnorme secrezione di adipocitochine e citochine infiammatorie e, quindi, alterare l'azione insulinica e la risposta immune. Prevenire/attenuare

l'IR è considerato uno dei principali obiettivi da raggiungere al fine di ridurre il rischio di malattie cronico-degenerative e di preservare la salute della popolazione. È stato recentemente dimostrato che gli antociani (ACN) della dieta diminuiscono la iperglicemia e aumentano la sensibilità all'insulina, ma i meccanismi molecolari con i quali agiscono e la loro effettiva efficacia nell'esercitare questi effetti protettivi non sono ancora chiariti. Questo progetto si propone di definire la capacità e il meccanismo d'azione con il quale il principale metabolita degli ACN, l'acido protocatecuico (PCA), è in grado di prevenire/contrastare le disfunzioni adipocitarie e le alterazioni metaboliche e immunologiche legate a IR, con lo scopo finale di identificare validi target primari per l'attività biologica del PCA.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto sarà strutturato in due WP. Il WP 1 sarà volto a definire gli effetti e il meccanismo d'azione del PCA sulle disfunzioni adipocitarie associate a IR e infiammazione. A questo scopo adipociti umani, isolati da biopsie di grasso viscerale prelevate da soggetti insulinoresistenti, verranno analizzati per la loro capacità di rispondere all'insulina e di attivare vie di segnale coinvolte nel mantenimento dell'omeostasi glicemica, nella risposta all'insulina e nella secrezione di adipocitochine, prima e dopo trattamento con PCA.

I risultati ottenuti dal protocollo sperimentale forniranno informazioni sulla capacità del PCA di modulare disfunzioni metaboliche e vie di segnale cruciali per la regolazione della risposta cellulare all'insulina, e dell' infiammazione.

Il WP 2 investigherà gli effetti del PCA sulla modulazione della risposta macrofagica M1/M2 e il suo potenziale antinfiammatorio nell'attenuare/prevenire l'infiammazione associata a IR. A questo scopo il profilo fenotipico dell'attivazione macrofagica sarà determinato in cellule CD14+ isolate dalle biopsie di tessuto adiposo viscerale di soggetti insulinoresistenti e dal sangue degli stessi pazienti. Esperimenti paralleli saranno condotti per testare gli effetti del PCA sull'attivazione dei macrofagi e lo sviluppo di infiammazione in monociti isolati dal sangue di donatori sani.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La diffusione del T2D ha raggiunto livelli epidemici ed è diventata un'emergenza sanitaria. Più di 150 milioni di persone nel mondo, tre milioni in Italia, sono affette da T2D e questo numero è destinato a salire se non verranno adottate efficaci strategie di prevenzione e contrasto. Alla luce di questi numeri non sorprende che il costo annuale del diabete in Italia si attesti a più di cinque milioni di euro, che rappresenta una cifra proibitiva per il nostro sistema sanitario. A lungo termine questo progetto si propone di generare nuova conoscenza da impiegare nella definizione di nuove, efficaci e mirate strategie nutrizionali per il trattamento e la prevenzione di IR e T2D. Il raggiungimento di questo obiettivo può rappresentare un utile strumento per definire diete appropriate per soggetti diabetici e/o insulinoresistenti. Inoltre, potrà offrire la base scientifica per lo sviluppo di nuovi prodotti alimentari e cibi funzionali, e per la definizione di nuovi interventi terapeutici

### **Evoluzione della virulenza dei ceppi di *Escherichia coli* patogeni: Impatto sulla sanità pubblica**

I ceppi di *E. coli* produttori di verocitotossine (VTEC) rappresentano un serio problema in sanità pubblica, in quanto le infezioni possono provocare malattia grave nell'uomo. Tali patogeni hanno un'origine zoonotica e il serbatoio naturale è rappresentato principalmente dal tratto gastrointestinale dei ruminanti. Gli animali colonizzati eliminano VTEC con le feci contaminando l'ambiente, favorendo la persistenza di questi patogeni negli allevamenti e la possibile contaminazione degli alimenti di origine animale. La trasmissione all'uomo avviene principalmente tramite il consumo di alimenti contaminati, ma anche mediante il

contatto con l'acqua o l'ambiente contaminato da deiezioni bovine, condizione, quest'ultima che può causare la contaminazione dei vegetali utilizzati per il consumo umano.

*E. coli* è una specie ubiquitaria caratterizzata da una elevata plasticità genomica ed è in grado di scambiare facilmente materiale genetico con altre specie batteriche attraverso l'azione di elementi genetici mobili (*Mobile Genetic Elements*, MGE). Questa duttilità nel rimodellamento genomico è alla base dell'esistenza di un numero elevato di gruppi patogeni o patogruppi.

La linea di ricerca proposta mira allo studio dei meccanismi molecolari che hanno favorito l'evoluzione dei diversi patogruppi di *E. coli* e delle basi molecolari dell'emergenza di nuove varianti patogene ad alta virulenza come il ceppo VTEC O104:H4 che ha causato la grave epidemia di sindrome emolitico-uremica in Germania nel maggio 2011.

#### **Risultati attesi nel triennio**

La linea di ricerca si propone di utilizzare le tecnologie per lo studio di genomi interi quali l'ibridazione di vetrini *microarray*, sia DNA-DNA che RNA-DNA, e il sequenziamento di nuova generazione (*whole genome sequencing*) e la successiva analisi bioinformatica dei dati con lo scopo di raggiungere i seguenti obiettivi:

- definizione delle relazioni filogenetiche inter e intra-gruppi;
- identificazione dell'intero corredo degli elementi genetici mobili che veicolano i geni di virulenza nei ceppi di *E. coli* patogeni;
- comprensione dei meccanismi di regolazione della trascrizione dei geni di virulenza anche dal punto di vista della regolazione temporale dell'espressione dei fattori di virulenza;
- identificazione dei siti preferenziali di inserzione di elementi genetici mobili quali batteriofagi e isole di patogenicità.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati del progetto contribuiranno alla conoscenza dei meccanismi alla base della virulenza dei ceppi patogeni di *E. coli* e potranno consentire di identificare le tappe evolutive dell'emergenza dei diversi patogruppi. Le conoscenze derivanti dalla caratterizzazione di questi meccanismi potrebbero consentire di mettere a punto strategie per prevedere e prevenire l'emergenza di nuovi patogruppi di *E. coli* ad alta patogenicità per l'uomo.

## **FILIGRANA**

Studio dei fattori ambientali, nutrizionali e gestionali che nella filiera del Grana Padano impongono l'uso del lisozima, con incremento del rischio di allergie alimentari anche gravi, soprattutto nella popolazione infantile.

Il ruolo dell'ISS è la valutazione del ruolo di elementi in traccia, vitamine e sostanze bioattive nella qualità del latte, con l'uso di approcci rischio-beneficio anche strumentali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Valutazione dei fattori che possono modulare i progetti di caseificazione riducendo l'uso di lisozima e quindi il rischio di allergie infantili.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I modelli sviluppati dovranno essere trasferibili alla filiera del grana padano, in modo da implementare la responsabilità scientifica ed etica dell'impresa nel garantire la sicurezza alimentare, secondo quanto richiesto dalla strategia europea "From farm to fork" e dal pacchetto igiene.

## **Formazione e addestramento del personale delle autorità di controllo in materia di sicurezza alimentare e controllo ufficiale degli alimenti**

Il progetto si pone l'obiettivo di dare continuità ad un percorso di formazione del personale dirigenziale e non delle autorità di controllo nazionale, regionali e locali coinvolte nelle attività di controllo ufficiale così come definite dai regolamenti del pacchetto igiene che governano a livello comunitario le attività di verifica dei requisiti di sicurezza e conformità degli alimenti, mangimi, salute e benessere animale.

La formazione continua avverrà attraverso eventi formativi di carattere teorico pratico con particolare attenzione ai nuovi strumenti (audit) introdotti dalla normativa comunitaria, all'acquisizione delle conoscenze necessarie di carattere tecnico-scientifico per valutare l'adeguatezza dei sistemi di autocontrollo predisposti dagli operatori del settore alimentare.

### **Risultati attesi nel triennio**

Implementazione dei sistemi di gestione a livello delle autorità di controllo mediante la predisposizione delle necessarie procedure documentate; raggiungimento di un adeguato livello di formazione del personale nell'ambito dell'utilizzo dei diversi strumenti previsti per il controllo ufficiale degli alimenti.

### **Trasferibilità dei risultati**

Trasferimento delle conoscenze e degli opportuni strumenti tecnici agli operatori dell'SSN.

Supporto tecnico-scientifico all'autorità competente nazionale, regionale e locale.

## **FP7 collaborative project Total Diet Study Exposure – Grant agreement n. 289108**

Gli studi di dieta totale (*Total Diet Study*, TDS) consentono di valutare la reale esposizione del consumatore agli agenti chimici negli alimenti, dai contaminanti, ai residui, agli additivi alimentari. Essi stimano l'esposizione attraverso la dieta nella sua globalità in modo realistico, in quanto basato sugli alimenti pronti per il consumo e non sui prodotti agroalimentari non trasformati. I TDS sono quindi elementi essenziali per la valutazione del rischio e la prevenzione. Alcuni Stati membri e Paesi candidati all'ingresso nell'UE non hanno programmi finalizzati alla realizzazione di TDS, altri li hanno ma non è possibile valutare la comparabilità dei dati raccolti. È necessario armonizzare i metodi per la valutazione dell'esposizione agli agenti chimici negli alimenti a livello europeo e con le altre regioni su scala mondiale, e questo è un obiettivo condiviso da EFSA, WHO e *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO). Il progetto ha lo scopo di individuare metodi armonizzati a livello europeo per il campionamento, le procedure analitiche, il *modelling* per la valutazione dell'esposizione, la prioritizzazione delle tipologie alimentari e degli agenti chimici da indagare.

A livello ISS, il progetto è co-coordinato dal Dipartimento AMPP.

### **Risultati attesi nel triennio**

Definizione della *best practice* a livello europeo per la conduzione dei TDS. Definizione degli agenti chimici e delle categorie alimentari di maggiore rilievo per la stima dell'esposizione. Armonizzazione degli approcci per garantire l'ottenimento di dati confrontabili. Creazione di un database di fondamentale importanza per i *risk assessor* e *risk manager*.

### **Trasferibilità dei risultati**

Messa a punto di strumenti per la prevenzione a beneficio della popolazione generale e con ricadute sul sistema sanitario nazionale. A livello nazionale, si veda anche il successivo

progetto TDS italiano (convenzione Ministero della Salute). Organismi che in sede nazionale ed europea hanno compiti di valutazione del rischio (EFSA), organismi internazionali quali WHO e FAO, e gli stakeholder beneficeranno dei risultati del progetto TDS EXPOSURE. I Paesi privi di programmi TDS vedranno implementati tali programmi.

### **Il Laboratorio Comunitario e Nazionale di Riferimento per *Escherichia coli* produttore di verocitotossina (VTEC) presso l'ISS: sviluppo di metodi analitici e sorveglianza epidemiologica**

Le infezioni da VTEC costituiscono un grave problema di sanità pubblica e sono incluse dalla UE nella lista ad elevata priorità delle zoonosi da sorvegliare e controllare (Direttiva 2003/99 EC). Il grave episodio epidemico di infezione da VTEC O104:H4 che ha colpito la Germania e altri Paesi europei nel corso dell'estate 2011 ha confermato l'importanza di questi patogeni alimentari e ha sollevato nuove problematiche riguardo la sicurezza dei alcuni alimenti di origine vegetale.

Nel 2006, il Dipartimento è stato designato dal Ministero della Salute quale LNR per le infezioni da *E. coli* e dalla CE quale EU Reference Laboratory (EU-RL) for *E. coli*, including *Verotoxigenic E. coli* (VTEC). Le attività dei Laboratori di Riferimento continueranno nel triennio 2012-14 e includeranno:

- il coordinamento delle attività degli LNR degli Stati membri della UE e, a livello nazionale, dei laboratori responsabili del controllo ufficiale degli alimenti (IZS);
- l'organizzazione di test analitici comparativi tra questi laboratori;
- il supporto tecnico-scientifico alla CE e al Ministero della Salute.

Il laboratorio svolgerà inoltre il ruolo di Laboratorio di Riferimento per le infezioni umane da VTEC nell'ambito del sistema di sorveglianza ENTER-NET Italia, effettuando la tipizzazione di stiptipi di *E. coli* e indagini diagnostiche su pazienti con infezione da VTEC, in particolare casi di sindrome emolitico uremica.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il coordinamento delle attività degli LNR degli Stati membri della UE e i test analitici comparativi tra questi laboratori consentiranno di realizzare una rete europea di laboratori in grado di effettuare controlli ufficiali con metodi efficaci e standardizzati. I laboratori potranno inoltre garantire alle proprie autorità nazionali il supporto tecnico per le attività di monitoraggio e sorveglianza sviluppate dall'EFSA.

Simili risultati potranno essere ottenuti anche a livello nazionale, migliorando la capacità dei laboratori degli IZS di identificare correttamente un ceppo di *E. coli* come un VTEC, in particolare per i sierogruppi VTEC considerati più pericolosi per l'uomo.

Le attività condotte sulle infezioni umane da VTEC nell'ambito del sistema di sorveglianza ENTER-NET Italia, consentiranno all'Italia di partecipare alle attività di sorveglianza previste dall'ECDC per le infezioni da VTEC.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Sia a livello comunitario che nazionale si otterrà il miglioramento delle capacità degli LNR degli Stati membri UE e dei laboratori degli IZS di identificare correttamente un ceppo di *E. coli* come un VTEC, in particolare per i sierogruppi VTEC considerati più pericolosi per l'uomo, garantendo controlli analitici più efficaci e standardizzati.

### **Impatto dell'arsenico inorganico sulle catene alimentari e sulla salute umana**

L'arsenico è presente in natura sotto forma di varie specie chimiche che hanno tossicità molto diverse: quella importante in termini di valutazione del rischio è l'arsenico inorganico

(i-As). L'esposizione all'i-As avviene di norma attraverso gli alimenti (>90%). In particolari aree caratterizzate da abbondanza di arsenico, le acque sotterranee rappresentano un'ulteriore fonte di esposizione alimentare. L'uso delle acque sotterranee a scopo irriguo e la naturale abbondanza di arsenico in alcuni suoli agricoli può ulteriormente aumentare in queste aree l'ingresso di i-As nella catena alimentare. Indipendentemente dall'esistenza di aree con abbondanza geochimica di arsenico, esistono filiere particolarmente vulnerabili sotto il profilo della contaminazione da i-As fra le quali la più importante è quella del riso, di cui l'Italia è il primo produttore europeo.

L'attività in questo ambito si esplica attraverso una serie di studi in collaborazione con enti di ricerca, università, ASL e col mondo della produzione alimentare. Tale attività copre una varietà di filoni, fra i quali: i) studio del trasferimento suolo-pianta e delle variabili che lo controllano; ii) valutazione dell'effetto delle trasformazioni a livello produzione industriale/domestico; iii) studio dell'esposizione (diete duplicate, biomarcatori di esposizione); iv) studio dell'efficienza del metabolismo dell'i-As in gruppi di popolazione esposta.

### **Risultati attesi nel triennio**

Conoscenze sui fattori che regolano la presenza dell'arsenico inorganico ad ogni livello della catena alimentare e sul suo trasferimento lungo le filiere. Stima dell'esposizione e dell'efficienza del metabolismo in popolazioni esposte e relativa caratterizzazione del rischio. Contributo specifico all'attività di valutazione del rischio dell'EFSA su questo contaminante. Sviluppo di strumenti utili ai fini della prevenzione e della gestione del rischio, con particolare riferimento ai gruppi a rischio quali i neonati che si alimentano con prodotti a base di riso e i celiaci che prediligono il riso quale cereale di sostituzione.

### **Trasferibilità dei risultati**

L'identificazione dei meccanismi di trasferimento in aree con abbondanza geochimica dell'elemento consente di mettere a punto misure per la protezione degli animali da reddito e dell'uomo. La comprensione dei fattori che modulano l'*uptake* da parte di vegetali quali il riso consente la selezione delle variabili (agronomiche, varietali, ecc.) che consentono di limitare l'accumulo nella parte edibile. Lo studio dell'esposizione e del metabolismo è premessa necessaria per l'adozione di adeguate misure di prevenzione. Per la gestione del rischio a livello europeo, in vista della fissazione di limiti massimi per l'arsenico inorganico nei prodotti alimentari, sussiste un'attività finanziata a supporto del laboratorio di riferimento europeo presso il JRC di Geel su approcci e metodologie per l'analisi di speciazione dell'arsenico nei prodotti alimentari.

## **Impiego della tecnologia *Radio Frequency Identification* (RFId) come strumento di supporto alla sicurezza**

All'interno di una struttura sanitaria risulta particolarmente critica la gestione dei dati relativi ai medicinali da somministrare, agli esami da eseguire, ai risultati delle analisi, alle diagnosi e al quadro clinico del paziente, dal ricovero nella struttura sino alla sua dimissione. Altrettanto importante è la gestione degli *asset*, in particolare il loro posizionamento all'interno della struttura e il loro stato di manutenzione/utilizzabilità, e la gestione del materiale biologico potenzialmente pericoloso.

Dal punto di vista clinico si evidenziano i seguenti problemi, dovuti alla perdita di rintracciabilità, che possono mettere a rischio la salute di pazienti, operatori e frequentatori della struttura sanitaria:

- rischio di scambio di identità, di formulare diagnosi errate o di applicare terapie non adeguate.

- rischio di utilizzo inappropriato di dispositivi medici o apparati potenzialmente pericolosi.
- rischio dovuto alla circolazione non controllata di materiale biologico potenzialmente pericoloso.

Scopo del progetto è quello di valutare la qualità e l'efficacia di quelle sperimentazioni, in atto sul territorio nazionale, che utilizzano la tecnologia RFID per risolvere i problemi sopra evidenziati. Lo studio potrà fornire utili indicazioni al progetto, con ricadute dirette sulla sicurezza di pazienti e operatori all'interno dei presidi.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Definizione dello stato dell'arte della tecnologia mediante l'analisi della letteratura scientifica.
- Stima del livello di diffusione della tecnologia e delle relative applicazioni cliniche su tutto il territorio nazionale.
- Definizione e applicazione sul campo, mediante l'utilizzo di strumenti quali: questionari, interviste telefoniche, meeting *ad hoc*, audit, di specifiche procedure di valutazione che dovranno tenere conto degli aspetti critici di seguito riportati:
  - rischio associato all'utilizzo dei dispositivi RFID, per i pazienti, il personale ospedaliero e i familiari;
  - rispetto degli obblighi di legge in materia di tutela dei dati personali;
  - classificazione e quantificazione dei benefici che la tecnologia RFID si prefigge di perseguire; i benefici saranno classificati in due macrocategorie: i benefici tangibili, misurabili e riconducibili a vantaggi per il paziente o a una riduzione di costo per l'SSN, e i benefici intangibili, non misurabili e riconducibili al livello di qualità percepita dall'utente finale.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Redazione e pubblicazione di apposite linee guida per la gestione delle tecnologie RFID in ambito ospedaliero, con particolare riferimento alla tutela della salute del paziente, dell'operatore e di altri soggetti che frequentano l'ambiente sanitario.

Diffusione dei risultati mediante l'organizzazione di meeting e workshop sul tema dell'impatto della tecnologia RFID in ambiente sanitario.

### **Infiammazione associata all'obesità e cancro del colon: ruolo degli acidi grassi e dei polifenoli contenuti nella dieta**

Il rischio di sviluppare il cancro del colon (CC) è più elevato in soggetti obesi (1,5-3,5 volte). Il tessuto adiposo bianco (*White Adipose Tissue*, WAT) rilascia adipocitochine che influenzano il tessuto adiposo stesso e target periferici, regolandone attività metaboliche e funzionali. Disfunzioni del WAT inducono uno stato infiammatorio cronico che potrebbe avere un ruolo chiave nello sviluppo del CC. Le cause della disfunzione adipocitaria e gli eventi molecolari che legano obesità, infiammazione e CC non sono ancora chiari. Alcuni alimenti contenuti nella dieta possono modulare i processi infiammatori, influenzando il rischio di sviluppare CC. Fra questi alimenti ci sono gli acidi grassi (*Fatty Acid*, FA), componenti chiave del WAT, a causa del loro stato di precursori di mediatori lipidici. La risposta indotta dai FA dipende dal loro grado di saturazione e dal numero e/o posizione dei doppi legami: ad esempio l'acido palmitico e l'acido docosaesanoico agiscono, rispettivamente, da pro- e anti-infiammatorio. Inoltre, polifenoli contenuti negli alimenti hanno la capacità di modulare l'espressione genica e l'attivazione/inibizione di specifici

*pathway* infiammatori, esercitando effetti preventivi sull'insorgenza di malattie associate ad obesità.

Il progetto si propone di identificare i meccanismi molecolari con i quali alcuni alimenti alterano la funzionalità adipocitaria, modulando l'infiammazione associata ad obesità e il conseguente rischio di sviluppare CC.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio verrà condotto su adipociti umani primari, isolati da biopsie di grasso viscerale provenienti da soggetti normopeso (BMI 22-24,9 kg/m<sup>2</sup>) o obesi (BMI 30-35 kg/m<sup>2</sup>), sottoposti a chirurgia addominale per condizioni benigne o CC. Il progetto sarà articolato in tre fasi strettamente interconnesse. Nella fase 1 verranno identificate le disfunzioni adipocitarie responsabili della comparsa/mantenimento dei processi infiammatori caratteristici dello stato obeso e che possono essere connessi alla comparsa di CC. Nella fase 2 verrà definito il ruolo di acidi grassi a diverso grado di saturazione nella modulazione di funzioni adipocitarie connesse allo sviluppo di infiammazione. Infine, nella fase 3 verrà saggiata la capacità protettiva di specifici polifenoli contenuti nella dieta nei confronti delle alterazioni adipocitarie responsabili della promozione di processi infiammatori carcinogenici.

Obiettivo del progetto è l'identificazione di: i) eventi molecolari con i quali FA a diverso grado di saturazione alterano la funzionalità degli adipociti; ii) eventuali effetti protettivi di specifici polifenoli contenuti nella dieta sulla carcinogenesi indotta da infiammazione associata all'obesità, e i relativi meccanismi d'azione. Il progetto contribuirà alla comprensione della patogenesi del CC associato ad obesità viscerale, offrendo il supporto necessario per lo sviluppo di nuove strategie di prevenzione.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'obesità rappresenta uno dei più grossi problemi di sanità pubblica, a causa del continuo e costante incremento della sua prevalenza, che in Europa ha raggiunto il 14%, e della sua associazione con gravi patologie croniche. In Italia le persone obese, o in sovrappeso, rappresentano oramai il 43% della popolazione. Dopo il fumo, l'obesità costituisce il secondo fattore di rischio tumorale prevenibile. Nei soli Stati Uniti, si è calcolato che 90.000 morti per cancro all'anno siano correlati all'obesità. A lungo termine, i risultati ottenuti da questo progetto avranno conseguenze importanti per lo sviluppo di nuove e più efficaci strategie nutrizionali, volte alla riduzione dell'incidenza di carcinoma del colon associato all'obesità, permettendo di traslare la ricerca di base in nuove prospettive cliniche e terapeutiche.

### **Infiammazione e angiogenesi condividono gli stessi meccanismi molecolari in obesità e cancro dell'endometrio?**

L'obesità è caratterizzata da un eccessivo accumulo di tessuto adiposo (TA) che si associa ad un elevato rischio di sviluppare non solo T2D e CVD ma anche alcuni tipi di cancro incluso il cancro dell'endometrio. L'espansione del TA si associa ad uno stato di infiammazione cronica caratterizzato da una alterata produzione di citochine/chemochine, dalla formazione di nuovi vasi sanguigni (neoangiogenesi) e da rimodellamento della matrice extracellulare; tutte manifestazioni che sembrano essere coinvolte sia nell'obesità che nella crescita neoplastica. In modo specifico, l'elevata espressione di fattori quali leptina, VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e la diminuita espressione di adiponectina sono state osservate in donne obese e/o con cancro dell'endometrio. Al processo di espansione cellulare partecipano le metalloproteinasi (MMP) della matrice, dati recenti evidenziano che le MMP-2 e -9 sono espresse dal TA umano e fortemente indotte nel cancro dell'endometrio. Adiponectina e

leptina sembrano avere effetti importanti nella omeostasi tessutale: la adiponectina ha attività antiinfiammatoria, antiproliferativa e controversa attività pro/antiangiogenica, la leptina induce crescita cellulare con proprietà angiogeniche. L'obiettivo di questo lavoro è quello di comprendere meglio i meccanismi molecolari che regolano la crescita e il rimodellamento del tessuto adiposo in condizione di obesità associata o meno a neoplasia dell'endometrio.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Per il raggiungimento di questo obiettivo si valuteranno gli effetti del trattamento con adiponectina e leptina, sul TA viscerale ottenuto da biopsie di donne obese in postmenopausa affette o no da cancro dell'endometrio, analizzando l'espressione di adipocitochine e la modulazione di vie di segnale che possono essere specificatamente coinvolte nella regolazione della proliferazione e dell'angiogenesi. A tale proposito sarà valutata nel TA in toto, prima e dopo trattamento, la espressione e la secrezione di adiponectina, leptina, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, VEGF, MMP-2 e -9. Successivamente saranno definiti i *pathway* di segnale coinvolti, come ERK-1/2, NF- $\kappa$ B, MAPKp38, JNK/STAT, attraverso la determinazione delle forme attive fosforilate e l'utilizzo di inibitori biochimici selettivi per valutare il coinvolgimento di specifici step molecolari

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'obesità è diventato un problema mondiale ed è generalmente accettato che l'eccessivo accumulo di TA predispone fortemente al rischio di sviluppare neoplasie. La donna in postmenopausa accumula preferenzialmente TA viscerale, la cui disregolazione funzionale aumenta il rischio di sviluppare cancro dell'endometrio. Adiponectina e leptina sono adipocitochine che negli ultimi anni sono "sotto osservazione" in quanto fortemente coinvolte in obesità e cancro dell'endometrio. Comprendere i meccanismi molecolari mediante i quali questi fattori possono modulare infiammazione e angiogenesi potrà essere di aiuto per individuare nuovi target così da sviluppare strategie mirate a combattere queste due condizioni patologiche.

### **Integratori alimentari a base di mirtillo (*Vaccinium sp*): valutazione quali/quantitativa dei principi attivi**

Negli ultimi anni l'interesse per le piante con effetti benefici sull'organismo umano è andato via via crescendo come si nota dal numero di preparati a base di erbe che vengono immessi continuamente sul mercato. Tra gli ingredienti di origine vegetale più comunemente presenti negli integratori alimentari, meritano un posto di rilievo il mirtillo (*Vaccinium sp*) e i suoi estratti. Sul mercato sono presenti sia integratori a base di Mirtillo nero (*Vaccinium myrtillus*) rivendicati principalmente per i loro effetti benefici sulla vista e sugli arti inferiori, sia integratori a base di Mirtillo rosso (*Vaccinium macrocarpon*) consigliati per prevenire o trattare le infezioni delle vie urinarie. Le specie del *Vaccinium* si caratterizzano per l'alto contenuto di antocianine (glicosidi dalle spiccate virtù antiossidanti) coinvolte in un'ampia serie di attività biologiche aventi un effetto benefico sulla salute. Le antocianine possono infatti ridurre il rischio di malattie cardiache, inibire l'aggregazione piastrinica e proteggere le cellule endoteliali delle arterie. Inoltre il *Vaccinium myrtillus* possiede considerevoli effetti antimicrobici verso la Salmonella e lo Staphylococcus. In natura esistono più di 250 antocianine la cui attività dipende dal tipo di aglicone. L'aumentato interesse verso questa tipologia di prodotti richiede efficienti misure di controllo della qualità sia per assicurarne l'autenticità e il reale contenuto di antocianine, sia per verificare il *claim* in etichetta.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I metodi attualmente disponibili, per la determinazione delle antocianine, sono quelli utilizzati dalle industrie che consentono di quantificare il contenuto totale di antocianine; tali

metodi però risultano difficili da applicare alle complesse miscele come quelle presenti nei supplementi. A tale scopo è necessario approntare un accurato *fingerprint* che permetta l'identificazione della fonte delle antocianine e la valutazione qualitativa del profilo in antocianine e pro antocianine.

L'identificazione di una metodica analitica idonea a separare, mediante HPLC, i diversi componenti del pool delle antocianine, rappresenta il primo stadio dello svolgimento dello studio che applicato a tutti i prodotti commerciali selezionati, permetterà di:

- quantificare il contenuto di antocianine totali e verificare il titolo riportato in etichetta,
- identificare un *fingerprint* caratteristico che permetta di verificare la fonte delle antocianine;
- esprimere un giudizio qualitativo del profilo antocianinico e valutare il *claim* del prodotto;
- comparare i prodotti aventi lo stesso *claim*.

Verranno reperiti sul mercato un numero rappresentativo di prodotti commerciali a base sia di mirtillo nero che rosso da soli o in miscela con altri componenti di origine vegetale.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti permetteranno una maggior chiarezza nell'ambito di un settore caratterizzato da una forte disomogeneità di composizione degli ingredienti vegetali dal punto di vista quali/ quantitativo.

Pertanto da un lato verrà cautelata la sicurezza del consumatore, che è sempre più attento e consapevole al mantenimento di un buon stato di salute, e dall'altro i dati ottenuti potranno essere condivisi da tutti i soggetti coinvolti nella produzione e valutazione degli integratori alimentari.

### **Integratori alimentari a base di piante: livelli di assunzione, valutazione del rischio e del beneficio (PlantLIBRA)**

Nell'UE l'utilizzo di integratori alimentari a base di piante e/o estratti vegetali, i cui ingredienti sono spesso originari di Paesi terzi, è in continuo aumento. Le conoscenze sulla sicurezza d'uso e sugli effetti benefici di questi prodotti sono molto modeste e spesso le autorità competenti, gli operatori del settore e i consumatori si trovano in difficoltà nel prendere decisioni corrette. Scopo di questo progetto europeo è quello di promuovere un utilizzo sicuro degli integratori alimentari a base di piante e/o estratti vegetali mediante dati, informazioni e strumenti derivanti da un consorzio internazionale e multidisciplinare di esperti di *science of botanical*. In quest'ambito l'ISS è responsabile di un WP che provvederà a supportare con dati sperimentali un meta-database di composti biologicamente attivi identificandoli caratterizzandoli e studiandone l'attività fisiologica. Sarà data priorità a quelle piante poco documentate in letteratura, maggiormente responsabili di reazioni avverse e più comunemente presenti negli integratori alimentari. Inoltre si intende creare un network di laboratori che possono mettere a punto metodiche analitiche, sviluppare nuovi metodi quando mancanti per carenza di dati o per l'impiego di nuove piante.

#### **Risultati attesi nel triennio**

La parte sperimentale riguarderà:

- metodiche per la sicura identificazione del materiale a base di piante;
- determinazione dei costituenti che svolgono un'azione benefica sull'organismo umano;
- determinazione dei costituenti che svolgono un'azione avversa per la salute;
- contaminazione ambientale e da pratica agricola in funzione dei Paesi di origine delle materie prime;

- identificazione dei metodi disponibili per la determinazione dei *marker* biologici.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le informazioni ricavate potranno essere condivise con tutti i soggetti coinvolti nella produzione, valutazione e utilizzo degli integratori alimentari. I dati disponibili saranno relativi a:

- analisi di nuove sostanze;
- metodi validati su costituenti vegetali;
- network di laboratori in grado di determinare costituenti benefici, tossici e contaminanti;
- metodi a supporto della unità di emergenze per le reazioni avverse.

#### **Interferenti endocrini**

Identificazione di sostanze con attività endocrina meritevoli di specifica attenzione nell'ambito del programma REACH per la capacità di creare *equivalent concern*.

Sviluppo di criteri per identificare sostanze prioritarie, con l'uso di meta-analisi e QSAR (in collaborazione con l'Istituto Mario Negri di Milano).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Contributo italiano all'implementazione del programma REACH attraverso la preparazione di documentazioni sugli effetti endocrini di sostanze che presentano *equivalent concern*.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Lo sviluppo di criteri per identificare sostanze prioritarie, con l'uso di meta-analisi e QSAR, sarà trasferibile anche ad altri interferenti endocrini, nonché ad altre sostanze di interesse per il REACH (es. nanomateriali).

#### **L'acido eicosapentaenoico nella prevenzione e/o nella terapie di patologie immuno-mediate**

Nostri precedenti studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che gli acidi grassi polinsaturi della serie n-3, in particolare l'acido eicosapentaenoico (EPA), sono in grado di stimolare il processo di mielinogenesi. Recentemente, in un modello sperimentale di SM, l'encefalite allergica in Dark-Agouti, abbiamo dimostrato che l'EPA è in grado di modificare positivamente il decorso clinico della malattia. Infatti, nei ratti Dark-Agouti trattati con diete supplementate con EPA, si osservava un più basso score clinico che era accompagnato da una maggiore presenza di mielina e da una up-regulation del FoxP3+ nel cervello.

Al fine di individuare i meccanismi coinvolti nella risposta immune e indotti dall'EPA saranno eseguiti studi *in vitro* e *in vivo*. L'efficacia dell'EPA sarà valutata anche su diversi ceppi di ratti (es. Lewis). Successivamente, completata la fase preclinica si eseguirà uno studio caso-controllo su pazienti affetti da SM. I pazienti arruolati saranno trattati con ethyl-EPA per un anno e analisi biochimiche e strutturali saranno eseguite a determinati intervalli di tempo. L'efficacia del trattamento sarà valutato determinando i parametri di disabilità (*Expanded Disability Status Scale*, EDSS), il numero delle ricadute, il numero delle placche di demielinizzazione e la popolazione linfocitaria nel sangue.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Individuazione di nutrienti in grado di prevenire e/o modulare patologie demielinizzanti immuno-mediate.
- Identificazione dei mediatori cellulari e/o nucleari, attivati dall'EPA, e coinvolti nella risposta immune.

- Identificazione in uno studio clinico di una nuova terapia per il trattamento della SM.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- indicazione sull'introduzione con la dieta dell'acido eicosapentaenoico per prevenire e/o modulare patologie immuno-mediate;
- indicazione su come migliorare la nostra dieta;
- potenziali e alternativi interventi terapeutici per il trattamento della SM;
- i risultati finali saranno compendati in pubblicazioni internazionali e trasferiti all'SSN.

### **L'acido protocatecuico: meccanismi molecolari regolatori coinvolti nella prevenzione del danno aterosclerotico**

L'aterosclerosi è un processo infiammatorio della parete vasale legato all'accumulo di lipidi all'interno delle cellule che la costituiscono. Insorgenza e progressione del processo aterosclerotico sono essenzialmente dovute all'effetto citotossico delle lipoproteine a bassa densità ossidate (oxLDL) nella parete e internalizzate dai macrofagi. Durante la progressione della lesione vasale si susseguono fasi di iperproliferazione e aumento di morte cellulare. Nelle fasi avanzate, caratterizzate da espansione e instabilità della placca aterosclerotica ed eventi atero-trombotici, più del 50% delle cellule apoptotiche è costituita da macrofagi.

La protezione del danno vasale da parte dei polifenoli è mediata dalla modulazione dell'attività di recettori, enzimi, fattori di trascrizione e vie di segnale intracellulare attraverso meccanismi anche indipendenti dall'attività antiossidante. Tra i polifenoli della dieta l'acido protocatecuico (PCA) ha una notevole valenza nutrizionale perché, pur essendo presente in vegetali e frutta in basse concentrazioni, rappresenta il principale metabolita di antociani e procianidine, polifenoli assunti con la dieta in grande quantità.

Lo studio si propone di individuare i meccanismi responsabili dell'effetto protettivo del PCA nei confronti dell'apoptosi indotta da oxLDL in macrofagi, considerando i diversi segnali e *pathway* cellulari coinvolti nel controllo della fase di esecuzione dell'apoptosi.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio verrà effettuato sia su cellule macrofagiche murine (linea cellulare J774 A.1) che su cellule macrofagiche primarie umane derivanti da monociti del sangue. Il progetto contribuirà ad ottenere una migliore comprensione della risposta cellulare all'azione delle oxLDL in presenza del PCA, individuando i meccanismi molecolari responsabili dell'inibizione dello stress ossidativo e dell'induzione di apoptosi con particolare attenzione alle principali chinasi e fattori di trascrizione coinvolti nel controllo dell'espressione genica di proteine ed enzimi. In particolare si approfondirà il ruolo e le interconnessioni tra il sistema di difesa antiossidante (Nrf2/ARE) responsabile dell'induzione di enzimi di fase II, le vie di attivazione della risposta proliferativa PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B e quelle responsabili dell'induzione del processo apoptotico (p38MAPK/PKC $\delta$ /p53/p66Shc). Ciò permetterà di individuare i meccanismi d'azione specifici con i quali il PCA e in generale i composti polifenolici possono contrastare l'induzione di apoptosi e la conseguente evoluzione degenerativa della placca ateromatosa.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'individuazione di meccanismi molecolari specifici e del ruolo svolto da singoli fattori regolatori permetteranno di individuare nuovi possibili target verso cui indirizzare l'attenzione di ulteriori studi (*in vivo*) e di intervento (clinici). Lo studio permetterà di correlare gli effetti di uno dei più importanti tra i composti polifenolici (sia per la presenza negli alimenti che come principale metabolita di altri), sull'attivazione/inibizione di specifici

fattori intracellulari coinvolti nel danno apoptotico indotto dalle oxLDL. Si offrirà in tal modo un supporto conoscitivo utile alla definizione di strategie di prevenzione del processo degenerativo della parete vasale attraverso interventi dietetici mirati, nonché di interventi sperimentali terapeutici necessariamente basati sull'uso di specifiche molecole funzionali.

### **L'efficacia delle associazioni di probiotici per il potenziamento dello stato di salute**

I probiotici utilizzati come principali costituenti di alcuni integratori alimentari, sono in grado di apportare effetti benefici nell'organismo ospite, soprattutto per il loro antagonismo verso lo sviluppo di patogeni alimentari. Risultano quindi potenzialmente utili in quelle condizioni che comportano uno squilibrio della microflora intestinale residente: quest'ultima ha funzioni di protezione verso le infezioni del tratto digerente ed è molto stabile, ciò nonostante può essere modificata da alcuni fattori alimentari e ambientali.

Benché studi condotti su specie isolate di probiotici abbiano consentito di valutare in modo soddisfacente la loro utilità, non risultano invece al momento disponibili sufficienti indagini sulle diverse associazioni, che dimostrino un effettivo maggiore beneficio per l'organismo umano, in seguito alla loro assunzione, rispetto all'impiego delle singole specie.

Lo scopo del progetto è quello di valutare l'efficacia di associazioni di diversi probiotici rispetto a quella dei singoli microrganismi.

#### **Risultati attesi nel triennio**

La ricerca, che prende in esame alcuni probiotici destinati ad essere utilizzati in associazione in particolari integratori alimentari, dovrà giungere alla caratterizzazione degli stipiti in base alle caratteristiche geniche rilevabili con analisi molecolari.

Ciò permetterà di differenziare meglio i vari stipiti all'interno di una stessa specie, consentendo di operare opportune scelte per il loro impiego negli integratori.

Lo studio verterà poi in particolare sulle associazioni dei ceppi selezionati, allo scopo di valutarne le sinergie e gli antagonismi, osservando le interazioni tra specie diverse, anche in presenza di microrganismi patogeni, la cui vitalità e attività tossica verrà allo stesso tempo monitorata. Ciò potrà essere realizzato anche con un modello sperimentale *in vivo* e permetterà di valutare se le associazioni abbiano, rispetto alle specie singole, una maggiore capacità di produrre sostanze utili o di neutralizzare sostanze tossiche e di prevenire lo sviluppo di microrganismi indesiderati.

Farà parte dello studio anche la valutazione dei livelli minimi di probiotici, singolarmente o in associazione, atti a produrre mutamenti ritenuti significativi per la manifestazione di alcune proprietà salutistiche.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Gli operatori sanitari potranno disporre di nuovi strumenti analitici, messi a punto nel progetto, al fine di operare più accurate valutazioni della qualità finale degli integratori, con particolare riferimento alle proprietà salutistiche dichiarate. Le metodiche proposte potranno anche consentire una più precisa valutazione della conformità dei prodotti. Inoltre, gli stessi operatori potranno disporre di maggiori informazioni per indirizzare i consumatori nell'impiego più opportuno delle diverse associazioni di probiotici.

Infine, l'autorità sanitaria responsabile preposta alla verifica dei piani di autocontrollo, potrà valutare e verificare l'adozione dei nuovi strumenti nell'ambito delle attività aziendali, per poter meglio predisporre le prescrizioni tecniche necessarie.

## **La valutazione del rischio di salute: aspetti metodologici e studi applicativi**

Le malattie infettive continuano a rappresentare un rischio per la salute pubblica, anche a causa del continuo emergere di nuovi microrganismi e del ripresentarsi, con caratteristiche epidemiologiche inedite, di malattie note. Molte delle malattie infettive emergenti o riemergenti hanno negli animali serbatoi e strumenti di diffusione importanti (zoonosi), e una parte rilevante di malattie infettive ha modalità di diffusione all'uomo attraverso gli alimenti.

La sicurezza delle produzioni alimentari, oltre ad aspetti microbiologici è definita anche da aspetti legati alla presenza di sostanze chimiche, sia in qualità di contaminanti sia volontariamente introdotte ma per le quali devono essere rispettati precisi quantitativi.

In generale, il punto che accomuna rischi per la salute pubblica è l'approccio metodologico alla stima degli stessi.

Nel triennio 2012-2014 l'attività principale verterà sullo sviluppo di approcci metodologici alla valutazione del rischio nei settori delle malattie infettive e della sicurezza alimentare con particolare attenzione alle malattie emergenti e ai composti chimici negli alimenti.

In particolare si considereranno modelli di studio quali malattie da vettore per la rilevanza dell'interazione uomo-animale-vettore-ambiente e alcune categorie di composti chimici (additivi).

### **Risultati attesi nel triennio**

Le attività che saranno svolte nel corso del triennio avranno sia risultati specifici mirati alla valutazione di rischi definiti nei modelli di studio, sia risultati generali relativi allo sviluppo di approcci metodologici per la valutazione del rischio.

Inoltre, quale risultato rilevante, nel corso dello sviluppo dei casi studio si valuteranno la qualità, disponibilità e congruità dei dati a disposizione del sistema sanitario nazionale per la valutazione del rischio, fornendo indicazioni di miglioramento e di fonti alternative per gli stessi. Aspetto rilevante è inoltre l'integrazione tra aspetti di salute e ambiente in relazione alla valutazione del rischio.

### **Trasferibilità dei risultati**

Le attività svolte nel corso del triennio forniranno una serie di indicazioni per il miglioramento del sistema sanitario nel settore della sicurezza alimentare e delle zoonosi. L'approccio metodologico sviluppato fornirà inoltre possibili utilizzi in altri ambiti. La promozione della metodologia della valutazione del rischio e l'identificazione degli aspetti critici ad essa collegati fornirà indicazioni per il miglioramento dei sistemi informativi del servizio sanitario nazionale e integrerà le competenze degli operatori e nei vari ambiti (sanità pubblica, sanità veterinaria, sicurezza alimentare, protezione dell'ambiente).

## **Micotossine mascherate in alimenti a base di cereali. Metodi analitici valutazione della loro incidenza e del rischio: una tematica emergente di sicurezza alimentare**

Le micotossine sono metaboliti secondari di funghi, tossici per l'uomo e gli animali, prodotti principalmente dal genere di *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* e *Penicillium* nei cereali e prodotti alimentari derivati. I derivati delle micotossine, le micotossine mascherate o legate, hanno una struttura modificata rispetto alle micotossine d'origine e per questo sfuggono alla tradizionale rilevazione analitica. Le trasformazioni chimiche che producono micotossine mascherate possono originare da reazioni attivate dagli stessi enzimi della pianta o possono verificarsi durante i processi di lavorazione e trasformazione degli alimenti. Le micotossine mascherate non sono libere e direttamente accessibili e devono essere liberate dalla matrice vegetale mediante trattamento chimico o enzimatico prima dell'analisi chimica. Fino ad ora, solo lo zearalenone-14-β-D-glucopiranoside e il deossinivalenolo-3-β-D-

glucopiranoside sono stati trovati in alcuni cereali (grano, orzo e mais) naturalmente contaminati. Per quanto riguarda le fumonisine nascoste, benché la loro presenza sia stata evidenziata nel mais grezzo così come negli alimenti derivati, la natura del meccanismo di mascheramento non è stata completamente chiarita. Finora, solo pochi dati sono stati raccolti sulla presenza di tali micotossine negli alimenti e/o mangimi.

#### **Risultati attesi nel triennio**

La percentuale di micotossine mascherate presenti in alcuni prodotti alimentari saranno valutate per fornire informazioni preziose e utili ai laboratori di controllo, anche in vista della valutazione della conformità nei limiti di legge. Al contempo saranno fornite anche valutazioni sul livello di esposizione dei consumatori italiani, compresi particolari sottogruppi mirati di popolazione, alle micotossine mascherate derivanti dal consumo di prodotti alimentari contaminati.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La diffusione dei risultati dello studio fornirà un'informazione fondamentale all'SSN al fine di orientare in modo più coerente le azioni preventive all'interno del sistema di gestione dei rischi con particolare riguardo agli studi di monitoraggio e piani di sorveglianza.

### **Messa a punto di dispositivi nanotecnologici (biosensori) per il rilevamento di allergeni in alimenti di origine animale e vegetale**

La legislazione vigente, per tutelare in modo adeguato la salute dei consumatori, prevede che la presenza di ingredienti per i quali è riconosciuta la capacità di produrre reazioni allergiche debba essere sempre dichiarata nell'etichetta dei prodotti alimentari. In considerazione del fatto che, negli individui molto sensibili, quantitativi minimi di allergene sono in grado di scatenare reazioni avverse anche molto gravi e che la presenza di tracce di allergeni può derivare anche da contaminazioni involontarie, nel corso dei processi di trasformazione, è necessario avere a disposizione metodiche affidabili e di notevole sensibilità. Nell'ambito della ricerca di allergeni negli alimenti le metodiche utilizzate più frequentemente sono quelle ELISA e quelle basate sulla PCR, per le quali non esistono al momento attuale protocolli ufficiali standardizzati e validati. Parallelamente sono in via di sviluppo sia tecnologie innovative (biosensori) da impiegare nei protocolli di *screening*, sia protocolli per la conferma dei campioni positivi ai metodi di *screening*, applicando tecniche in spettrometria di massa, che richiedono una analoga validazione.

Il progetto, attualmente approvato del Ministero della Salute, si propone di standardizzare l'applicazione delle metodiche analitiche per la determinazione delle sostanze allergizzanti, in modo da uniformarne l'utilizzo da parte delle strutture coinvolte nel controllo ufficiale degli alimenti.

#### **Risultati attesi nel triennio**

L'ISS è coinvolto nel progetto con una propria unità operativa la cui attività avrà come obiettivi:

- Individuazione delle metodiche ELISA più promettenti utilizzate per la ricerca negli alimenti delle proteine del latte, dell'uovo e dei crostacei.
- Selezione dei metodi più affidabili sulla base dei dati raccolti relativi alle loro performance (specificità, limite di rivelabilità e quantificazione, precisione, accuratezza).
- Verifica dell'affidabilità dei protocolli operativi selezionati mediante partecipazione a test interlaboratorio strutturati con gli altri partecipanti al progetto in funzione della tipologia di allergene e delle matrici alimentari scelte.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti nell'ambito del progetto potranno essere condivisi con la comunità scientifica attraverso pubblicazioni scientifiche, seminari, comunicazioni a congressi. I protocolli, sia per le analisi di screening che di conferma, standardizzati e validati potranno essere messi a disposizione della rete IZS, creando un network di laboratori in grado di operare in modo uniforme su tutto il territorio nazionale e con lo stesso livello di affidabilità.

Tali protocolli potranno essere utilizzati nell'ambito di un piano di campionamento nelle Regioni, al fine di identificare le filiere più a rischio per la eventuale presenza di allergeni, relative alla produzione sia di alimenti di origine animale che vegetale, valutando le materie prime, le superfici di lavorazione e le possibili *cross* contaminazioni durante le fasi di lavorazione.

### **Metabolismo del nickel nell'uomo: un modello**

Il nickel è un metallo presente nell'ambiente e negli alimenti, può avere effetti nocivi per la salute umana ed è coinvolto nella genesi di specifiche dermatiti allergiche. Il primo studio della cinetica del nickel nell'uomo utilizzando un isotopo stabile del nickel come tracciante è stato svolto dalla scrivente nel 1994 ed è indicato dall'EFSA come lo studio a tutt'oggi più informativo sulla materia. Successivamente è stata aumentata la base di dati ripetendo gli esperimenti di somministrazione e monitoraggio della comparsa in liquidi ed escrezioni biologiche su un numero più ampio di soggetti (14) e per un periodo più lungo (otto giorni), sviluppando nuovi e più accurati metodi analitici e documentandone le prestazioni attraverso la validazione e un piano di controllo di qualità interno. Il progetto riguarderà l'analisi dei dati prodotti, al fine di sviluppare un modello per il metabolismo del nickel nell'uomo, tenendo conto dell'incertezza (biologica e di misura).

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Pubblicazione di dati inerenti alla stima dell'incertezza di misura di metodi in diluizione isotopica e spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente, applicati alla determinazione di isotopi stabili come traccianti.
- Pubblicazione di dati inerenti le caratteristiche necessarie per il monitoraggio della qualità dei dati analitici prodotti in situazioni non di routine.
- Pubblicazione di un modello per l'interpretazione del metabolismo del nickel nell'uomo.

### **Trasferibilità dei risultati**

Criteri per la valutazione dei rischi associati con esposizione orale al nickel.

Linee guida sull'assunzione di alimenti contenenti nickel.

### **Metodologie per l'organizzazione di prove valutative nel settore della sicurezza alimentare**

L'esposizione della popolazione a sostanze potenzialmente tossiche e/o ad organismi responsabili di patologie attraverso gli alimenti rappresenta un grave rischio per la salute ed è oggetto di legislazione europea. In questo contesto, la comparabilità dei risultati di prova sugli alimenti campionati per il controllo nei diversi Stati membri è un requisito essenziale. L'organizzazione di prove valutative (confronti dei risultati di prova ottenuti da più laboratori su campioni identici) è lo strumento più efficace per determinare e monitorare il grado di comparabilità dei risultati di prova. La complessità e la diversificazione delle prove in questo settore richiede lo sviluppo di approcci specifici. Il progetto avrà come obiettivo lo studio di metodologie e strategie per l'organizzazione di prove valutative nel settore della

sicurezza alimentare, in particolare per quanto riguarda: la preparazione e la caratterizzazione, in termini di omogeneità e stabilità, dei materiali di prova; le strategie per assicurare la riferibilità e l'incertezza dei valori assegnati; le modalità per la conservazione e il trasporto; le metodologie per la raccolta, l'analisi, l'interpretazione e la presentazione dei dati; la strutturazione di un sistema per la gestione in qualità delle prove valutative in accordo alla norma ISO/IEC 17025. Particolare attenzione sarà dedicata all'utilizzo delle nuove tecnologie, agli aspetti pre- e post analitici e alla collaborazione con altri gruppi nei Paesi UE.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Modelli per l'organizzazione di prove valutative per specifiche prove o gruppi di prove.
- Metodi per la preparazione e la caratterizzazione di materiali per prove valutative specifiche.
- Catene della riferibilità e materiali di riferimento certificati.
- Protocolli per la conservazione e il trasporto dei materiali, basati sui risultati di studi di stabilità.
- Sistemi, basati su nuove tecnologie per la raccolta, l'analisi e l'interpretazione dei dati.
- Sistema per la gestione in qualità delle prove valutative in accordo alla norma ISO/IEC 17025.
- Miglioramento delle prestazioni analitiche dei laboratori attraverso il confronto con i risultati ottenuti da altri laboratori, la consulenza individuale e la discussione dei problemi osservati con altri esperti, nel corso delle riunioni dei partecipanti.
- Informazioni documentate sulla comparabilità dei risultati di prova in un determinato settore.
- Informazioni documentate sulla capacità di determinazione delle tecniche di prova.
- Pubblicazioni relative agli studi di fattibilità e ai risultati delle prove valutative.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- Le informazioni ottenute da studi di fattibilità sono trasferibili ai laboratori nazionali di riferimento in altri Paesi dell'UE e alla comunità scientifica.
- I materiali di riferimento certificati per le prove valutative permettono il trasferimento della catena della riferibilità per prove specifiche, rafforzando la comparabilità dei risultati di prova.
- Le informazioni ottenute sulle prestazioni dei laboratori e dei metodi di prova possono essere trasferite ai Laboratori Europei di Riferimento per le specifiche prove, come elemento d'ingresso per lo sviluppo di strategie mirate alla risoluzione di problemi specifici e al miglioramento della comparabilità dei risultati di prova.
- Le informazioni ottenute sulla capacità di determinazione delle tecniche di prova attualmente disponibili possono essere trasferite alla CE come elemento d'ingresso nella fase di definizione di nuovi limiti per sostanze o organismi, per valutare la possibilità della loro implementazione.

### **Metrologia nelle scienze analitiche – armonizzazione a livello europeo**

Gran parte delle decisioni prese per l'applicazione della legislazione si basa su risultati di misurazione. L'applicazione uniforme della legislazione europea nei Paesi membri dipende anche dall'equivalenza e reciproca accettazione dei risultati di misurazione. L'implementazione di concetti metrologici nelle misurazioni analitiche è un settore in via di

sviluppo, nel quale è necessario armonizzare le metodologie; sviluppare linee guida; costruire nuove professionalità. Il progetto comprende attività svolte in collaborazione con gruppi ed enti in Paesi UE, in particolare: i) EURACHEM: sviluppo e diffusione di linee guida, organizzazione di eventi di discussione e formazione; ii) TrainMiC (*Training in Metrology in Chemistry*), programma coordinato dallo EC JRC *Institute for Reference Materials and Measurements*: sviluppo di materiale didattico armonizzato, costituito da lezioni ed esempi, sui concetti di riferibilità, validazione, materiali di riferimento, incertezza di misura, controllo interno della qualità, prove valutative e campionamento; organizzazione di gruppi nazionali di formatori, che presentano il materiale didattico tradotto nella lingua nazionale con modalità omogenee e raccolgono informazioni di ritorno; organizzazione di eventi formativi nazionali, modulati sulle esigenze locali. Comitato Consultivo per la Quantità di sostanza (CCQM): studi pilota per la documentazione delle capacità di misura per specifici misurandi.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Tra i risultati:

- Linee guida e materiale didattico, teorico e pratico, armonizzato a livello europeo e disponibile in italiano, che tiene conto degli aggiornamenti più recenti in fatto di normative europee, norme internazionali e linee guida di organizzazioni riconosciute.
- Workshop per la diffusione delle conoscenze su temi emergenti e il confronto a livello europeo (validazione dei metodi analitici, controllo di qualità interno, *proficiency testing*).
- Eventi formativi sul territorio nazionale mirati a tutti i soggetti che, a qualsiasi livello (come produttori, ispettori o utenti finali) sono interessati ai risultati di misurazioni analitiche.
- Miglioramento della comprensione di concetti di metrologia di base, quali la riferibilità dei risultati di misurazione, la validazione dei metodi e la valutazione dell'incertezza di misura, che possono essere applicati indipendentemente in settori analitici diversi (analisi di alimenti, di campioni ambientali, analisi cliniche, ecc.).
- Miglioramento della capacità di interpretare le norme e linee guida esistenti.
- Miglioramento della capacità di applicare concetti di metrologia di base nell'ambito della propria realtà operativa.
- Nuove professionalità, armonizzate a livello europeo, mirate alla gestione e al trasferimento delle conoscenze in merito alla metrologia nelle scienze analitiche.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- Disponibilità delle linee guida, in italiano, su siti web.
- Trasferibilità delle informazioni attraverso la creazione di nuove professionalità.
- Trasferimento del feedback e delle nuove esigenze del territorio a livello delle organizzazioni europee coinvolte.

### **Miglioramento della qualità casearia del latte per formaggi a lunga stagionatura**

Verrà studiata l'efficacia d'uso di un *dry off* a base di estratti vegetali per il controllo della carica leucocitaria e della mastite in vacche da latte. La ricerca verrà effettuata utilizzando un congruo numero di animali di almeno due allevamenti con caratteristiche fisio-patologiche degli animali equivalenti. Uno dei due gruppi di animali sarà trattato con la formulazione a base di terpinolo (*dry off*) mentre il gruppo di controllo sarà sottoposto ai normali trattamenti in uso presso l'allevamento. Campioni di latte verranno periodicamente

prelevati da ciascun animale, trattato e di controllo, per monitorare una serie di parametri indicatori della qualità microbiologica e di sicurezza dei trattamenti effettuati.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Saranno valutati: incidenza/prevalenza della carica leucocitaria e dei casi di mastite in relazione alle modalità di prevenzione della mastite; caratterizzazione della popolazione microbica del latte e del siero innesto per verificare l'impatto delle metodologie adottate sulla flora lattica autoctona; valutazione dell'eventuale riduzione della contaminazione del latte da spore di clostridi; valutazione della produzione quanti-qualitativa del formaggio fino al termine della stagionatura delle forme.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Aumento della competitività della produzione del grana padano per la possibilità di eliminare l'impiego di lisozima grazie al miglioramento del profilo microbiologico del latte destinato alla lavorazione.

Modelli di studio alternativi alla sperimentazione animale per contaminanti della catena alimentare ad azione endocrino-metabolica: meccanismi di azione e biomarcatori di effetto.

Sviluppo di studi integrati *in silico/in vitro* per valutare gli effetti, con relativi meccanismi e *biomarker*, durante lo sviluppo di modelli studio alternativi alla sperimentazione animale, da parte di Interferenti Endocrini (IE) presenti come contaminanti ubiquitari nella catena alimentare (alimenti e mangimi).

Vengono indagati alcuni gruppi prioritari di IE: pesticidi, biocidi, plasticizzanti ad azione di IE (es. glufosinato, glifosato etilene bisditiocarbammati, bisfenolo A, ftalati).

Lo studio sarà focalizzato agli effetti sul sistema riproduttivo maschile e femminile e sul metabolismo lipidico mediati dall'interazione con tutti i 48 recettori nucleari umani. Tali effetti verranno studiati mediante test *in vitro* con linee cellulari umane diverse per l'espressione di ER e AR, con particolare attenzione alla batteria di linee di prostata precedentemente utilizzata nel progetto europeo ReProTect ([www.reprotect.eu](http://www.reprotect.eu)) e SILVIE (Lorenzetti *et al. Reproductive Toxicology* 2010;30(1):25-35).

Specifico rilievo negli studi *in vitro* verrà dato all'approccio tossicogenomico, mediante la caratterizzazione di alterazioni dell'espressione genica, integrata con marcatori cellulari e funzionali (*phenotypic anchoring*) per valutarne l'effettivo significato biologico. In parallelo studi *in silico* di interazione molecolare mediante *molecular biomodelling* verranno effettuati in collaborazione con una piccola e media impresa (PMI o *Small and Medium Enterprise*, SME) italiana.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Gli studi *in vitro* chiariranno i meccanismi di azione dei diversi IE oggetto di studio e forniranno informazioni sui possibili biomarker degli effetti osservati e serviranno per valutare eventuali effetti additivi di esposizioni a sostanze multiple ("effetto cocktail") sui *marker* più sensibili.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- Sviluppo di strategie integrate *in silico/in vitro* e utilizzo della tossicogenomica per la valutazione tossicologica di IE contaminanti della catena alimentare.
- Incremento di conoscenze sui potenziali rischi tossicologici legati al sistema riproduttivo e metabolico in seguito all'esposizione a contaminanti della catena alimentare.
- Caratterizzazione di possibili biomarcatori di effetto utilizzabili nelle attività di prevenzione e sorveglianza sanitaria dell'esposizione alimentare a IE.

## **Nanomateriali a sicurezza alimentare**

Il crescente sviluppo delle nanotecnologie, con l'introduzione di nanomateriali ingegnerizzati in una vasta gamma di prodotti di largo consumo e nell'ambiente, determina l'esigenza di valutare i possibili rischi per la popolazione generale derivanti dall'esposizione alimentare. La nanotossicologia alimentare è un ambito emergente nel contesto della pur giovane branca della nanotossicologia, che si è evoluta a grandi passi nell'ultimo decennio per dare risposte sui possibili effetti avversi derivanti dall'interazione della materia nanostrutturata con i sistemi biologici secondo modalità complesse che rendono necessario un aggiornamento di alcuni approcci consolidati della ricerca tossicologica.

L'attività in questa area si articola in numerose iniziative di ricerca fra le quali: i) lo sviluppo di metodologie analitiche avanzate per la determinazione di nanomateriali negli alimenti; ii) la valutazione della loro stabilità nel transito gastrointestinale (modelli di digestione gastrointestinale simulata *in vitro*); iii) la conduzione di studi tossicologici rilevanti per la specifica via di esposizione (in particolare studi di tossicità orale con dose ripetuta su roditori). In questo ultimo ambito si colloca la partecipazione a progetti di ricerca europei quali Nanogenotox e Nanoreg.

### **Risultati attesi nel triennio**

Definizione di approcci e metodologie per la determinazione di nanomateriali negli alimenti e per la valutazione del rischio associato, a partire dall'identificazione e caratterizzazione del pericolo. Produzione di dati utili nel contesto delle attività promosse in questo ambito dal Ministero della Salute e dall'EFSA (*Scientific Network for Risk Assessment of Nanotechnologies in Food and Feed*).

### **Trasferibilità dei risultati**

Per le metodologie analitiche, laboratori per il controllo ufficiale in vista di una regolamentazione specifica del settore. Per la valutazione del rischio, organismi che in sede nazionale ed europea hanno compiti di RA, con particolare riferimento all'EFSA, nonché di gestione del rischio (CE).

## **PATulin control and molecular diagnostics, "Controllo della Patulina e Tecniche diagnostiche molecolari"**

L'innovazione per eccellenza di questo progetto è data dalla produzione di un anticorpo patulina specifico che, oggi, rimane ancora un traguardo per la ricerca scientifica nel campo degli alimenti non raggiunto.

Lo sviluppo di kit diagnostici altamente sensibili e specifici per l'individuazione precoce dei funghi patogeni è un sicuro elemento di innovazione del progetto: si ottimizzerà anche l'uso dei kit molecolari che consentiranno determinazioni rapide minimizzando il rischio di errori tecnici, e garantendo risultati affidabili e riproducibili.

I kit molecolari e diagnostici che sono previsti nella presente proposta di progetto rappresentano uno strumento prezioso non solo per il settore agro industriale della frutta che potrà controllare una annosa problematica in sede di autocontrollo, ma anche per le autorità competenti deputate al controllo ufficiale che disporranno di metodi affidabili di conferma e di screening capaci di rispondere analiticamente ai requisiti di prestazione della legislazione vigente.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto affronterà la problematica della contaminazione da patulina in prodotti a base di frutta mediante un approccio di tipo olistico, basato non solo sulla determinazione della

tossina, ma anche su strategie di prevenzione che prevedono la determinazione e il controllo delle specie potenzialmente produttrici della tossina.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il principale obiettivo di questo studio è quello di mettere a punto dei sistemi immunodiagnostici efficaci e rapidi per la rilevazione della patulina in matrici alimentari.

### **Potenziale zoonotico delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST) degli animali**

Le EST sono malattie neurodegenerative fatali causate dai prioni che colpiscono l'uomo e gli animali. I prioni sono agenti patogeni composti da isomeri conformazionali di una proteina codificata dall'ospite, PrPC. La *Creutzfeldt-Jacob Disease* (CJD) negli esseri umani, e la scrapie e la Encefalopatia Spongiforme Bovina (*Bovine Spongiform Encephalopathy*, BSE) negli animali, sono le forme più comuni di EST.

I prioni esistono come ceppi, anche se privi di acidi nucleici. La biologia dei prioni, unitamente ai rischi posti per la salute pubblica, ha focalizzato l'attenzione sulla barriera di specie che limita la trasmissione tra specie diverse.

Sebbene le malattie da prioni siano relativamente rare, vi è evidenza di epidemie prioni negli animali e nell'uomo. L'emergere della variante CJD (vCJD) nell'uomo legata all'esposizione alla BSE ha evidenziato il rischio che i prioni possono rappresentare per la salute umana. Recentemente sono state scoperte nuove EST animali, come il Nor98 nei piccoli ruminanti, la BASE e la BSE-H nei bovini. Queste sono forme sporadiche e diffuse in tutto il mondo, in modo simile alla CJD sporadica umana.

Le conoscenze disponibili non permettono di escludere l'esistenza di ceppi di EST potenzialmente zoonotici, o di prevederne il possibile verificarsi in futuro. Il passaggio da una simile dichiarazione generica a stime basate sull'evidenza è l'obiettivo finale di questo progetto. Verranno utilizzati strumenti molecolari e biologici per la caratterizzazione e il confronto dei ceppi animali e umani, mediante l'uso combinato di approcci *in vivo* e *in vitro*.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto mira ad individuare il potenziale rischio per la salute umana che potrebbe derivare dall'esposizione alle EST degli animali. Il nostro approccio sarà basato sulla identificazione dei ceppi biologicamente simili nell'uomo e negli animali. In questo progetto ci proponiamo di caratterizzare un ampio pannello di ceppi umani e animali tramite tipizzazione biologica discriminativa in due linee genetiche di arvicole. Le similitudini tra gli isolati saranno identificate grazie al *clustering* gerarchico, che permetterà di identificare, se presenti, i *cluster* che includono sia isolati umani che animali. In seguito, il potenziale di attraversare la barriera di trasmissione all'uomo degli isolati animali selezionati sarà modellato tramite approcci *in vivo* e *in vitro*. L'identità biologica dei ceppi umani e animali che convergono sarà ulteriormente investigata inoculando un terzo modello animale pertinente, da scegliere tra le linee disponibili di topo transgenico in base al ceppo coinvolto. Nel complesso, questo approccio porterà ad identificare quei ceppi animali che sono simili o identici a ceppi umani e che hanno un reale potenziale di infettare gli esseri umani.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il costo della BSE in termini di riduzione del rischio per l'uomo è stato enorme anche perché le misure implementate sono state in gran parte basate sul principio di precauzione. Avere strumenti affidabili per la modellazione del rischio è quindi necessario per bilanciare la necessità di ridurre i costi con il mantenimento di adeguati standard di sicurezza. Purtroppo gli strumenti di analisi tradizionalmente usati per la tipizzazione dei ceppi hanno limitazioni che impediscono di trarre conclusioni attendibili.

L'identificazione dei ceppi animali con potenziale zoonotico è in linea con la priorità della CE di garantire la sicurezza degli alimenti dal campo alla tavola. Il progetto consentirà di produrre una valutazione del potenziale zoonotico delle EST animali basato sull'evidenza. Questa informazione sarà utile per l'SSN nell'implementazione dei sistemi di sorveglianza delle malattie da prioni e per individuare target specifici per le indagini epidemiologiche.

### **Preparazione di materiale di riferimento per l'analisi microbiologica di fermenti lattici e probiotici**

La dichiarazione della conta di batteri lattici vivi e vitali di preparazioni alimentari o di integratori a base di probiotici o di fermenti lattici deve essere riportata in etichetta. Attualmente sono disponibili metodi ISO per la conta di alcune specie microbiche ma mancano preparazioni da utilizzare come materiale di riferimento (MR) con frequenti difficoltà e divergenze di tipo analitico. Si propone quindi la preparazione di MR di specie microbiche a titolo noto, dichiarato quantomeno "controllato" (al momento non risulta che siano o saranno disponibili MR per questi ceppi). È intenzione di questa struttura sviluppare un progetto per raccogliere, conservare e distribuire batteri lattici in forma liofilizzata e a titolo "controllato" ai laboratori interessati, schematicamente secondo la seguente articolazione: i) invito ai produttori di materia prima (cioè di batteri utilizzati per la preparazione di lattici fermentati, di integratori a base o con probiotici o di specialità medicinali con fermenti lattici) a candidare la/le loro sospensioni/i microbiche/che disidratata/e come possibile MR; ii) analisi della preparazioni mediante circuiti interlaboratorio tra laboratori esperti del settore (controllo e conta) ai fini della definizione del titolo; iii) valutazione dei risultati e loro elaborazione per l'attribuzione del titolo; iv) catalogazione, stoccaggio, controllo della stabilità e distribuzione delle preparazioni a titolo controllato da parte di questo reparto.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Preparazione di materiali di riferimento a titolo noto colmando l'attuale mancanza per il controllo questa tipologia di microrganismi. Si sottolinea che al momento non risulta che gli enti preposti alla preparazione di materiali di riferimento abbiano in programma di realizzare preparazioni liofilizzate a titolo noto per fermenti lattici o probiotici.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Produzione di materiali di riferimento che potrebbero essere convenientemente utilizzati da parte di tutti i laboratori interessati per la realizzazione di prove intralaboratorio e/o eventualmente, dall'ISS stesso, per la realizzazione di prove valutative interlaboratorio su base volontaria. La disponibilità di questo MR consentirebbe ai laboratori interessati perlomeno di verificare/validare il metodo da utilizzare e di calcolare la propria incertezza di misura per le varie tipologie di interesse.

### **Presenza di ditteri micetofilidi nei funghi freschi e comunque conservati e modalità di rivelazione**

In relazione alla necessità di revisionare i criteri di valutazione di conformità e idoneità igienico sanitaria delle partite di funghi comunque conservate da immettere sul mercato (DPR 14/7/1995 n. 376) e in particolare della opportunità di stabilire valori tollerabili per le larve di taluni insetti (ditteri micetofilidi) si rende necessario acquisire elementi conoscitivi sullo stato del prodotto raccolto sul territorio nazionale e su quello importato da Paesi comunitari e Paesi terzi al fine di identificare i fattori che concorrono a tale infestazione. I

funghi epigei infatti sono il substrato alimentare di alcune specie entomatiche e pertanto l'infestazione fungina è un fenomeno non del tutto controllabile in natura.

L'obiettivo del progetto è monitorare la presenza di ditteri micetofili nei funghi freschi e comunque conservati in funzione di: specie, area geografica di provenienza, stagionalità e categoria merceologica per stimare l'entità del fenomeno e valutare i fattori che lo influenzano, attraverso: i) prelievi di materie prime di origine comunitaria ed extra-comunitaria in collaborazione con gli Uffici di sanità marittima, aerea e di frontiera (USMAF); ii) prelievi, da parte di un ente terzo certificato e concordato tra le parti (campioni anonimi), di prodotti finiti dalla grande distribuzione organizzata (GDO); iii) ricerca e conta dei frammenti o unità di larve delle specie fungivore nelle porzioni di funghi campionati (variamente conservati) secondo metodo riportato in Rapporto ISTISAN 2010/18.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Raccolta dati sulla infestazione di ditteri micetofili nei funghi freschi e comunque conservati (essiccati, congelati, surgelati, sott'olio/aceto, in salamoia) e correlati alle diverse specie fungine ammesse alla vendita e ai Paesi di provenienza al fine di definire un'efficace strategia di intervento igienico e una più obiettiva definizione dei valori di larve eventualmente tollerabili.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Individuazione obiettiva dei valori di larve eventualmente tollerabili con possibilità di fornire al Ministero della Salute e agli operatori dell'SSN addetti al controllo ufficiale più aggiornati e affidabili elementi di valutazione dei funghi commercializzati nel territorio nazionale.

### **Progetto di ricerca e monitoraggio delle micotossine del mais**

Presso i laboratori della Sezione di Patologia vegetale del Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-Forestali dell'Università di Padova verranno condotte le analisi micologiche sulle farine provenienti dai campioni di mais parallelamente sottoposti ad analisi chimica dalle altre UO partecipanti al Progetto. Dapprima verrà eseguito uno screening qualitativo con stima delle quantità delle principali specie tossigene appartenenti ai generi *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, adottando il metodo delle diluizioni seriali, seguito da purificazione e diagnosi morfologica. In questa fase, oltre che alle specie più diffuse e responsabili delle principali micotossine, verrà posta particolare attenzione anche ai *Fusaria* responsabili della sintesi di tossine emergenti. A tale fase, in base ai risultati dello screening e alle indicazioni provenienti dalle altre UO, potrà seguire uno step di approfondimento per la ricerca e quantificazione mediante metodi molecolari delle specie meno frequenti e più difficili da diagnosticare.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Le analisi delle difettosità che comunemente vengono utilizzate nella pratica e nella commercializzazione dei cereali per una stima della qualità merceologica del prodotto, saranno per la prima volta correlate quantitativamente alle caratteristiche sanitarie attraverso la valutazione delle specie fungine e delle micotossine.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Immediata ricaduta per i produttori sarà quella di orientare le operazioni di prevenzione e lotta contro le infezioni fungine, rendendole specifiche per i patogeni da combattere e quindi più efficaci.

## **Progetto ENDOTRACK**

Il progetto ENDOTRACK prevede lo sviluppo di un complesso hardware e software basato su tecnologie RFID per la realizzazione di un sistema automatico d'intelligenza d'ambiente per il monitoraggio e l'assistenza di sala operatoria, dedicato a tutti i processi che vedono coinvolti i dispositivi monouso che, durante gli interventi, vengono utilizzati sul paziente.

Scopo del progetto è la realizzazione, nell'ambito sopra considerato, di un prodotto innovativo, realizzato con tecnologie di comunicazione all'avanguardia, in grado di offrire:

- la rintracciabilità dei dispositivi monouso utilizzati in sala operatoria;
- il monitoraggio della presenza e della posizione dei dispositivi monouso all'interno del paziente;
- la realizzazione di dispositivi medici monouso RFID realizzati mediante l'integrazione dei *transponder* RFID all'interno delle garze e delle bende.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Realizzazione di analisi e ricerche sulla classificazione dei dispositivi RFID utilizzati e sulla loro compatibilità con gli altri Dispositivi Medici presenti in sala operatoria, in ottemperanza alle Direttive e alle Norme Tecniche che regolamentano il settore: la letteratura ad oggi disponibile sul tema è scarsa, gli elementi raccolti costituiranno una base di partenza per successivi studi e pubblicazioni in materia.
- Ricerca e Sviluppo di specifici *Transponder* RFID: la ricerca avrà come effetto la scelta e la definizione delle proprietà costruttive e di radiazione dei *transponder* e dei dispositivi RFID per un utilizzo sicuro ed efficace in sala operatoria.
- Contribuire al miglioramento della qualità e dell'appropriatezza degli interventi a tutela della salute umana.
- Contribuire all'abbattimento del rischio clinico in sala operatoria dovuto alla permanenza di corpi estranei all'interno del corpo dei pazienti.
- Incremento delle competenze tecnico-scientifiche in un settore emergente come quello delle tecnologie RFID.
- Aumento della la visibilità scientifica dell'ISS in questo campo, rafforzando il ruolo dell'ISS come organo tecnico dell'SSN.

### **Trasferibilità dei risultati**

La trasferibilità all'interno dell'SSN dei risultati previsti dal progetto, ai fini del miglioramento della qualità dei servizi erogati e della sicurezza dei pazienti, è assicurata dall'utilizzo di tecnologie RFID, oramai consolidate in altri ambiti, di terminali di derivazione commerciale, per i quali l'utente è già in possesso di una discreta familiarità, e dall'adozione di protocolli standard per le applicazioni informatiche di supporto.

La diffusione dei risultati prodotti sarà garantita mediante la pubblicazione di articoli e linee guida, la partecipazione a meeting e workshop sul tema dell'impatto della tecnologia RFID in ambiente sanitario.

## **Progetto sperimentale per una viticoltura salubre e sostenibile di montagna**

Obiettivo del contratto di ricerca è quella di contribuire alla promozione e allo sviluppo di pratiche agricole più salubri e sostenibili, al fine di proteggere la salute della popolazione e la produzione viticola stessa mediante la progressiva sostituzione di fitosanitari che vengano, con periodica verifica tossicologica attuata durante la durata del progetto, classificati e/o definiti scientificamente "a maggior rischio" per la salute, con principi attivi a minor rischio. Il progetto comporta l'elaborazione di dossier tossicologici che valutino la progressiva scelta

di principi attivi “a basso rischio” operata dal punto di vista agronomico mediante l’analisi critica della letteratura disponibile nazionale e internazionale, delle banche dati e della letteratura grigia, per fornire un parere tecnico-scientifico. Per principi attivi a “basso rischio” si intendono quelli che non rientrano, allo stato attuale delle conoscenze nelle categorie di rischio corrispondenti a: “cancerogene, mutagene, tossiche per la riproduzione e sviluppo, sensibilizzanti, molto tossiche o tossiche, interferenti endocrini, neurotossici, immunotossici ovvero con effetti a lungo termine.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- proteggere la salute umana, garantire l’efficacia agronomica contro le patologie vegetali della vite;
- contribuire ad una riduzione numerica programmata e controllata nei principi attivi;
- permettere un utilizzo di quantità totale di pesticidi il più possibile ridotto;
- evitare per quanto possibile la miscelazione di principi attivi;
- utilizzare una quantità ridotta e comunque quantificata dei conservati chimici di sintesi nei derivati dell’uva;
- reperire minori quantità di residui in tali derivati e comunque di sostanze a basso rischio.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L’approccio tossicologico e l’elaborazione di dossier, che valutano la progressiva scelta di principi attivi “a basso rischio” operata dal punto di vista agronomico” mediante l’analisi critica della letteratura disponibile nazionale e internazionale, delle banche dati e della letteratura grigia, per fornire un parere tecnico-scientifico, possono essere utilizzati in altre realtà rurali o semi-rurali a livello inter- e nazionale per una più attenta strategia di tutela della salute della popolazione e dell’ambiente di vita.

### **Programma PROSIT Industria 2015, Bando Nuove Tecnologie per il Made in Italy**

I salumi italiani, ad elevati livelli di consumo interno (18,5 kg annui pro-capite) ma con una modesta quota di esportazione (10%), possono trovare nuove opportunità di espansione solo se sapranno coniugare i propri elementi di forza (valori d’immagine, qualità sensoriali) con concreti elementi di innovazione. Il programma intende eliminare alcuni fattori di criticità presenti nei salumi (pericoli per il consumatore) e promuovere le componenti utili per la prevenzione di patologie e la salvaguardia della salute. La sperimentazione verrà articolata su tematiche quali la promozione di molecole bioattive (specifici peptidi), la biodisponibilità di oligominerali, qui si incentra lo specifico contributo dell’ISS, l’eliminazione dei conservanti (nitrati e nitriti), la prevenzione di contaminazioni (da microrganismi patogeni e muffe tossinogene), la riduzione del contenuto in sodio, il miglioramento del profilo lipidico (arricchimento in acidi grassi monoinsaturi). Il programma si propone di innovare i prodotti della salumeria italiana per la sicurezza, la nutrizione e la salute.

I beneficiari del finanziamento del Ministero dello Sviluppo Economico sono le imprese partecipanti al programma, per le quali l’ISS svolgerà attività di ricerca contrattuale.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Realizzazione di un’ampia gamma di salumi “Made in Italy” ad elevato valore nutrizionale, in grado cioè di inserirsi nel nuovo segmento di alimenti salutistici e “nutrigenomici”, ma al tempo stesso in linea con le aspettative di qualità dei consumatori più tradizionali. Valorizzazione dei prodotti della salumeria tradizionale mediante conferimento

di caratteri nutraceutici e nutrigenomici specifici. Messa a punto di processi innovativi finalizzati al miglioramento del profilo nutrizionale dei salumi italiani. Sviluppo di linee-guida per la produzione di salumi tradizionali immuni da pericoli per il consumatore.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Diversamente da analoghe ricerche condotte in Italia e all'estero, lo studio non si basa su sistemi-modello né su preparati di fantasia, ma su prodotti reali, scelti fra quelli più rappresentativi del Made in Italy salumiero, con grande estensione territoriale e con l'inclusione di salumi di larghissimo consumo al fianco di prodotti di nicchia. Il partenariato coinvolge aziende di primo piano nel panorama nazionale, insieme con realtà di piccole o piccolissime dimensioni, accomunate da un'estrema specializzazione nello specifico settore di competenza. Ciò garantisce che i risultati ottenuti, superati i test di validazione previsti per ciascuna azione del programma, diventino immediatamente esecutivi su scala industriale. Inoltre, grazie all'impostazione delle prove, rigorosamente ancorate a parametri oggettivi, tutta la sperimentazione può essere trasferibile, con benefici potenziali per l'intero settore.

#### **The relationship among food, mycotoxins, gastrointestinal disorders and autism: a multidisciplinary approach for the molecular investigation**

Studio condotto nell'ambito della Ricerca Finalizzata-Giovani Ricercatori anno 2009. Il progetto si svilupperà attraverso lo svolgimento di attività di cinque WP. Il WP ISS si occuperà della validazione in house di metodi di analisi per la ricerca delle micotossine, della analisi quali/quantitativa di micotossine in campioni biologici e della analisi statistiche per correlare dati provenienti da WP 1-2-3 e determinare la correlazione tra stato clinico dei pazienti e presenza di micotossine nei campioni biologici.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Ottenimento di elementi conoscitivi utili per stabilire eventuali correlazioni tra parametri clinici di bambini autistici e presenza di micotossine nella dieta e nei fluidi biologici degli stessi.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Acquisizioni di informazioni necessarie per effettuare una corretta valutazione del rischio derivante da micotossine presenti negli alimenti destinati a fasce di consumatori ritenute altamente suscettibili di maggiore esposizione a xeno biotici.

#### **Sistema integrato di biosensori e sensori (BEST) per il monitoraggio della salubrità e qualità e per la tracciabilità della filiera del latte bovino (ALERT)**

ALERT sviluppa e industrializza fino alla fase di prototipo per la produzione in scala il dispositivo BEST brevettato dall'ISS (PCT WO/2010/001432), introducendo nel processo produttivo batterie di biosonde nanometriche in grado di rilevare con approccio metabolomico l'esposizione a sostanze tossiche, alterazioni dello stato di salute o dell'alimentazione animale, e di avvisare via wireless gli allevatori e produttori.

ALERT realizza il sistema aziendale di tracciabilità e gestione rapida del rischio con nuovi parametri.

BEST è una piattaforma tecnologica flessibile integrata, automatizzata, telematica ed ecocompatibile, equipaggiata con diagnostica innovativa. BEST produce, in tempo reale, in continuo, quotidianamente e in simultanea, una impronta multiparametrica del latte durante il percorso produttivo.

ALERT si basa su un consorzio pubblico-privato, finanziato dal Ministero dello Sviluppo Economico. L'ISS ha la responsabilità complessiva del programma, che integra due *cluster*:

- “Gestione del rischio e biomarcatori”, coordinato da ISS e cui partecipano IZS Lazio e Toscana e alcune aziende del settore (Centrale del latte di Roma, Lattepiù), per l’identificazione e gestione delle griglie di (bio)indicatori.
- “Tecnologia”, coordinato da CNR e con la partecipazione di aziende nei settori della (bio)sensoristica e delle macchine mungitrici (Amel, Biochem, Biosensor, Total Dairy Management), per lo sviluppo e collaudo della batteria di dispositivi BEST dislocati lungo la filiera.

#### **Risultati attesi nel triennio**

ALERT fornirà: i) la batteria centralizzata di dispositivi BEST funzionanti lungo l’intera filiera del latte bovino; ii) la caratterizzazione di parametri non ancora gestiti nei piani di autocontrollo e *Hazard Analysis and Critical Control Point* (HACCP); iii) piani di gestione rapida del rischio e di tracciabilità; iv) la divulgazione a operatori, consulenti e pubblico; v) una piattaforma tecnologica per l’interfaccia stabile fra impresa lattiera ed enti di ricerca. ALERT mira alla qualificazione e competitività di una componente chiave della produzione alimentare Made in Italy, sfruttando nuove conoscenze e tecnologie innovative per incrementare e modernizzare la capacità di autocontrollo e organizzazione del mercato del latte di allevamento, l’ottimizzazione dell’utilizzo delle risorse destinate ai controlli e la minimizzazione delle perdite dovute ad “allarmi e incidenti”, promuovendo così il valore della produzione primaria. I potenziali benefici riguardano anche le Centrali del latte e l’industria della trasformazione, in termini di gestione e armonizzazione, e il mercato dell’indotto zootecnico (es. mangimi, macchine mungitrici) per il più rapido feedback e stimolo all’innovazione da parte del produttore primario. Beneficiari maggiori saranno l’SSN, che avrà di fronte produttori forniti di migliori strumenti per realizzare la propria responsabilità nella sicurezza dei prodotti, e il cittadino, i cui alimenti saranno tutelati da approcci nuovi, più efficaci ed efficienti.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L’uso di indici tracciabili in continuo genera monitoraggio efficace e sostenibile (costi, tempo), ridotta vulnerabilità a eventi inattesi, nonché rapida valutazione dell’impatto di pratiche zootecniche; contribuisce a sviluppare un sistema di tracciabilità nella filiera produttiva. BEST considera il latte come bioindicatore di salute dell’animale, come prodotto alimentare e come indicatore di processo (gestione aziendale); al contempo, viene data massima attenzione alla trasferibilità nella pratica produttiva. Infatti, BEST è progettato con caratteristiche (automazione, costo, facile manutenzione, compatibilità con la produzione) mirate a ottimizzare la recepibilità in azienda. La validazione in azienda comprenderà: i) facilità d’uso; ii) sistemi di allerta; iii) software per analisi multivariata e monitoraggio centralizzato; iv) carte di controllo compatibili con le procedure aziendali di documentazione; v) protocolli di uso e manutenzione e piano operativo di sicurezza (POS); vi) efficienza e durata.

### **Sorveglianza e degli agenti di zoonosi a trasmissione alimentare in Europa e in Italia**

Gli organismi regolatori (DG SANCO) e di sorveglianza a livello nazionale e internazionale (ECDC, EFSA) concorrono alla realizzazione della politica integrata nel campo della sicurezza alimentare secondo quanto disposto dal Reg. 178/2002 CE, prevedendo che ciascun Paese adotti un assetto regolatorio e di sorveglianza speculare a quello europeo. Per le zoonosi alimentari ciò si traduce nella necessità di armonizzare gli strumenti di sorveglianza, allerta rapida, e preparedness, con quanto implementato a livello UE. Nell’ambito della sorveglianza degli agenti di zoonosi esistono sistemi speciali (Enter-

Net/Vet, SEU) che affiancano i piani ufficiali in ambito veterinario e umano. Questi sono solo parzialmente armonizzati e in grado di soddisfare le necessità informative richieste dalla UE e il ruolo che la sorveglianza è chiamata a svolgere. Il progetto intende effettuare una valutazione delle risorse strutturali (fonti dati, flussi), funzionali (competenze, titolarità) e delle performance dei sistemi attivi, in relazione alle necessità di assicurare la piena integrazione e armonizzazione dei flussi informativi e dei sistemi di risposta con quelli europei. L'identificazione delle criticità consentirà di identificare percorsi per la loro risoluzione che consentiranno di adempiere esaustivamente alle richieste degli organismi regolatori e di sorveglianza e di contribuire alla piena realizzazione del controllo delle zoonosi alimentare secondo l'approccio della politica UE.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- identificazione e valutazione dei flussi informativi e sistemi di sorveglianza esistenti riguardo gli agenti di zoonosi oggetto di sorveglianza nell'ambito dell'FWD (ECDC) e inclusi nell'allegato 1 A della Dir. 99/2003/CE;
- identificazione e implementazione dei sistemi informativi di allerta rapida nell'ambito del rischio zoonosico e valutazione del livello di integrazione con quanto richiesto a livello europeo;
- identificazione delle capacità di sorveglianza, indagine dei focolai epidemici infettivi e tossinfettivi di origine alimentare e flussi informativi ad essi correlati;
- valutazione della *preparedness* e della capacità di risposta (in termini informativi) in relazione a potenziali emergenze infettive e tossinfettive connesse ai diversi patogeni zoonosici di origine alimentare;
- valutazione del *burden of illness* connesso per i diversi patogeni zoonosici di origine alimentare e stima della sottonotifica ad essi associata.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- i risultati ottenuti verranno divulgati a livello nazionale attraverso la produzione di report e di pubblicazioni scientifiche;
- l'ampliamento della base di sorveglianza a implementazione di sistemi informativi integrati (sorveglianza umana/sorveglianza veterinaria) nell'ambito del sistema EnterNet e del Registro italiano della sindrome emolitico uremica consentiranno di dotare il sistema di importanti strumenti di raccordo con i flussi informativi in capo all'ECDC per i principali agenti di zoonosi a trasmissione alimentare (Salmonella, *E. coli* VTEC, Shigella, Yersinia, Listeria);
- la valutazione del *burden of illness* e della sottonotifica consentirà di ottenere stime epidemiologiche utili alla prioritizzazione e pianificazione degli interventi di controllo sanitario nell'uomo e nelle filiere di produzioni animali per i diversi agenti di zoonosi a trasmissione alimentare.

### **Sorveglianza virologica e sierologica di virus influenzali di gruppo A circolanti in allevamenti italiani e studio di nuovi composti in grado di inibire la replicazione di virus influenzali *in vitro***

Il progetto intende ampliare e approfondire gli studi già avviati negli ultimi anni, in collaborazione con il Dipartimento MIPI dell'ISS, con strutture dell'SSN ed europee, sulla sorveglianza virologica e sierologica di virus influenzali aviari e suini di gruppo A, potenzialmente in grado di infettare l'uomo. Contemporaneamente, il progetto si propone di proseguire gli studi epidemiologici sui lavoratori del comparto zootecnico (tecnici e medici

veterinari) potenzialmente esposti al rischio di contagio da parte dei medesimi virus influenzali, al fine di individuare misure di prevenzione e di controllo in ambito occupazionale.

Il progetto si propone, inoltre, di approfondire gli studi già in corso sulla attività di una classe di composti in grado di inibire la replicazione virale, gli *short interfering RNA* (siRNA). In particolare, sulla base dei risultati preliminari ottenuti, verrà verificata l'efficacia di siRNA diretti verso la proteina PB1 di virus influenzali di gruppo A nell'inibire la replicazione virale *in vitro*.

Il progetto si propone infine di completare gli studi, tuttora in corso, sulla standardizzazione di un sistema di estrazione e di concentrazione del virus dell'influenza aviaria da carne di pollame sperimentalmente contaminata, mediante l'impiego di un controllo di processo interno che permetta di valutare l'efficacia della intera procedura.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi riguardano:

- Caratterizzazione molecolare e standardizzazione di tecniche diagnostiche per la ricerca dei sottotipi di virus influenzali animali circolanti in allevamenti italiani, potenzialmente in grado di infettare l'uomo e standardizzazione di prove di siero neutralizzazione su sieri di lavoratori esposti per la ricerca di anticorpi nei confronti di virus influenzali animali.
- Identificazione di nuove molecole siRNA in grado di inibire la replicazione di virus influenzali di gruppo A *in vitro*.
- Sviluppo di un metodo in grado di identificare la presenza di virus influenzale da carne di pollame contaminata e contemporaneamente di rimuovere le sostanze inibenti presenti nella matrice alimentare.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Gli studi molecolari su ceppi virali influenzali isolati da diverse specie animali e i risultati degli studi epidemiologici sui lavoratori esposti a virus influenzali animali forniranno un utile contributo al chiarimento della patogenicità dei virus influenzali e dei meccanismi di trasmissione interspecie. Tali dati saranno disponibili per le strutture afferenti all'SSN e potranno essere utilizzati per la predisposizione di piani di controllo per virus influenzali circolanti negli allevamenti italiani.

L'individuazione di siRNA in grado di inibire la replicazione di virus influenzali *in vitro* fornirà utili informazioni per lo sviluppo di terapie anti-influenzali utilizzando questa nuova classe di farmaci.

La metodica utilizzata per il rilevamento del virus influenzale dalle carni di pollame fornirà un modello utilizzabile per l'identificazione di agenti biologici che potrebbero essere impiegati a scopo bioterroristico negli alimenti.

### **Studio biomolecolare dell'interazione degli agenti patogeni responsabili di infezioni batteriche a carattere zoonosico, oggetto di Profilassi di Stato negli animali di allevamento, con l'ospite**

La Profilassi di Stato per il controllo di importanti infezioni batteriche a carattere zoonosico quali brucellosi, salmonellosi, carbonchio ematico e TB bovina, prevede, secondo le normative comunitarie e nazionali, l'attività di consulenza dell'ISS che permetta il controllo e la messa a punto di metodi diagnostici (microbiologici, immunologici e biomolecolari) specifici e sensibili utili ai fini della sorveglianza epidemiologica. A tal fine le attività programmate per il triennio 2012-2014 saranno finalizzate allo sviluppo di

strumenti utilizzabili nella sorveglianza epidemiologica e nel controllo della brucellosi e della salmonellosi, come naturale continuazione delle attività svolte negli anni precedenti.

Il progetto si propone di:

- sviluppare metodi per l'isolamento dei patogeni da matrici diverse;
- sviluppare metodi biomolecolari in grado di caratterizzare rapidamente i ceppi patogeno (genere, specie, biotipo o sierotipo) attraverso l'individuazione di specifici *marker* molecolari;
- valutare la risposta immunitaria dell'ospite alle infezioni cercando di individuare *pattern* associati alla comparsa di protezione immunomediata;
- le attività proposte saranno caratterizzate dall'utilizzo di tecniche di biologia molecolare di tipo qualitativo e quantitativo che andranno a complementare le altre attività del reparto.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Le attività programmate consentiranno:

- l'identificazione di geni dell'ospite responsabili della suscettibilità/resistenza all'infezione al fine di individuare un metodo alternativo per controllare la diffusione della malattia (selezione genetica);
- la messa a punto di metodi biotecnologici per lo studio quantitativo/qualitativo della loro espressione genetica;
- l'acquisizione di utili informazioni che potrà contribuire alle conoscenze di base dell'interazione tra gli ospiti vertebrati e i patogeni considerati.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le conoscenze acquisite permetteranno di migliorare e rafforzare le misure di sorveglianza epidemiologica nell'ambito dei piani di profilassi riguardo le zoonosi considerate.

I nuovi metodi biomolecolari e le altre informazioni acquisite potranno essere oggetto di pubblicazioni su riviste nazionali e internazionali.

### **Studio comparativo dei plasmidi di virulenza nei clostridi produttori di neurotossine botuliniche**

Le neurotossine botuliniche (NB) costituiscono uno dei più potenti veleni esistenti in natura, essendo la loro dose letale per l'uomo di solo 1ng/kg di peso corporeo. Esse sono zinco-endopeptidasi in grado di scindere specificamente le proteine neuronali coinvolte nel rilascio del neurotrasmettitore acetilcolina: il conseguente blocco del rilascio del mediatore a livello delle giunzioni neuromuscolari periferiche causa la paralisi flaccida del botulismo. Le NB sono codificate da geni specifici che si trovano nel genoma di *Clostridium botulinum* e più raramente in quello di altre specie clostridiche, in particolare *C. butyricum* e *C. barati*. Recentemente abbiamo dimostrato che tali geni sono posizionati su grandi plasmidi in un numero elevato di ceppi di *C. botulinum* saggiati. Abbiamo inoltre identificato la presenza di megaplasmidi lineari che portano geni di resistenza agli antibiotici in dieci rari ceppi di *C. butyricum* produttori di NB isolati in Italia e in Cina. Tali scoperte indicherebbero che plasmidi di varia natura conferiscono ai clostridi produttori di NB un insieme di vantaggi selettivi alla base della loro patogenicità per l'uomo e l'animale. Le attuali conoscenze dei plasmidi recentemente identificati nei clostridi neurotossigeni sono molto scarse. Scopi di questo progetto saranno la caratterizzazione e il paragonare dei plasmidi recentemente identificati, e lo studio del loro potenziale trasferimento tra microrganismi appartenenti a specie e generi diversi.

### **Risultati attesi nel triennio**

Ci si attende una certa variabilità genetica sia nei plasmidi individuati in *C. botulinum* che portano i geni delle NB, che in quelli individuati in *C. butyricum* che portano i geni delle beta-lattamasi, ovvero i geni di resistenza agli antibiotici beta-lattamici. Tali plasmidi, infatti, mostrano evidenti differenze per quanto concerne le loro dimensioni: da circa 48 kb a 270 kb è il range delle dimensioni dei plasmidi che portano i geni delle NB; e da circa 650 kb a 810 kb è il range delle dimensioni dei plasmidi che portano i geni delle beta-lattamasi. Le sequenze nucleotidiche di alcuni di questi plasmidi sono già disponibili in banca dati. Le regioni conservate e quelle uniche all'interno dei plasmidi di virulenza che si vogliono paragonare saranno individuate mediante macro- e *microarray*; dati di supporto saranno ottenuti mediante mappe fisiche dei plasmidi costruite mediante PCR, macrorestrizione e analisi *Southern blot*. Esamineremo inoltre la possibilità che i plasmidi di virulenza siano mobilizzabili fra microrganismi appartenenti a specie diverse del genere *Clostridium*, e fra microrganismi appartenenti a generi diversi; in particolare, poiché i clostridi sono componenti comuni della flora microbica dell'intestino umano e animale, sarà analizzata la potenzialità dei plasmidi di essere trasferiti a microrganismi costituenti tipici della flora intestinale. I meccanismi alla base del trasferimento genetico, se dimostrato, verranno studiati.

### **Trasferibilità dei risultati**

Le NB hanno di recente assunto nuova importanza: oltre a causare il botulismo umano e animale, esse vengono usate in dosi minime nella terapia di sempre più numerose disfunzioni neuromuscolari, e sono state chiamate in causa come potenziali armi biologiche. Il problema della diffusione dell'antibiotico-resistenza fra microrganismi ha una rilevanza clinica ben nota e qualsiasi informazione sulla trasferibilità dei geni di resistenza può contribuire a limitarne il fenomeno. Il conseguimento degli obiettivi del presente progetto contribuirà: i) ad una migliore caratterizzazione del pericolo microbiologico, fase chiave ai fini di una valutazione del rischio più razionale; ii) allo sviluppo di specifici *microarray* atti all'identificazione rapida della posizione genomica (cromosoma o plasmide) dei geni delle NB e/o della antibiotico-resistenza; iii) alla conoscenza della stabilità genetica del gene della NB nei ceppi di *C. botulinum* utilizzati per la produzione di tossina a scopo terapeutico.

## **Studio dei fattori genetici per la gestione delle EST dei piccoli ruminanti con particolare riferimento alle capre**

Le EST sono patologie neurodegenerative che comprendono nell'uomo la CJD, negli animali la scrapie degli ovini e caprini e la BSE. La suscettibilità alle EST è influenzata, dal genotipo dell'ospite per quanto riguarda il gene della proteina prionica (PrP). Il ruolo determinante giocato dal gene della PrP nella suscettibilità alle EST negli ovini ha fatto decidere a livello Europeo l'utilizzo di strategie di selezione genetica per la gestione di queste malattie nei piccoli ruminanti. La mancanza di un'efficace strategia nelle capre potrebbe rappresentare un punto critico per il successo generale della gestione delle EST dei piccoli ruminanti.

Obiettivo del progetto è di verificare nelle capre l'esistenza di alleli del gene della PrP, associati a resistenza alle EST. Sarà studiato il gene della PrP dei casi naturali di malattia oltre ad un campione di controllo, in diverse regioni italiane e concentrandosi su differenti razze di interesse nazionale, per evidenziare l'associazione a resistenza degli alleli della PrP. Si utilizzerà inoltre la tecnica del *Protein Misfolding Cyclic Amplification* (PMCA) come strumento predittivo della suscettibilità genetica alle EST. Nel nostro laboratorio è stato dimostrato che il PMCA può riflettere *in vitro* la suscettibilità genetica delle pecore alla

scrapie. La tecnica del PMCA sarà quindi utilizzata per testare vari genotipi di cui esistano evidenze di associazione con minore suscettibilità per verificarne la suscettibilità nei confronti dei diversi ceppi.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Obiettivo del progetto è quello di studiare il ruolo svolto dal gene della PrP e dei diversi alleli presenti nella specie caprina, nel determinare la suscettibilità/resistenza alle EST e individuare alleli associati a resistenza alle EST.

Sarà, infatti, definito il comportamento di differenti alleli della PrP caprina nei confronti di diversi ceppi di EST al fine di fornire una base scientifica per l'istituzione della selezione genetica nei confronti dei fattori di resistenza alle EST anche nella specie caprina.

Tali risultati potrebbero portare al disegno di un piano di selezione genetica anche per le capre con il fine di attuare una efficace strategia di gestione e possibilmente eradicazione delle EST dai piccoli ruminanti. Tale obiettivo rientra nella strategia europea di diminuire e possibilmente eliminare l'esposizione dell'uomo alle EST animali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti verranno divulgati a livello nazionale e internazionale attraverso la produzione di report e di pubblicazioni scientifiche. I risultati di carattere applicativo verranno resi disponibili al Ministero della Salute e all'SSN ai fini del loro utilizzo per la prevenzione e il controllo delle EST.

### **Studio dei meccanismi evolutivi di virus dell'epatite E e di virus gastroenterici (rotavirus e norovirus) e loro influenza su virulenza, trasmissione zoonotica, epidemiologia e diagnostica**

Lo studio si ripropone di investigare ceppi di diversa origine di HEV, NoV (Norovirus) e RV (rotavirus), con metodi di caratterizzazione molecolare, antigenici, e cellulari, ai fini di identificare le modificazioni genomiche alla base della patogenicità per diverse specie ospiti, della trasmissibilità interspecie, e che influenzano l'identificazione degli agenti stessi nei campioni clinici, alimentari e ambientali.

Avendo già confermato la larga diffusione di HEV in infezioni asintomatiche del suino allevato in Italia, lo studio intende mettere a confronto sequenze genomiche virali da pazienti con epatite E in Italia e altri paesi europei, con quelle riscontrate nell'ambiente (liquami, acque superficiali) e in animali allevati (suino) e selvatici (cervidi, cinghiale, roditori) geograficamente correlati. Studi filogenetici saranno mirati a identificare regioni critiche implicate nella specificità di specie. Saranno effettuati studi molecolari *full-genome* e antigenici su RV del suino, per identificare geni e frammenti di RNA scambiati tra ceppi animali e umani. Saranno comparate le sequenze genomiche di ceppi di NoV di genogruppo II di origine suina, e confrontate con quelle di ceppi GII di NoV implicati in episodi di gastroenterite acuta nell'uomo. Saranno clonate ed espresse proteine capsidiche di ceppi virali di diversa origine, per investigarne le proprietà di adesione a recettori cellulari di diversa origine.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Si prevede di estendere le conoscenze molecolari sui tre diversi virus target dello studio, ottenute nel corso dell'ultimo decennio. Verranno ottenuti una grande quantità di dati di sequenza nucleotidica che confluiranno nel database allestito presso il Reparto di Zoonosi virali, e saranno elaborati alberi filogenetici, atti ad evidenziare le modificazioni genomiche presenti in ceppi simili di diversa origine. Si prevede che queste analisi contribuiranno a chiarire i percorsi evolutivi dei tre virus, attraverso fenomeni di mutazione/selezione, ricombinazione genica e riassortimento intra e inter-specie. La comparazione di sequenze permetterà di perfezionare gli strumenti diagnostici molecolari e i metodi di indagine

epidemiologici, con particolare attenzione alle fonti di infezione (umane, ambientali, o animali), e di consentire studi genomici *full length* utili a indicare ricombinazioni/rissortimenti interceppo. È previsto di effettuare il clonaggio molecolare di ceppi di NoV, RV e HEV, di origine diversa, al fine di generare antigeni virali ricombinanti assemblati (VLP), utili a studiare le proprietà differenziali di legame cellulare dei virioni in base alla specie di origine, e alle differenze genetiche e antigeniche. Saranno infine generati anticorpi poli- e monoclonali atti ad evidenziare differenze tra ceppi e varianti virali, e utili ai fini del miglioramento delle metodologie diagnostiche, in particolare su matrici alimentari e ambientali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto ha valenza di ricerca fondamentale, ma le conoscenze generate sulla natura ed evoluzione di HEV, NoV e RV consentiranno di prevedere possibili rischi di infezione e malattia nell'uomo, associati alla circolazione di questi agenti nelle specie animali e nell'ambiente. Sarà così possibile implementare approcci di controllo idonei a limitare la trasmissione zoonotica di alcune patologie, anche attraverso la catena alimentare. I risultati del progetto di ricerca consentiranno di valutare la congruità delle attuali formule vaccinali per RV nell'uomo, simulando gli effetti di possibili introduzioni zoonotiche di ceppi animali. Lo sviluppo di approcci diagnostici molecolari e antigenici basati sulle nuove conoscenze su NoV, in particolare, permetterà il miglioramento degli interventi sui casi di epidemia. Le nuove conoscenze sull'evoluzione di HEV permetteranno interventi sulla filiera del suino per limitare i rischi di trasmissione a operatori e consumatori.

### **Studio del ruolo del sistema immunitario sui meccanismi patogenetici delle infezioni dai batteri endocellulari facoltativi**

I fenomeni immunitari che si realizzano successivamente ad un'infezione sono all'origine sia di meccanismi patogenetici, sia di meccanismi protettivi messi in atto dall'organismo colpito. In tale ambito, il progetto si propone: i) di valutare il ruolo del sistema immunitario nei meccanismi che inducono la persistenza dei batteri endocellulari; ii) di valutare i meccanismi di virulenza di *Salmonella spp* e il ruolo del sistema immunitario nei meccanismi patogenetici dell'infezione.

Per ciò che attiene al punto i) è necessario caratterizzare la risposta immunitaria, individuando quei fattori coinvolti nella persistenza del germe. Le attività programmate nel triennio sono volte allo studio dei correlati di protezione negli animali da laboratorio e, per la salmonellosi, nel suino come specie di destinazione e come modello dell'infezione nell'uomo.

Per ciò che attiene al punto ii), si sono condotti alcuni studi volti a caratterizzare gli aspetti meccanicistici del ruolo dei geni che codificano l'enzima deputato all'utilizzo dello zinco (ZNua), nei meccanismi di virulenza di *Salmonella Typhimurium*. Tali studi hanno condotto a definire le procedure per un processo di attenuazione dei batteri del genere *Salmonella* che è stato oggetto di un brevetto internazionale. Al momento è in corso un articolato progetto per valutare la possibilità di utilizzare tali ceppi a scopo vaccinale.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Informazioni riguardanti:

- i correati di protezione per le salmonellosi;
- i meccanismi di cronicizzazione *Brucella* negli ospiti vertebrati.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenibili potranno servire per perfezionare le nostre conoscenze in merito agli effetti dei batteri endocellulari facoltativi in grado di indurre una malattia di tipo cronico (Brucellosi) o acuto, a carattere setticemico (Salmonellosi). Questi dati potranno essere utilizzati per definire protocolli di intervento volti ad una maggiore efficacia nel controllo dei patogeni.

In aggiunta, la comprensione del ruolo dei meccanismi di virulenza potrebbe fornire un interessante approccio per la valutazione di nuovi approcci vaccinali.

### **Studio dell'effetto degli acidi grassi poliinsaturi della serie n-3 (n-3 PUFA) nella prevenzione e cura delle malattie demielinizzanti mediante il modello animale di demielinizzazione indotta da cuprizonone**

L'azione preventiva degli n-3 nei riguardi delle malattie cardiovascolari è ormai ampiamente documentata con studi di diverso tipo. Più recentemente, osservazioni epidemiologiche e cliniche hanno messo in evidenza un legame tra bassi livelli di n-3 nella dieta e nel sangue e malattie neurodegenerative quali l'Alzheimer e il Parkinson, ma anche con malattie psichiatriche e comportamentali come la schizofrenia e la depressione. Da qui l'interesse crescente verso gli acidi grassi poliinsaturi (PUFA) della dieta o supplementari con la alimentazione che è esploso in questo ultimo periodo.

Scopo del presente progetto è:

- messa a punto di un modello animale di demielinizzazione del sistema nervoso centrale in ratti Wistar mediante intossicazione chimica con cuprizonone. Tale modello è stato già ben descritto in topi ma in ratti ci sono risultati discordanti. Poiché i nostri precedenti esperimenti sono stati effettuati su ratti, noi intendiamo riprodurlo in questa specie ma anche in topi per studiare le differenze;
- verificare l'efficacia di alcuni n-3 PUFA (EPA e DHA) nel prevenire o mitigare la demielinizzazione indotta da cuprizonone;
- verificare l'efficacia di alcuni n-3 PUFA (EPA e DHA) nella rimielinizzazione mediante inoculi intracerebrali delle sostanze;
- si tenterà di riprodurre eventuali risultati positivi mediante altre tecniche meno invasive come iniezioni intradermiche, gavaggio e nutrizione.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Da diversi anni il nostro gruppo si interessa all'effetto degli acidi grassi esogeni nello sviluppo dell'SNC utilizzando sia modelli *in vivo* che *in vitro*. I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'eicosapentaenoico (EPA 20:5 n-3) stimola la PLP (proteina caratteristica della mielina) e i successivi esperimenti *in vivo*, condotti durante lo sviluppo neonatale di ratti, hanno confermato l'importante ruolo dei PUFA n-3 nel processo di mielinogenesi. Con queste premesse ci aspettiamo che la somministrazione di PUFA e in particolare di EPA nel modello animale di demielizzazione indotta da cuprizonone possa mitigare la stessa demielinizzazione e/o favorire la successiva spontanea rimielinizzazione.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati del presente protocollo potrebbero indicare un uso terapeutico degli n-3 nelle malattie demielinizzanti, prima tra tutte la SM che per la sua alta incidenza nella popolazione e per la disabilità che arreca, è di notevole impatto sociale.

### **Studio delle criticità analitiche e preanalitiche nella determinazione dei parametri bromatologici per la valutazione della conformità di un prodotto alimentare**

Il progetto si pone l'obiettivo di valutare le criticità connesse all'analisi di parametri bromatologici nell'ambito della valutazione di conformità di un alimento considerando sia gli aspetti relativi al campionamento sia quelli propri della attività analitica in considerazione della diversificazione delle matrici alimentari sottoposte a controllo e della mancanza di riferimenti standardizzati per la valutazione di tali parametri.

In particolare saranno predisposte procedure metodologiche relative alle fasi di presa di saggio, estrazione, purificazione e determinazione strumentale.

Inoltre saranno organizzati circuiti interlaboratorio con i laboratori del controllo ufficiale coinvolti nel progetto per la valutazione dei metodi e il calcolo dell'incertezza di misura. I parametri considerati saranno indicatori di composizione, sostanze volontariamente aggiunte e costituenti naturali a ricaduta sanitaria.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- protocolli analitici concordati per le tipologie di analisi studiate;
- verifica della concordanza dei risultati ottenuti dai diversi laboratori;
- definizione di linee guida per l'espletamento delle attività di controllo ufficiale.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- diffusione delle linee guida predisposte nell'ambito dell'SSN;
- diffusione dei metodi di analisi alle reti dei laboratori ufficiali.

### **Studio, indagine epidemiologica e diagnosi di virus zoonotici emergenti e riemergenti tramite l'uso di sequenziatori di ultima generazione**

Negli ultimi anni il decisivo avanzamento nelle performance del sequenziamento di nuova generazione (*next generation sequencing*), detto anche “sequenziamento profondo” (*deep sequencing*), sta determinando un cambiamento rivoluzionario nell'approccio allo studio, alla diagnosi e alle indagini molecolari epidemiologiche delle malattie infettive. Tale tecnica ha le potenzialità di determinare la sequenza dell'intero genoma di organismi virali, batterici in pochi giorni grazie anche ad un importante lavoro bioinformatico.

Numerosi sono gli esempi dell'interconnessione che esiste fra patogeni animali e umani che hanno determinato il maggior interesse per i patogeni animali con potenziale zoonotico. Il cambiamento climatico, la modifica delle rotte migratorie, l'aumento degli scambi commerciali influiscono e modificano l'epidemiologia delle malattie infettive e diffuse che provengono anche da Paesi tropicali.

Con l'intento di utilizzare tale tecnica per la sorveglianza e la ricerca d'infezioni emergenti, si svilupperà tale approccio, per l'analisi del genoma di virus già oggetto di studio presso il Dipartimento. Tale tecnica sarà sviluppata con l'obiettivo di poterlo applicare all'indagine dei patogeni direttamente dal campione biologico, evitando la fase di replicazione in sistemi *in vitro* e *in vivo*, spesso non disponibile per alcuni agenti virali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Tale approccio sarà utilizzabile per l'identificazione, lo studio e il monitoraggio di virus già noti e con potenziale zoonotico e di cui è nota la capacità di trasmissione interspecifica (rotavirus, virus dell'epatite E, *virus HCV-like* e virus influenzali di tipo A circolanti nelle specie aviarie selvatiche e domestiche, nel suino e in diversi mammiferi) o di nuovi virus zoonotici, che possano presentarsi in Italia anche a seguito di crescenti flussi migratori da zone dove sono diffuse malattie non presenti in Europa.

Le informazioni sul genoma completo e sulle mutazioni di virus di interesse di sanità pubblica, rappresentano fonte di dati preziose per comprendere i meccanismi di evoluzione e mutazione virale e il ruolo di alcune proteine virali nell'interazione virus-cellula.

Potrà inoltre essere definito un sistema pilota di sorveglianza medico-veterinaria operante su parte del territorio nazionale, al fine di valutare la circolazione di agenti virali emergenti a carattere zoonosico anche attraverso lo studio di correlazioni genetiche e filogenetiche tra virus identificati negli animali e virus circolanti nella popolazione umana.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti verranno divulgati a livello nazionale e internazionale attraverso la produzione di report e di pubblicazioni scientifiche. I risultati di carattere applicativo saranno resi disponibili al Ministero della Salute e all'SSN ai fini del loro utilizzo per la prevenzione e il controllo delle malattie infettive.

### **Sviluppo di metodi innovativi per la rivelazione di allergeni alimentari emergenti e valutazione del loro impatto sulla salute del consumatore: un approccio integrato**

Studi recenti hanno evidenziato che il 2% della popolazione italiana adulta soffre di allergia alimentare e che la frutta a guscio è frequentemente responsabile di reazioni IgE mediate. Anche piccole quantità di allergene possono scatenare reazioni allergiche e il solo approccio possibile è quello di eliminare dalla dieta l'alimento scatenante. L'UE ha emanato una direttiva (2003/89/EC e successive modifiche) che stabilisce una lista di ingredienti con effetti allergenici per i quali è obbligatoria la dichiarazione in etichetta. Al momento attuale la legislazione non regola la presenza di allergeni in tracce, principalmente associata con fenomeni di *cross*-contaminazione, tuttavia all'industria alimentare è normalmente richiesto di applicare specifici protocolli allo scopo di minimizzare il problema. La possibile presenza di allergeni in tracce ha generato la necessità di disporre di metodi di rivelazione altamente sensibili in grado di identificare quantità minime di allergene in matrici complesse.

Gli scopi principali del progetto, attualmente sottoposto all'approvazione del Ministero della Salute, riguardano sia la caratterizzazione di nuovi allergeni emergenti (pistacchio e pinoli) valutando il rischio che rappresentano per i consumatori allergici, sia lo sviluppo e validazione di nuovi metodi ELISA, PCR e LC/MS per la loro rilevazione negli alimenti.

### **Risultati attesi nel triennio**

L'ISS è coinvolto nel progetto con una propria unità operativa la cui attività avrà come obiettivi:

- la valutazione dei metodi ELISA in grado di fornire una rivelazione affidabile e sensibile della presenza di pistacchio e pinoli in prodotti alimentari complessi;
- la validazione e il confronto dei risultati ottenibili con le diverse metodologie studiate (ELISA, PCR e LC/MS) mediante partecipazione a idonei circuiti interlaboratorio strutturati con gli altri partecipanti al progetto in funzione della tipologia di allergene e delle matrici alimentari scelte.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti nell'ambito del progetto potranno essere condivise con la comunità scientifica attraverso pubblicazioni scientifiche, seminari, comunicazioni a congressi. I protocolli, relativi alle diverse metodologie studiate, standardizzati e validati potranno essere messi a disposizione della rete che si occupa di controllo ufficiale (ISS e IZS), creando un network di laboratori in grado di operare in modo uniforme su tutto il territorio nazionale e con lo stesso livello di affidabilità.

Tali protocolli potranno essere utilizzati nell'ambito di uno studio di monitoraggio, al fine di individuare la prevalenza della contaminazione legata gli allergeni studiati in alimenti di origine sia animale che vegetale.

### **Sviluppo di metodi per l'individuazione di virus, in diverse matrici alimentari (Task 5:3 Virus detection),.**

Studio condotto nell'ambito del progetto AniBioThreat (*Bio-preparedness measures concerning prevention, detection and response to animal bio-terrorism threats*) – WP5.3: *Detection and diagnostics*.

I virus altamente patogeni sono considerati, per la loro capacità di diffondersi rapidamente all'interno di una popolazione e causare epidemie devastanti, strumenti idonei per il bioterrorismo. Molti di questi agenti patogeni sono responsabili di malattie zoonotiche la cui diffusione può causare gravi malattie in diverse specie ospite. Una proprietà interessante di molti virus è la loro resistenza e la capacità di mantenere la loro infettività in diverse condizioni. L'individuazione e l'identificazione dei virus è un compito piuttosto complesso, con particolare riguardo ai virus emergenti, con nuove caratteristiche genetiche finora "sconosciute" e ai virus geneticamente modificati impiegati a fini di bioterrorismo.

Al fine di ridurre il rischio d'uso di questi patogeni come armi biologiche, è importante sviluppare metodi capaci di rilevare e identificare i virus in modo rapido e accurato. Obiettivo del progetto sarà quello di sviluppare metodiche rapide e sensibili per l'individuazione e la tipizzazione di patogeni virali che possono essere utilizzati per la diffusione intenzionale. Questo includerà il miglioramento dei metodi di preparazione dei campioni per rilevare i virus noti e sconosciuti da diverse matrici alimentari in particolare nei prodotti vegetali. I processi pre-PCR saranno valutati utilizzando metodi di *real time PCR* al fine di aumentare l'efficienza di estrazione e purificazione. Diversi virus non patogeni saranno utilizzati come modelli.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Disponibilità e applicazione di metodi molecolari con elevata sensibilità per la ricerca di virus responsabili di tossinfezioni alimentari (HAV-Norovirus) e di virus non conosciuti presenti su diverse matrici alimentari.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Provvedere al miglioramento degli attuali metodi analitici per la ricerca di virus enterici nelle diverse matrici alimentari e fornire metodologie innovative per il rilevamento e l'identificazione di nuove varianti virali (virus non conosciuti). Le nuove metodologie e la ricerca di virus enterici potranno essere inseriti nella futura revisione del Regolamento 2073/2004/CE.

### **Sviluppo di modelli matematici per la stima dell'efficacia dei piani di selezione genetica per le EST degli ovini**

Il progetto approfondirà lo studio della diffusione delle EST degli ovini nella popolazioni ovina attraverso lo sviluppo di modelli matematici che permettono di valutare le tendenze epidemiologiche in relazione alle strategie di controllo adottate nella popolazione ovina. Il modello consentirà di valutare le diverse opzioni di intervento alla luce di fattori legati all'agente infettivo (ceppo di scrapie), alle caratteristiche di resistenza alla malattia della popolazione ospite (genotipi della PrP), al contesto epidemiologico (prevalenza della malattia) e alle risorse disponibili (fattibilità dell'intervento) permettendo di stimare la potenziale diffusione della malattia nel tempo. I modelli terranno conto delle specificità del sistema zootecnico italiano e delle caratteristiche degli agenti circolanti sul nostro territorio, utilizzando al meglio le conoscenze già disponibili presso il Dipartimento, su tali agenti infettivi. Queste verranno integrate con informazioni derivanti dalla sorveglianza dei piani di selezione genetica per la resistenza alla scrapie della popolazione ovina, dalla letteratura, nonché con eventuali ulteriori dati appositamente raccolti per lo sviluppo e validazione dei

modelli. L'implementazione dei modelli sarà attuata nell'ambito di un progetto quinquennale di intervento in provincia di Siena.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio:

- implementazione (sviluppo e validazione) di modelli predittivi per l'analisi della diffusione territoriale e intra-focolaio della scrapie nella popolazione ovina italiana;
- identificazione delle strategie di selezione efficaci per l'implementazione dei piani di selezione genetica degli ovini;
- identificazione degli obiettivi di compliance ai piani di selezione genetica;
- individuazione dei deficit informativi e delle aree ove indirizzare ulteriori studi.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Principali prodotti del progetto potranno essere utilizzati per orientare scelte di politica sanitaria. Questi includono l'individuazione di obiettivi e opzioni di intervento nei confronti delle EST, nonché di indicatori e aree di implementazione della sorveglianza.

La validazione dei modelli predittivi e la loro applicazione a diversi contesti territoriali consentirà di costruire dei trend di attesa (*baseline*) della diffusione degli agenti infettivi nella popolazione, per tempestiva individuazione di eventuali fenomeni anomali e inattesi che potrebbero sottendere la comparsa/introduzioni di nuovi ceppi e/o la modificazione di caratteristiche target della popolazione ospite e/o dei fattori ambientali. Ciò permetterebbe di incrementare l'efficacia degli attuali sistemi di sorveglianza / monitoraggio.

### **Tipizzazione molecolare dei ceppi di EST dei piccoli ruminanti**

Nonostante i prioni siano probabilmente di natura proteica, è ben documentata l'esistenza di diversi ceppi di prioni sia negli animali che nell'uomo. L'esistenza dei ceppi di prione rappresenta una sfida conoscitiva e implica che le informazioni specifiche di un ceppo siano in qualche modo contenute in una proteina dell'ospite, la proteina prionica patologica o PrP<sup>Sc</sup>. L'ipotesi prevalente è che tali informazioni siano codificate dalla conformazione della proteina prionica patologica, e che ogni ceppo sia caratterizzato da una specifica conformazione della PrP<sup>Sc</sup>. La BSE è l'unica EST nota per essere zoonosica. Tuttavia non è possibile escludere che la BSE circoli anche nelle popolazioni ovi-caprine europee. A tal fine la Comunità Europea ha implementato un vasto programma di sorveglianza basato su test discriminativi rapidi che sono in grado di discriminare le caratteristiche molecolari della BSE da quelle della maggior parte dei casi di scrapie ovi-caprina. Tuttavia, ad oggi non è possibile definire con esattezza la variabilità molecolare delle EST ovi-caprine e di conseguenza la sensibilità dei test discriminativi. Nel presente progetto verranno analizzati i casi di EST ovi-caprina italiani ed europei al fine di determinarne le caratteristiche molecolari tramite nuovi metodi molecolari sviluppati nel nostro laboratorio. Con gli stessi metodi molecolari, le caratteristiche dei ceppi di EST ovi-caprini verranno confrontati a quelli delle più comuni EST umane.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio:

- determinare l'eventuale presenza della BSE nella popolazione ovi-caprina italiana;
- confrontare le caratteristiche molecolari della PrP<sup>Sc</sup> che caratterizza diversi ceppi di EST;
- caratterizzare i ceppi di EST circolanti in Europa negli animali (ovi-caprini e bovini);
- caratterizzare i ceppi di EST dell'uomo;
- mettere a punto protocolli di tipizzazione molecolare capaci di discriminare i ceppi di EST.

### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- i risultati di carattere applicativo verranno resi disponibili al Ministero della Salute e all'SSN ai fini del loro utilizzo per la prevenzione e il controllo delle EST;
- i risultati ottenuti verranno divulgati a livello nazionale e internazionale attraverso la produzione di report e di pubblicazioni scientifiche;
- i protocolli diagnostici e i modelli animali sviluppati verranno messi a disposizione della comunità scientifica e della CE.

### **Tossine algali contaminanti acqua e prodotti ittici: studio e sviluppo di metodi innovativi di determinazione**

Negli ultimi anni, in seguito ai cambiamenti climatici e all'instaurarsi di particolari condizioni trofiche, si è assistito anche nei mari italiani all'incremento di fioriture algali associate a problemi sanitari. Diverse micro-alghe possono essere responsabili della produzione di tossine a cui l'uomo è esposto per inalazione di aerosol o mediante il consumo di prodotti ittici (molluschi, ricci, pesci) in cui esse si accumulano e causano sindromi a carico dell'apparato respiratorio, nervoso e gastrointestinale. Tali tossine, provocando morie di vertebrati e invertebrati marini, alterano l'ecosistema marino. Allo scopo di tutelare la salute pubblica risulta indispensabile lo studio e lo sviluppo di metodi di determinazione di tali tossine.

Attenzione verrà posta alle palitossine prodotte dall'alga bentonica *Ostreopsis* che agiscono sulla membrana cellulare alterando lo scambio di ioni.

Verranno sviluppate metodiche rapide e innovative: test della lattato deidrogenasi mediante un biosensore elettrochimico accoppiato ad un saggio di emolisi, test di citotossicità previa valutazione di differenti linee cellulari (Vero, Neuro 2a, MCF-7, Hela). Seguirà il confronto con il test di emolisi su eritrociti di pecora, con il saggio su topo e le metodiche chimiche disponibili.

Per la determinazione dell'acido okadaco, tossina diarroica prodotta da Dinoflagellate, verranno confrontati la sensibilità, la ripetitività e riproducibilità di tre kit immunoenzimatici in commercio.

### **Risultati attesi nel triennio**

La messa a punto di metodi di screening e di metodi analitici strumentali per la determinazione di tossine algali in relazione alla sempre più evidente necessità di superare alcuni dei limiti tecnici e temporali, nonché controversie di natura etica del metodo biologico su topo.

### **Trasferibilità dei risultati**

La diffusione di metodi innovativi per il rilevamento di tossine algali risulterà utile alle autorità preposte al controllo ufficiale a tutela della salute pubblica in base al Reg. CE 854/2004.

**Trattamento con cui ridurre la prevalenza/incidenza delle mastiti basato sull'impiego di una preparazione disinfettante a base di terpinen-4-olo da applicare dopo la mungitura per immersione del capezzolo (*postmilking teat dip*) e/o una preparazione intramammaria a base dello stesso terpene da applicare durante il periodo di asciutta (*dry-off*): valutazione della qualità di un formaggio DOP ottenuto a partire da latte proveniente dai quarti/lattifere trattate**

Verrà studiata l'efficacia di due formulazioni a base di terpinen-4-olo, rispettivamente un *dry off* e un *post milking* da utilizzare in allevamenti di vacche da latte per la prevenzione della mastite bovina. Verrà studiato l'effetto di questi trattamenti sul quadro microbiologico del siero innesto e della flora microbica presente nella materia prima e saranno valutati gli eventuali scostamenti dai dati di incidenza/prevalenza della mastite negli animali trattati rispetto ai controlli. Sarà altresì valutato l'aspetto sensoriale dei formaggi prodotti con latte raccolto dagli animali trattati.

**Risultati attesi nel triennio**

Saranno valutati:

- l'eventuale riduzione dei dati di incidenza/prevalenza dei casi di mastite nell'allevamento trattato; l'andamento del profilo microbiologico del sieroinnesto;
- l'attitudine alla caseificazione del latte raccolto dagli animali trattati;
- le caratteristiche sensoriali dei formaggi prodotti.

**Trasferibilità dei risultati**

Acquisizione di dati conoscitivi per l'utilizzo razionale dei formulati *dry off* e *post milking* a base di terpinen-4-olo con significativa riduzione del ricorso a trattamenti a base di antibiotici per prevenzione e/o trattamento delle mastiti. Definizione di protocolli per l'impiego vantaggioso negli allevamenti per la produzione di latte con vantaggio a cascata, anche negli impianti di trasformazione.

**Un modello di co-cultura bidimensionale intestinale per lo studio dei meccanismi patogenici della malattia celiaca (MC)**

La MC è un'enteropatia autoimmune scatenata dall'ingestione di glutine che, in soggetti geneticamente predisposti, determina un processo infiammatorio nell'intestino tenue. Essa è mediata dai linfociti T attivati a livello della lamina propria da peptidi della gliadina, che determinano il rilascio di citochine proinfiammatorie. Nonostante il ruolo centrale dell'immunità adattativa nella patogenesi della MC, recenti osservazioni suggeriscono che la risposta immunitaria innata sembra essere necessaria per favorire lo sviluppo di quella adattativa.

È stato osservato che la gliadina induce la produzione in PBMC provenienti da pazienti celiaci di citochine coinvolte nel *pathway* Th1/Th2/Th17. Scopo del progetto è osservare come le cellule epiteliali intestinali rispondano all'azione dei peptidi e come queste modulino la risposta immunitaria dei PBMC valutando il rilascio di citochine quali INF $\alpha$ , IL-23, IL-1 $\beta$ , e TNF $\alpha$  e IL-17, il-15 CCL20, IL-8, *Thymic stromal lymphopoietin* (TSLP). Verrà utilizzato un modello bidimensionale costituito da cellule epiteliali intestinali T84 coltivate su inserts e PBMC provenienti da pazienti celiaci, controlli e controlli DQ2+ nella parte basolaterale tale da mimare *in vitro* l'interfaccia tra la mucosa intestinale e la lamina propria subepiteliale, in seguito a trattamento con peptidi contenuti nella gliadina dell'immunità innata (p31-43), o di quella adattativa (P $\alpha$ 9) o la loro combinazione.

### **Risultati attesi nel triennio**

Nel presente progetto saranno analizzati i cambiamenti fisiopatologici precoci che sono alla base dello sviluppo della MC. Il p31-43, contenuto nella gliadina, identificato come peptide “tossico” può attivare meccanismi di difesa immunitaria innata, mentre il peptide 56-68, “immunogenico”, epitopo riconosciuto dai linfociti T, CD4+, DQ2 ristretti, attiva quella adattiva. Il bilancio delle citochine è un determinante cruciale di resistenza o suscettibilità nelle malattie autoimmuni. Sarà valutato il network citochinico del *pathway* Th1/Th2/Th17 che intercorre tra le cellule epiteliali e la popolazione ematica. Numerose evidenze suggeriscono che il peptide “tossico” attiva l’immunità innata attraverso l’aumentata produzione di IL-15, che sembra avere un ruolo nel cross-talk tra le cellule dell’immunità innata e adattiva, confermando che un stato infiammatorio precoce precede la risposta antigene-specifica delle cellule T. Lo studio di questa risposta precoce è un punto cruciale per meglio definire la patogenesi della MC.

### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto valuterà le iniziali modificazioni fisiopatologiche che contribuiscono allo sviluppo della MC e potrà essere d’aiuto per l’implementazione di strategie di prevenzione primaria della MC.

I risultati del progetto potranno avere un forte impatto non solo sulla MC, ma anche su altri disordini autoimmuni in cui è stato provato o ipotizzato un ruolo patogenetico di una funzione epiteliale intestinale alterata. Questo potrà favorire un nuovo approccio per strategie terapeutiche mirate ad affrontare il processo di tolleranza orale del glutine e di altri alimenti, aprendo la via a al trattamento delle malattie autoimmuni. L’inibizione del sistema immune innato può rappresentare una strategia terapeutica utile a controllare l’evoluzione della patologia MC.

## **Utilizzo della tecnologia RFId, per la sorveglianza e il mantenimento della rintracciabilità degli animali da laboratorio**

L’utilizzo di piccoli animali da laboratorio per lo studio del loro comportamento di gruppo è di fondamentale importanza in molti campi della ricerca biomedica; il successo dello studio dipende fortemente dalla capacità del ricercatore di identificare e di tenere sotto controllo, istante per istante, ciascun animale all’interno di una gabbia.

I roditori, soprattutto topi e ratti, sono gli animali i più frequentemente utilizzati in laboratorio per la ricerca biomedica, con particolare riferimento all’analisi del comportamento, in quanto sono specie animali che vivono in gruppo.

Riuscire a determinare, con la necessaria accuratezza, i luoghi frequentati e i percorsi effettuati da ciascun roditore, nell’ambito di un folto gruppo presente all’interno di una gabbia è estremamente importante per l’analisi del comportamento.

In letteratura sono documentati i tradizionali metodi di osservazione, i quali richiedono la presenza continua di ricercatori particolarmente addestrati, che sono in grado di distinguere più di 50 modelli di comportamento; un lavoro noioso e limitato dalla soggettività dovuta all’operatore.

Il progetto prevede una soluzione innovativa, basata sull’utilizzo della tecnologia emergente RFId, da tempo presente in applicazioni di tipo commerciale (automotive, antitaccheggio, *smart payment*, ecc.) e, sempre più diffusa nel settore biomedicale e ospedaliero.

### **Risultati attesi nel triennio**

Per mezzo della tecnologia RFId e di uno specifico sistema Hardware/Software sarà possibile riconoscere ogni singolo roditore all’interno di una colonia, monitorare e

visualizzare in forma grafica ogni suo movimento 24h/7 gg. Sarà inoltre possibile valutare in modo automatico, sulla base di specifiche preimpostate nel sistema, il comportamento di ciascun animale.

Nello specifico saranno svolte le attività e si otterranno i risultati di seguito riportati:

- progettazione e impianto di specifici Tag RFID biocompatibili e aventi caratteristiche geometriche tali da non compromettere lo stato di salute e benessere dell'animale;
- sviluppo di tecniche di impianto sottocutaneo tali da assicurare la permanenza e la stabilità del tag associato all'animale per tutta la durata dell'esperimento e tali da assicurare la salute e il benessere dell'animale;
- progettazione e sviluppo della "RFID smart cage", una gabbia in grado di contenere e monitorare fino a 50 piccoli roditori, avente lettori RFID e antenne integrate;
- progettazione e sviluppo di Hardware e Software dedicato per la rilevazione dei Tag impiantati e la memorizzazione dei dati relativi alla posizione di ciascun Tag all'interno della gabbia, per il riconoscimento di ciascun animale e la visualizzazione in forma grafica dei suoi movimenti. Il Software sarà in grado di individuare automaticamente particolari comportamenti del singolo animale, di interesse per la specifica sperimentazione.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La trasferibilità dei risultati previsti dal progetto, ai fini del miglioramento della qualità delle attività di ricerca, della sicurezza e del benessere animale è assicurata dall'utilizzo di tecnologie RFID, oramai consolidate in altri ambiti, di natura commerciale, e dall'adozione di protocolli standard per le applicazioni informatiche di supporto. Collaborazioni con l'Università del Salento e il Dipartimento del Farmaco.

La diffusione dei risultati prodotti sarà garantita mediante la pubblicazione di articoli su riviste internazionali, la partecipazione a meeting e workshop sul tema dell'analisi del comportamento degli animali e delle nuove tecnologie applicate al mondo animale.

Il sistema completo, trattandosi di una soluzione innovativa, è brevettabile.

#### **Valutazione del rischio correlato alla contaminazione del latte con *Clostridium botulinum* e altri clostridi neurotossigeni**

La valutazione del rischio microbiologico nel contesto della sicurezza alimentare è il moderno approccio che consente di determinare il rischio potenziale per la salute umana derivante da un pericolo microbiologico (microrganismo patogeno) in un determinato alimento. La presente ricerca intende focalizzare la valutazione del rischio di botulismo associato al latte e ai prodotti da esso derivati. Nel corso della mungitura il latte può contaminarsi con vari microrganismi: il livello della contaminazione dipende da numerosi fattori, di cui alcuni sono strettamente legati all'animale e al suo stato di salute, e altri legati alle condizioni d'igiene dell'ambiente in cui il latte viene raccolto. Tra i microrganismi che possono contaminarlo, le specie patogene dei clostridi, in particolare quelle in grado di produrre la tossina botulinica (*Clostridium botulinum* e più raramente altri clostridi neurotossigeni), richiedono particolare attenzione. In Italia sono stati riportati casi di botulismo alimentare dovuti all'ingestione di prodotti lattiero-caseari contaminati. I dati sulla prevalenza e sui livelli di contaminazione del latte crudo con *C. botulinum* e altri clostridi neurotossigeni sono tuttavia molto limitati, probabilmente anche a causa della mancanza di un metodo adatto alla rilevazione di bassi numeri di spore clostridiche in grandi volumi di latte: questo impedisce una corretta valutazione del rischio di botulismo correlato al latte e ai prodotti lattiero-caseari.

### **Risultati attesi nel triennio**

La corretta valutazione del rischio deve basarsi sull'identificazione e caratterizzazione del pericolo, sulla stima della gravità delle conseguenze del pericolo identificato, e sulla valutazione della probabilità di comparsa del pericolo, per poter poi procedere all'integrazione di queste fasi nella caratterizzazione finale del rischio. Lo scopo principale della presente ricerca è quello di implementare la valutazione del rischio di botulismo in relazione al latte crudo tal quale, e in quanto materia prima per la produzione di prodotti derivati. I risultati attesi comprendono:

- messa a punto di un protocollo idoneo per l'isolamento e la numerazione delle spore di *C. botulinum* e altri clostridi produttori di tossina botulinica nel latte crudo;
- monitoraggio dei livelli di contaminazione con clostridi neurotossigeni del latte crudo prelevato in Regioni diverse di Italia secondo un definito piano stagionale;
- individuazione delle cause di contaminazione, mediante analisi ambientali e dei foraggi e/o insilati utilizzati per l'alimentazione degli animali lattiferi;
- caratterizzazione fenotipica e genotipica dei ceppi di *C. botulinum* e altri clostridi neurotossigeni eventualmente isolati dai campioni;
- raccolta dei dati e loro utilizzazione all'interno dello schema classico di valutazione del rischio microbiologico.

### **Trasferibilità dei risultati**

Il completamento del progetto consentirà di definire le misure appropriate per il contenimento o l'eliminazione del rischio legato alla contaminazione del latte con *C. botulinum* e altri clostridi neurotossigeni. Tali misure saranno trasmesse alle autorità preposte alla gestione del rischio ai fini della stesura di linee guida per la realizzazione di piani d'intervento e prevenzione, destinate agli operatori del settore. L'iniziativa potrà così avere importanti ricadute sia sul piano produttivo che su quello economico.

### **Valutazione dell'attività antimicrobica di componenti di oli essenziali naturali nella prevenzione, controllo e terapia delle mastopatie negli ovini attraverso prove *in vitro* e trattamento di animali esposti sperimentalmente e infetti naturalmente**

Verrà studiata l'efficacia di due formulazioni a base di terpinen-4-olo, rispettivamente un *dry off* e un *post milking* da utilizzare in allevamenti di ovini.

L'efficacia profilattica del trattamento *post milking* a base di terpinen-4-olo in sostituzione dei comuni disinfettanti a base di cloro, iodio ecc. sarà valutata per somministrazione su un gruppo di animali sani esposti sperimentalmente al contagio. L'efficacia del trattamento *dry off* sarà valutata per somministrazione intramammaria su due gruppi di animali infetti (rispettivamente: naturalmente infetti e sperimentalmente infettati da un microrganismo antibiotico resistente). Verrà inoltre saggiata la sensibilità *in vitro* dei principali microrganismi responsabili di patologie mammarie negli ovini ad alcuni oli essenziali e/o loro componenti.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il trattamento di *post milking* e di *dry off* a base di terpine-4-olo dovrebbe portare alla riduzione della prevalenza/incidenza della mastite anche nella specie ovina migliorando qualità e quantità delle produzioni, con particolare riferimento alla riduzione delle cellule somatiche.

### **Trasferibilità dei risultati**

La sperimentazione del prodotto da utilizzare nella prevenzione delle mastiti come pratica di *dry off* e *post milking* sarà estesa ad un gruppo di allevamenti presenti nel territorio regionale con lo scopo di implementare qualità e quantità delle produzioni.

### **Valutazione dell'attività preventiva e terapeutica nei confronti della malattia celiaca di un decapeptide naturalmente presente in alcune varietà di cereali**

Uno strumento altamente innovativo per una terapia per la malattia celiaca alternativa alla dieta priva di glutine è quello di ricorrere a *small peptide* che sono naturalmente presenti nel grano e di conseguenza nella dieta della popolazione generale, ma non in quantità sufficienti per contrastare l'effetto dannoso delle sequenze tossiche del grano e che, invece, potrebbero rappresentare un meccanismo protettivo qualora aggiunti alla dieta in quantità arricchite. Quindi scopo del presente progetto sperimentale è quello produrre non un farmaco, ma un alimento che permetta ai soggetti celiaci e ai soggetti ad "alto rischio" di sviluppare MC, di consumare i cibi contenenti glutine, attraverso un corretto balance tra sequenze tossiche e sequenze protettive.

Recentemente abbiamo descritto uno *small peptide* QQPQRPPQPF (pRPQ). pRPQ corrisponde alla posizione 218-227 della  $\alpha$ -secalina codificata dalla sequenza depositata presso la banca dati NCBI con l'*accession number* FJ823444 che protegge alcuni modelli *in vitro* di MC nei confronti della tossicità della gliadina. Quindi scopo del progetto è valutare i meccanismi dell'attività protettiva di pRPQ in questi modelli.

### **Risultati attesi nel triennio**

Ci si attende di individuare su quali meccanismi immunitari patogenetici della MC il peptide pRPQ impatta e se è in grado di bloccare gli eventi infiammatori precoci indotti dalla gliadina, che iniziano la cascata infiammatoria che determina la distruzione e il riarrangiamento tissutale nella mucosa duodenale di celiaco. Inoltre si prevede di identificare le concentrazioni di pRPQ efficaci *in vivo* a contrastare gli effetti tossici dei peptidi derivati dalla digestione della gliadina. In questo ambito si prevedono due sono gli aspetti critici: i) la biodisponibilità del peptide protettivo all'interno del glutine che ne potrebbe sequestrare la maggior parte essendo una sostanza visco-elastica e ii) l'identificazione del rapporto terapeutico efficace tra pRPQ e peptidi tossici della gliadina. In particolare, questo aspetto risulta particolarmente critico, in considerazione del fatto che ancora non sono del tutto noti quanti i quali peptidi tossici derivano dalla digestione della gliadina.

### **Trasferibilità dei risultati**

La traslationalità della presente ricerca consiste nella possibilità di somministrare pRPQ come *food supplement* contemporaneamente al glutine al fine di permettere ai celiaci il consumo di cibi contenenti cereali nella dieta. Il peptide protettivo potrebbe essere somministrato individuando grani che già naturalmente già lo esprimono in quantità adeguata, oppure si potrebbe somministrare il peptide sintetizzato e aggiungendolo all'impasto del grano per i processi industriali, o infine, inserire la sequenza in un plasmide da inserire a loro volta all'interno di batteri usati nei procedimenti di lievitazione del pane.

### **Valutazione dell'influenza di alcuni elementi presenti nelle acque minerali naturali sull'intake totale giornaliero**

Le acque minerali sono una preziosa fonte di principi nutritivi, non solo per l'acqua, ma soprattutto per i sali in essa presenti. Le loro caratteristiche sono legate al ruolo che gli ioni inorganici in esse contenute svolgono e dipendono quindi dalla specifica composizione di ciascuna acqua. Avremo quindi acque con contenuto di sali elevato, medio e basso, con

contenuti di “macroelementi” (presenti nell’ordine del grammo) e “oligoelementi” (presenti nell’ordine del milligrammo). Molto importanti risultano le azioni degli elementi in tracce (oligoelementi) presenti nelle acque minerali, si ritiene che tali ioni agiscano come biocatalizzatori a livello cellulare favorendo con la loro presenza le attività enzimatiche delle cellule. Alcuni elementi non vengono normalmente riportati in etichetta in quanto sostanze non caratterizzanti l’acqua minerale. Scopo del presente lavoro sarà quello di valutare l’assunzione di alcuni elementi la cui entità è *border line* tra rischio e beneficio in particolare modo in fasce di popolazione per i quali un consumo eccessivo di tali acque potrebbe presentare un fattore di rischio (gozzo, fluorosi ecc.). I dati analitici di fluoro, bromo, iodio, cromo e alluminio, relativi ai contenuti nelle acque minerali naturali, verranno estrapolati dalle analisi ufficiali complete, che annualmente le aziende imbottigliatrici debbono presentare agli organi di controllo di competenza.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Saranno presi in esame alcuni ioni quali: fluoro, bromo, iodio, cromo e alluminio, costituenti delle acque minerali naturali presenti sul mercato nazionale, e verrà valutato il contributo dato dall’acqua minerale all’assunzione giornaliera totale di tali elementi rapportando il tutto al fabbisogno secondo i Livelli di Assunzione Raccomandati in Nutrienti (LARN). Prendendo come riferimento i livelli massimi tollerabili proposti dall’EFSA si valuterà se questi composti, ingeriti in quantità maggiore, potrebbero costituire un fattore di rischio per la salute di particolari fasce di popolazioni.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le informazioni derivanti dal progetto potranno essere condivise:

- con tutti i soggetti coinvolti nella ricerca e nell’utilizzo di nuove sorgenti di acque minerali;
- con gli organi di controllo per una più accurata valutazione degli *intake* di particolari elementi sensibili.

I risultati ottenuti potrebbero essere utili per una riformulazione dell’etichetta delle acque minerali, esplicitando possibili avvertenze d’uso.

### **Valutazione rischio/beneficio della presenza di elementi in traccia e loro specie chimiche nelle filiere alimentari**

Questa area di ricerca comprende una serie di attività, in parte finanziate, inerenti sia elementi in traccia essenziali (es. valutazione dalla valenza nutrizionale di alimenti arricchiti), sia elementi in traccia tossici, sia le interazioni chimiche fra questi e con altre componenti nella matrice alimentare che le interazioni biologiche nell’organismo. Nell’ottica della valutazione rischio/beneficio, questi studi si avvalgono di approcci di speciazione, di bioaccessibilità (modelli di digestione gastrointestinale simulata *in vitro*) e l’impiego di biomarcatori di status e di esposizione. Comprendono ricerche su elementi quali il selenio, il vanadio e lo iodio. Un’attività specifica è dedicata agli studi sull’ingresso di elementi in traccia nelle filiere alimentari a livello della produzione primaria.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Ottenimento di dati utili e trasferibili per la prevenzione degli effetti indesiderati legati alla carenza di elementi essenziali o all’eccesso di elementi (sia essenziali che non) e delle loro specie chimiche attraverso la dieta. Valutazione delle conoscenze acquisite nell’ottica della valutazione rischio/beneficio finalizzata a garantire il migliore stato di salute per l’uomo (EFSA).

### **Trasferibilità dei risultati**

Diretta al settore produttivo per quanto riguarda gli studi a livello della produzione primaria. In ambito ricerca & sviluppo e degli organismi preposti alla valutazione/gestione del rischio (a livello locale, nazionale, europeo) per gli altri filoni di ricerca.

### **Valutazione rischio-beneficio di contaminanti e nutrienti**

Studi sperimentali *in vitro* e *in vivo* sull'alimento *in toto* (miscela di nutrienti, sostanze bioattive e componenti indesiderate) e sulle interazioni contaminanti-nutrienti, con particolare riferimento ai fattori di rischio (es. interferenti endocrini) di specifico rilievo per le fasce vulnerabili.

Sviluppo della base di dati EDID (area tematica “interferenti endocrini”) e dell’area tematica PREVIENI sulla comunicazione del rischio.

Identificare e inquadrare gli aspetti legati sia al rischio che al beneficio connessi all’esposizione combinata sia a contaminanti che a sostanze bioattive negli alimenti, inserendoli nel quadro delle attività e delle direttive europee in materia di sicurezza alimentare.

Valutazione di criteri scientifici per definire specifiche priorità di prevenzione alimentare e di riduzione del rischio, con speciale attenzione alla valutazione dell'alimento *in toto* (*whole food*).

### **Risultati attesi nel triennio**

Messa a punto di modelli sperimentali e criteri scientifici per la valutazione dell'alimento *in toto* (*whole food*) e delle interazioni contaminanti nutrienti.

Individuare priorità di ricerca, punti critici e aspetti chiave nel processo di valutazione rischio-beneficio allo scopo di dare basi scientifiche ad interventi informativi e/o preventivi.

### **Trasferibilità dei risultati**

Basi scientifiche per la promozione della sicurezza in filiera alimentare e mangimistica e per il *decision making* nel campo della analisi del rischio tossicologico, con particolare rilievo per le fasce vulnerabili.

### **Sviluppo di modelli e conoscenze trasferibili alla valutazione/ gestione/ comunicazione riguardo ai fattori di rischio e ai potenziali fattori protettivi**

Virus enterici nei molluschi bivalvi: dinamiche di diffusione ed effetto dei trattamenti nella produzione post-primaria.

I virus enterici (NoV, HAV, HEV e altri emergenti) hanno assunto una crescente importanza come causa di malattie trasmesse dai molluschi bivalvi. Per ridurre il rischio legato al loro consumo i molluschi raccolti in aree di classe B devono essere sottoposti a processi di depurazione prima di essere immessi al commercio. Inoltre non è ancora chiaro se le dinamiche di diffusione di tali patogeni in ambito clinico e in ambito alimentare seguano percorsi diversi. Nel caso dei NoV, ad esempio, recenti dati epidemiologici hanno evidenziato che il genogruppo II (GII), in particolare il genotipo GII.4, sia il responsabile più frequente delle gastroenteriti nell'uomo, mentre il genogruppo I (GI) risulta essere raramente coinvolto, al contrario ricerche effettuate su campioni ambientali hanno rilevato una maggiore frequenza del GI. L'utilizzo della *real time* PCR per la determinazione di tali virus consentirà di valutare la loro prevalenza nelle aree di produzione e l'efficacia di diversi processi di depurazione su varie specie di bivalvi contaminati. I metodi molecolari, però, non rilevano la infettività del virus presente e quindi la pericolosità del prodotto, da ciò la necessità di valutare la correlazione tra livelli di RNA riscontrati e l'insorgenza della malattia. La collaborazione con ospedali e laboratori dell'SSN di alcune Regioni italiane

consentirà l'attivazione di piani di sorveglianza per il rilevamento di casi sporadici ed epidemici di gastroenteriti virali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- valutazione delle dinamiche di diffusione dei virus enterici in ambito clinico e nei molluschi bivalvi;
- standardizzazione delle condizioni chimico-fisiche (in termini di salinità, tempi e temperature) dei processi di depurazione per le diverse specie di molluschi bivalvi in relazione ai vari virus enterici;
- correlazione tra ceppi clinici circolanti e ceppi isolati dai molluschi;
- caratterizzazione dei ceppi virali coinvolti e correlazione tra titolo virale e sviluppo di malattia.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il collegamento di dati ottenuti in ambito clinico e alimentare consentirà di evidenziare alcune peculiarità dell'epidemiologia molecolare verificando se la diffusione dei virus enterici nei diversi ambiti segua dinamiche diverse. I dati quantitativi e la definizione del rapporto "dose virale (copie RNA/g) – malattia" serviranno a completare un processo di valutazione del rischio. Inoltre i dati ottenuti sulla prevalenza e l'efficacia dei processi di depurazione consentiranno la pianificazione di più efficaci strategie di controllo e sorveglianza per incrementare la sicurezza d'uso dei molluschi bivalvi

### **Virus respiratori con potenziale zoonosico**

Il genoma virale del virus influenzale H1N1pdm è il risultato di un quadruplo evento di riassortimento genetico, avvenuto nella specie suina nel corso dell'ultimo decennio, tra virus di origine aviaria, suina e umana. L'origine del virus pandemico sottolinea ancora una volta il ruolo chiave che alcune specie animali svolgono nell'ecologia dei virus influenzali. Studi filogenetici hanno anche dimostrato che il quadruplo riassortante H1N1pdm è circolato nel serbatoio animale per alcuni mesi, prima del passaggio all'uomo, dimostrando che l'assenza di un sistema di sorveglianza all'interfaccia animale/uomo, ha consentito la trasmissione del virus tra specie animali diverse e infine l'adattamento all'uomo. È quindi necessario intensificare le attività di ricerca e controllo al fine di interrompere la catena della trasmissione interspecie. Si propone quindi il seguente piano triennale, che completa progetti già finanziati e definisce nuove attività: i) indagini virologiche sulla circolazione in animali domestici e selvatici di virus trasmessi per via respiratoria. Verranno analizzati virus influenzali e virus di recente identificazione, quale il virus HCV-like, associato a forme respiratorie nel cane domestico; ii) indagini sierologiche in operatori a rischio di infezione con virus influenzali circolanti nelle popolazioni animali; iii) studio dei meccanismi di azione di *short interfering RNA* (siRNA), che rappresentano strumenti di gene *knockdown* con dimostrata attività antivirale *in vitro*.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Per lo studio proposto verrà utilizzata la recente tecnologia di sequenziamento *Ion Total Rna-Seq kit*, strumento di nuova generazione che fornisce un'alternativa veloce, facile da usare e economica rispetto ai tradizionali metodi per la mappatura del codice genetico. Il confronto con analoghi virus circolanti nella popolazione umana e la sorveglianza siero-epidemiologica in persone esposte al contatto con le popolazioni animali infette consentirà di determinare il potenziale zoonosico di tali infezioni virali e di definire a livello nazionale un protocollo operativo finalizzato alla prevenzione e

al controllo dei virus circolanti negli animali da compagnia nelle popolazioni umane esposte.

- Verrà valutata la risposta anticorpale in laboratori del settore avicolo e suinicolo e la durata della risposta immunitaria verso virus influenzali aviari.
- L'attività dei composti antivirali verrà identificata in nuovo sistema *in vitro*, il *minireplicon assay*, un saggio cellulare che permette di determinare l'effetto delle molecole sull'attività polimerasica di virus dell'influenza di tipo A e B. Verranno disegnati nuovi composti, in grado di inibire l'attività polimerasica virale con un valore di IC50 comparabile a quello di peptidi di controllo, anche ampliando il panel di virus influenzali utilizzati nelle prove.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il sequenziamento completo di virus influenzali isolati in specie animali diverse rappresenta una fonte di dati preziosi per comprendere i meccanismi di evoluzione e mutazione virale e il ruolo di alcune proteine virali nell'interazione virus-cellula. L'identificazione di una nuova classe di farmaci contro i virus influenzali rappresenta uno strumento indispensabile per contrastare la diffusione di virus influenzali pandemici nell'uomo. I risultati del progetto saranno oggetto di pubblicazioni scientifiche e saranno disponibili per le strutture afferenti all'SSN, per la predisposizione di piani di controllo di virus influenzali e di agenti virali emergenti e circolanti in animali domestici e selvatici. I risultati di carattere applicativo saranno resi disponibili al Ministero della Salute e all'SSN ai fini del loro utilizzo per la prevenzione e il controllo delle malattie infettive.



**Dipartimento**  
**Sanità pubblica veterinaria e sicurezza alimentare**

---

*Attività di controllo, valutazione, parere*



### **Attività di controllo per i prodotti diagnostici e vaccini utilizzati nelle profilassi di Stato per il controllo delle zoonosi batteriche (Brucellosi, Carbonchio ematico e Tubercolosi bovina)**

Il fine dell'attività è l'implementazione dei piani di controllo delle zoonosi batteriche (brucellosi, carbonchio e tubercolosi) che vede come soggetti coinvolti il Ministero della Salute, gli IZS e il Reparto di Profilassi e controllo delle zoonosi batteriche del Dipartimento di SPVSA.

L'attività si basa su norme comunitarie e nazionali che indicano l'ISS come ente di riferimento a livello europeo e nazionale specificatamente per il collaudo e la standardizzazione delle tecniche diagnostiche *in vivo* e *in vitro*, dei prodotti diagnostici unici nazionali e dei vaccini fabbricati dietro autorizzazione ministeriale dagli IZS, per l'attuazione delle profilassi di Stato.

#### **Attività programmata**

Nel triennio 2012-2014 verranno effettuate:

- Analisi di revisione delle sierodiagnosi per brucellosi per campioni di sieri animali o di uomo.
- Analisi di controllo dei vaccini utilizzati dal Ministero della Salute per campagne di profilassi di Stato o per campagne di emergenza.
- Analisi di controllo per la farmacovigilanza e/o farmacosorveglianza dei presidi immunizzanti di origine batterica, su richiesta ministeriale o di altra autorità sanitaria.
- Attività di consulenza tecnico-scientifica su richiesta del Ministero della Salute, Magistratura e Regioni.
- Attività di consulenza per l'UE, Farmacopea italiana ed europea, EMA, OMCL.
- Attività di intervento ispettivo presso gli IZS per produzione di vaccini stabulogeni di origine batterica il cui autocontrollo è sotto l'egida del Reparto Profilassi e controllo zoonosi batteriche (Decreto 17/3/1994 n. 287).
- Attività di intervento ispettivo delle officine farmaceutiche per quanto riguarda le produzioni di origine batterica per le profilassi di Stato.

### **Buona Pratica di Laboratorio; ispezioni; OECD; Centri di saggio**

Le attività ispettive hanno comportato peraltro il raccordo con quelle svolte dagli Stati membri dell'UE, nonché con i Paesi membri dell'OECD ai fini della necessaria armonizzazione a livello comunitario e internazionale e all'effettivo mutuo riconoscimento nella accettazione degli studi di sicurezza non clinici sulle sostanze chimiche. È stato infine avviato il programma per la maggiore interazione tra il sistema di qualità Buona Pratica di Laboratorio e il relativo riconoscimento di conformità e quello concernente la norma ISO/IEC17025 e il relativo accreditamento allo scopo di semplificare le pratiche ispettive riguardanti i Centri di saggio che si avvalgono di entrambi i sistemi.

#### **Attività programmata**

Anche per il triennio 2012-2014 continuerà l'attività di ispezione e di verifica delle procedure organizzative e delle condizioni con cui procedono i Centri di saggio al fine di promuovere la qualità della sperimentazione non clinica e la produzione di dati sperimentali di qualità.

### **Controlli analitici**

Il Dipartimento esegue controlli analitici su richiesta dell'Autorità giudiziaria o di altre amministrazioni dello Stato o delle Regioni o delle ASL in merito al controllo di parametri chimici, fisici, biologici inerenti la sicurezza di alimenti e mangimi.

#### **Attività programmata**

Anche nel triennio 2012-2014 continuerà l'attività di controllo analitico su richiesta specifica dell'Autorità giudiziaria o di altre amministrazioni dello Stato o delle Regioni o delle ASL.

### **Diagnosi e caratterizzazione di ceppi microbiologici isolati o da isolare**

Al Dipartimento SPVSA pervengono richieste da parte di laboratori del controllo ufficiale o da altre istituzioni di ricerca dell'SSN, di tipizzazione e caratterizzazione di ceppi patogeni sia in relazione a controlli ufficiali che ad episodi di tossinfezioni alimentari. Tale attività è codificata da una circolare ministeriale (n. 9/1996) per quel che concerne i casi di sospetto botulismo per i quali solo l'ISS dispone dell'esperienza e dei reagenti necessari.

In particolare, le indagini riguardano la *L. monocytogenes* da isolati clinici o da alimenti, i vibrieni patogeni generalmente isolati da prodotti della pesca, i clostridi neurotossigeni da campioni clinici o da alimenti, il bacillus cereus da alimenti, i virus enterici da alimenti, la yersinia enterocolitica. L'attività di laboratorio prevede la caratterizzazione mediante metodi tradizionali e di genetica molecolare e la valutazione della patogenicità. La conferma di laboratorio di casi sospetti di botulismo formulati su base clinica, consiste nella ricerca di tossine e spore di clostridi neurotossigeni in campioni biologici (siero, feci, contenuto gastrico, essudato da ferita) e, nel caso di botulismo alimentare, da residui alimentari consumati dai pazienti, nei giorni precedenti alla comparsa dei sintomi. A tale scopo, presso il Dipartimento sono state accreditate due metodiche analitiche: ricerca di clostridi produttori di tossine botuliniche e tossine botuliniche mediante metodo colturale e biotossicologico, e ricerca di clostridi produttori di tossine botuliniche mediante *multiplex real time* PCR.

#### **Attività programmata**

Il Dipartimento continuerà a far fronte alle richieste che perverranno dai laboratori del controllo ufficiale o da altre istituzioni di ricerca dell'SSN di tipizzazione e caratterizzazione di ceppi patogeni sia in relazione a controlli ufficiali che a episodi di tossinfezioni alimentari. Tale attività verrà condotta grazie all'esperienza e alle attrezzature di cui l'ISS dispone.

### **Dosaggio plasmatico dei very long chain fatty acids (VLCFA) per la diagnosi dell'adrenoleucodistrofia**

I VLCFA sono acidi grassi con più di 24 atomi di carbonio e rappresentano una piccolissima quota degli acidi grassi totali del plasma. L'aumentata concentrazione di VLCFA nel plasma è indicativa di un alterato metabolismo perossisomiale dal momento che i VLCFA sono degradati nei perossisomi e non nei mitocondri come la maggior parte degli acidi grassi. Il dosaggio dei VLCFA nel plasma è quindi indicato quando si sospetta una malattia perossisomiale in particolare l'adrenoleucodistrofia (ALD), la più frequente, caratterizzata da demielinizzazione del sistema nervoso centrale e da iposurrenalismo. Nell'ambito di una collaborazione scientifica nata nel 1992 con l'Ospedale pediatrico Bambino Gesù con la finalità di studiare i meccanismi patogenetici dell'ALD, ci si è occupati anche dell'aspetto diagnostico dal momento che l'aumento dei VLCFA nel plasma non è facilmente individuabile. Per superare la difficoltà di interpretazione dei risultati dovuta alla loro scarsa presenza nel plasma, è stato identificato un nuovo parametro

biochimico più affidabile basato sul rapporto tra due VLCFA non nel plasma *in toto* ma nella sfingomielinea che rappresenta la frazione lipidica caratterizzata da acidi grassi saturi e a lunga catena. Dal 1995 sono stati effettuati centinaia di dosaggi di VLCFA su richiesta di ASL, Cliniche universitarie e IRCCS per la diagnosi di adrenoleucodistrofia, per l'identificazione di portatori nelle famiglie di soggetti affetti e per il follow-up durante il trattamento.

**Attività programmata**

Tale attività continuerà anche nel triennio 2011-2014.

**Indagini conoscitive per presenza virus enterici in alimenti**

Vengono svolte molte indagini conoscitive, richieste da strutture periferiche o in occasione di episodi di malattie causate da virus enterici per verificare la presenza di Norovirus o HAV in prodotti alimentari.

**Attività programmata**

Il Dipartimento continuerà a svolgere le indagini conoscitive sopra descritte che necessitano di una particolare competenza da parte dei ricercatori e dei tecnici, per l'applicazione di tecniche innovative che, tra l'altro, richiedono l'utilizzazione di culture cellulari.

**Interrogazioni parlamentari**

Il Ministro della Salute è chiamato spesso a rispondere in sede parlamentare a quesiti su problemi di sanità pubblica veterinaria e sicurezza alimentare.

**Attività programmata**

Verrà proseguita l'attività di consulenza al Ministro nella predisposizione di risposte ad interrogazioni parlamentari sulle problematiche di competenza del Dipartimento.

**Ispezioni**

Partecipazione a visite ispettive per la:

- verifica ministeriale (Ministero della Salute) dei laboratori che effettuano analisi ai fini dell'autocontrollo alimentare;
- valutazione dei centri di saggio per prove sperimentali non cliniche secondo le BPL in base al DL.vo 120/1992;
- valutazione degli impianti di irraggiamento nei Paesi terzi;
- verifica dei laboratori degli IZS che svolgono controllo dei prodotti alimentari destinati all'esportazione verso gli USA (su incarico Ministero della Salute);
- sopralluoghi ispettivi presso Operatori del Settore Alimentare (OSA) su richiesta dell'Autorità competente e dei NAS.

**Attività programmata**

Verrà proseguita l'attività delle visite ispettive.

**Manuali di Buona Prassi Igienica**

L'obbligo previsto dalla normativa vigente di elaborare piani di autocontrollo consente alle imprese di potersi avvalere dei cosiddetti Manuali di Buona Prassi Igienica preparati dalle associazioni di categoria e sottoposti alla validazione del Ministero della Salute. Per quel che concerne gli aspetti tecnico-scientifici il Ministero si avvale della collaborazione dell'ISS e in particolare del Dipartimento SPVSA.

### **Attività programmata**

Tale attività è condotta da un gruppo di lavoro dipartimentale *ad hoc* che proseguirà nella valutazione delle documentazioni che perverranno dal Ministero.

### **Organizzazione di circuiti interlaboratorio per la validazione di metodi di analisi**

In qualità di Laboratorio Europeo di Riferimento:

- Laboratorio Europeo di Riferimento (EU-RL) per le infezioni da *Escherichia coli* e *Community Reference Laboratory (CRL) for E. Coli, including Verotoxigenic E. Coli (VTEC)*.
- EU-RL per elementi inorganici negli alimenti di origine animale.

In qualità di LNR per:

- LNR per le infezioni da *Escherichia coli* e CRL for *E. Coli, including Verotoxigenic E. Coli (VTEC)*;
- LNR per la caratterizzazione dei ceppi e la genetica delle EST degli animali;
- LNR per il controllo della Contaminazione virale dei molluschi bivalvi;
- LNR per il latte;
- LNR per gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA);
- LNR additivi nei mangimi;
- LNR sui residui negli alimenti di origine animale;
- Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo (CNRB);
- LNR metalli pesanti negli alimenti;
- LNR micotossine negli alimenti;
- LNR per elementi inorganici negli alimenti di origine animale.

Il Dipartimento SPVSA deve organizzare e/o partecipare ai circuiti interlaboratorio organizzati dai rispettivi CRL e altri Istituti internazionali mirati alla valutazione delle performance tecniche dei laboratori dell'SSN che effettuano il controllo ufficiale dei prodotti alimentari, nonché di nuovi metodi di riferimento comunitari.

Per tali attività oltre all'impegno di personale specializzato, vengono impegnati fondi per l'acquisto di materiale di riferimento e le spese di spedizione, oltre all'acquisto dell'aggiornamento dei software per l'elaborazione dei risultati.

### **Attività programmata**

Nell'ambito dei diversi Laboratori di Riferimento verranno proseguite le attività proprie di queste strutture (organizzazione di prove valutative per i laboratori del controllo ufficiale, assistenza ai laboratori di controllo territoriali, sviluppo di nuove procedure, preparazione materiali di riferimento, ecc.).

### **Pareri**

In qualità di organo tecnico dell'SSN, l'ISS svolge attività di consulenza per le autorità di controllo nazionali e le diverse amministrazioni e istituzioni in materia di sanità pubblica veterinaria e sicurezza alimentare e nutrizione. Tale attività richiede talvolta specifiche indagini di laboratorio. L'attività di consulenza si esprime attraverso relazioni e pareri con approccio tecnico-scientifico interdisciplinare.

### **Attività programmata**

Verrà proseguita l'attività di consulenza per le autorità di controllo nazionali e le diverse amministrazioni e istituzioni in materia di sanità pubblica veterinaria e sicurezza alimentare e nutrizione.

## **Partecipazione a gruppi di lavoro**

Al fine di garantire una elevata tutela della salute dei consumatori, la legislazione comunitaria si arricchisce continuamente di disposizioni con cui definire le più appropriate strategie di controllo e i criteri di conformità per le varie tipologie di prodotti alimentari. Anche a livello internazionale il problema della sicurezza alimentare è oggetto di considerazione da parte degli stati aderenti alla *World Trade Organization* (WTO) per armonizzare le regole e i criteri di valutazione. A questo scopo sia a livello comunitario che internazionale, questi ultimi prevalentemente sotto l'egida di comitati misti WHO/FAO, sono stati istituiti gruppi tecnici di lavoro con il preciso compito di elaborare norme tecniche e raccomandazioni da utilizzare ai fini della libera circolazione delle merci.

L'Italia, in quanto membro della WTO e dell'UE, opera in tali organismi attraverso esperti designati dalle amministrazioni specificatamente coinvolte. Per i problemi legati alla sicurezza alimentare e alla sanità pubblica veterinaria, il Ministero della Salute e quello delle Politiche Agricole, hanno demandato all'ISS il compito di rappresentare l'Italia in questi consessi internazionali.

Il presidente dell'ISS ha designato esperti di questo Dipartimento a partecipare all'attività dei gruppi di lavoro nazionali e internazionali sotto descritti:

- WHO/FAO Codex Alimentarius;
- OECD – Gruppi biotecnologie e sicurezza;
- CE – Gruppi tecnici in materia di sanità pubblica veterinaria, sicurezza alimentare e nutrizione;
- UE – Comitato Europeo di Normazione (CEN);
- UE – EFSA e *Focal Point*;
- UE – ENGL;
- EMA – Comitato medicinali veterinari.

Le problematiche della sanità pubblica veterinaria e della sicurezza alimentare sono oggetto di valutazione anche da parte di gruppi di lavoro e commissioni operanti presso il Ministero della Salute e il Ministero delle Politiche Agricole e Forestali.

### **Attività programmata**

Il Dipartimento continuerà ad assicurare con i propri esperti la partecipazione ai gruppi tecnici di lavoro istituiti a livello nazionale, comunitario e internazionale per tutti i problemi legati alla sicurezza alimentare, alla sanità pubblica veterinaria e alla nutrizione.

## **Programmi di valutazione esterna di qualità (VEQ) in medicina preventiva e sicurezza alimentare**

La partecipazione a programmi di VEQ è prescritta per legge ai servizi di medicina di laboratorio ed è richiesta dalle norme internazionali sulla competenza dei laboratori di prova e di taratura (ISO/IEC 17025), inclusi i laboratori clinici (ISO 15189, ISO 15195). Programmi nazionali di VEQ in medicina preventiva e sicurezza alimentare sono stati organizzati dall'ISS in maniera continuativa da oltre 20 anni (Progetto METOS) con lo scopo di promuovere la qualità delle misurazioni di indicatori biologici; perseguire l'aggiornamento continuo delle metodologie analitiche e organizzative per la VEQ; acquisire dati obiettivi sullo stato dell'arte delle misurazioni di indicatori biologici a livello nazionale e confrontarlo con analoghe iniziative a livello europeo e internazionale.

A livello europeo e, più recentemente, anche in Nord America, per l'armonizzazione delle metodologie organizzative e di valutazione dei laboratori e la definizione di traguardi analitici condivisi.

### **Attività programmata**

È prevista la prosecuzione delle attività dei programmi esistenti (cadmio e piombo nel sangue; alluminio e selenio nel siero; rame e zinco nel siero; elementi chimici nelle urine) con le modalità già stabilite. Le attività previste prenderanno in particolare in considerazione: la riferibilità dei valori assegnati a materiali per la VEQ per il rame e lo zinco nel siero; la qualità dei risultati ottenuti nella determinazione dell'alluminio nel siero; le problematiche associate con la stabilità del mercurio in campioni di urine umane, le metodologie per la definizioni di traguardi analitici nel settore. In aggiunta, è prevista la promozione, diffusione e formazione degli utenti finali di prove valutative sugli aspetti relativi alla norma in corso di approvazione ISO DIS 17043, che prescrive i requisiti per l'organizzazione di prove valutative. È previsto inoltre l'allineamento delle modalità operative dei programmi alle prescrizioni delle linee guida internazionali e della norma ISO DIS 17043.

### **Revisioni di analisi**

L'art. 1 della L 30/4/1962 n. 283 e successive modifiche affida all'ISS il compito di revisionare le analisi su prodotti alimentari, mangimi e matrici biologiche di animali produttori di alimenti per uomo, giudicate non conformi alla normativa vigente dai laboratori del controllo ufficiale. Si tratta di uno specifico diritto che la legge riconosce alle imprese in quanto in occasione dell'analisi di prima istanza non hanno potuto assistere all'esecuzione del controllo del proprio prodotto e quindi far valere le proprie obiezioni sulle modalità con cui tale attività viene svolta. Come si può capire si tratta di un lavoro, quello della revisione di analisi, di una grande delicatezza perché pone a confronto in maniera dialettica gli esperti dell'ISS con i tecnici delle imprese e naturalmente impone l'osservanza puntuale del protocollo analitico in condizioni ambientali appropriate; tale attività ha richiesto l'accreditamento del laboratorio (17025:2005) ai sensi del Regolamento 882/2004.

### **Attività programmata**

Il Dipartimento proseguirà l'attività di revisione di analisi affidata all'ISS in base alla L n. 283 del 30/4/1962 con l'esperienza e la professionalità di ricercatori e tecnici, e la disponibilità di attrezzature e materiali specifici estendendo, laddove necessario, l'accreditamento a nuove prove o gruppi di prove.

### **Ripetizioni di analisi**

Il Dipartimento SPVSA esegue ripetizioni di analisi su campioni alimentari di provenienza estera su richiesta degli organi periferici del Ministero della Salute preposti alla vigilanza (Posti di Ispezione Frontaliera – PIF, Uffici Veterinari per gli Adempimenti degli obblighi Comunitari – UVAC, Uffici di Sanità Marittima, aerea e di frontiera – USMA).

### **Attività programmata**

L'attività di ripetizione di analisi su campioni alimentari verrà proseguita da ricercatori e tecnici del Dipartimento.

### **Sistema di Assicurazione della Qualità**

Il Dipartimento è accreditato ai sensi della norma 17025:2005; tale accreditamento è garantito da un Sistema di Assicurazione della Qualità che prevede una continua verifica delle attività di prova svolte dal laboratorio e un continuo aggiornamento della organizzazione documentale. In particolare, oltre all'accreditamento per singola prova, il Dipartimento è accreditato per scopo flessibile nel settore microbiologico ed è in fase di

programmazione l'accreditamento flessibile per una serie di gruppi di prove nell'ambito chimico. È in corso l'adeguamento del sistema di qualità anche per la norma relativa alla organizzazione di prove valutative (circuiti interlaboratorio).

#### **Attività programmata**

La pianificazione delle attività relative all'SGQ per il triennio 2012-2014 prevede come obiettivo prioritario l'estensione dell'accreditamento con particolare riferimento a gruppi di prove effettuate nell'ambito del controllo ufficiale degli alimenti e dai Laboratori di Riferimento, nazionali e comunitari, così da ottemperare ai requisiti del Reg. CE 882/2004 (art. 12).

### **Sorveglianza e controllo delle infezioni da *Escherichia coli* O157 e altri *E. coli* enteroemorragici (EHEC)**

Le infezioni da *Verotoxigenic E. coli* (VTEC) costituiscono un grave problema di sanità pubblica e sono incluse dalla UE nella lista ad elevata priorità delle zoonosi da sorvegliare e controllare (Direttiva 2003/99 CE sulla sorveglianza e il controllo delle zoonosi). Il Dipartimento è impegnato da tempo in un'intensa attività di ricerca, sorveglianza e controllo su queste infezioni, sia in campo veterinario che medico, svolgendo un ruolo di riferimento tecnico-scientifico per le strutture dell'SSN (IZS, laboratori di microbiologia clinica, ARPA). Nel 2006, il Dipartimento è stato designato dal Ministero della Salute quale LNR per le infezioni da *E. coli* e dalla CE quale CRL for *E. coli*, including *Verotoxigenic E. coli* (VTEC).

#### **Attività programmata**

Le attività dei Laboratori di Riferimento continueranno nel triennio 2012-2014 e includeranno:

- il coordinamento delle attività degli LNR degli Stati membri della UE e, a livello nazionale, dei laboratori responsabili del controllo ufficiale degli alimenti;
- l'organizzazione di test analitici comparativi tra questi laboratori;
- il supporto tecnico-scientifico alla CE e al Ministero della Salute.

Il laboratorio svolgerà inoltre il ruolo di Laboratorio di Riferimento per le infezioni umane da VTEC nell'ambito del sistema di sorveglianza ENTER-NET Italia, effettuando la tipizzazione di stiptipi di *E. coli* e indagini diagnostiche su pazienti con sospetto di infezione da VTEC, in particolare casi di sindrome emolitico uremica. Queste attività consentiranno all'Italia di partecipare alle attività di sorveglianza previste dall'EDCD per le infezioni da VTEC.

### **Sorveglianza e profilassi delle EST animali**

Il laboratorio esercita la funzione di "LNR per la caratterizzazione dei ceppi e la genetica delle EST animali". In particolare, in base al Reg. (CE) 999/2001, l'LNR determina la sequenza del gene della proteina prionica (PrP) e analizza le caratteristiche molecolari del ceppo di agente ai fini della discriminazione tra scrapie e BSE in tutti i casi di EST ovi-caprina rilevati nell'ambito dell'attività di sorveglianza nazionale. Alla luce del timore che l'agente della BSE, attraverso le farine di carne contaminate, possa oggi circolare non riconosciuto nelle popolazioni ovine e carine europee, l'UE ha varato un ampio piano di sorveglianza sui ceppi delle malattie da prioni dei piccoli ruminanti. In particolare l'LNR è chiamato a determinare, attraverso metodiche di discriminazione molecolare della PrP patologica, se il ceppo in causa è assimilabile a scrapie o possa indirizzare verso un sospetto di BSE.

L'LRN svolge inoltre attività di consulenza in merito alle EST animali per il Ministero della Salute e le strutture dell'SSN, sviluppa metodiche di analisi del gene della PrP e di

caratterizzazione molecolare e biologica dei ceppi di prione, effettua *ring-trial* volti a verificare la concordanza dei risultati di analisi genetica prodotti dai laboratori della rete di sorveglianza nazionale, sviluppa modelli animali per lo studio delle malattie da prioni, esercita attività di consulenza per il Piano nazionale di selezione genetica per la resistenza degli ovini alle EST e partecipa all'attività di sorveglianza epidemiologica nazionale delle EST dei piccoli ruminanti. Personale del laboratorio fa parte del CRL-STEG (*Strain Typing Expert Group*), un gruppo di esperti internazionali stabilito presso il CRL (Weybridge, UK) su incarico della CE, chiamato ad analizzare tutti i casi *BSE-like* ovvero con caratteristiche "inusuali" di malattie da prioni. Personale del Laboratorio è inoltre chiamato in qualità di esperto in gruppi di lavoro nazionali e internazionali (EFSA).

Infine, il Laboratorio svolge analisi di revisione relativamente all'attività di controllo sull'impiego di farine animali in alimentazione zootecnica ai fini della profilassi della BSE.

#### **Attività programmata**

Nel corso del triennio 2012-2014 il Laboratorio continuerà a svolgere le funzioni di "LNR per la caratterizzazione dei ceppi e la genetica delle EST animali". Si stima che l'attività di controllo si aggirerà attorno ai 600-800 campioni da sottoporre ad analisi genetica e a caratterizzazione molecolare. L'eventuale riscontro di ceppi di EST indistinguibili dalla BSE *BSE-like* o con caratteristiche diverse da quelle usualmente osservate, verrà immediatamente riferito, attraverso l'autorità nazionale, all'UE e al CRL di Weybridge. Verranno riferiti anche i casi di scrapie riscontrati in soggetti portatori del genotipo della PrP (ARR/ARR) ritenuto essere resistente. Tali isolati, in base al Reg. (CE) 999/2001, verranno ulteriormente caratterizzati mediante prova biologica su roditori da laboratorio. L'LNR organizzerà annualmente il *ring-trial* per la verifica della concordanza dei risultati di analisi genetica prodotti dai laboratori partecipanti alla rete di sorveglianza nazionale delle EST. In base alle richieste che perverranno da parte di organismi nazionali (Ministero della Salute, Regioni, organi dell'SSN) e internazionali (CRL, EFSA, CE), l'LNR fornirà consulenza su problematiche di propria competenza. Proseguirà l'attività di revisione di analisi relativamente al controllo sull'impiego di farine animali in alimentazione zootecnica ai fini della profilassi della BSE.

### **Sorveglianza integratori alimentari e alimenti arricchiti**

In base a quanto stabilito dal DL.vo (21/5/2004 n. 169 art. 13) il Dipartimento SPVSA è coinvolto nel piano di vigilanza sugli integratori alimentari (es. probiotici, estratti vegetali, ecc.) al fine di stabilirne la conformità sia in termini di salubrità che di sicurezza e di corretta informazione ai consumatori.

#### **Attività programmata**

L'attività di vigilanza sugli integratori alimentari e sugli alimenti arricchiti verrà proseguita nel prossimo triennio.

### **Vigilanza alimenti irradiati**

In base al DL.vo 94/2001 che dispone che vengano effettuati annualmente controlli sui prodotti alimentari irradiati commercializzati in Italia, di concerto con il Ministero della Salute, il Dipartimento SPVSA partecipa a piani di vigilanza per evidenziare eventuali trattamenti non dichiarati in etichetta.

#### **Attività programmata**

L'attività di controllo sui prodotti alimentari irradiati commercializzati in Italia verrà proseguita dal Dipartimento partecipando attivamente ai piani di vigilanza di concerto con il Ministero della Salute.

**Dipartimento  
Tecnologie e salute**

---

**Attività di ricerca**



## **Algoritmi di elaborazione dei segnali e di bioinformatica per l'analisi dei meccanismi fisiopatologici**

Ad oggi, diversi approcci sono utilizzati per migliorare la comprensione dei meccanismi fisiopatologici alla base di aritmie cardiache e di altre patologie, e per ottimizzarne le terapie. L'approccio classico è basato sull'analisi di biopotenziali, ottenuti mediante diverse metodiche di mappaggio elettrofisiologico. Un approccio più moderno è invece basato sull'analisi della predisposizione genetica e delle basi molecolari della patologia.

L'attività di ricerca sarà orientata allo sviluppo di tecniche innovative di elaborazione di segnali al fine di ottenere nuove e affidabili informazioni sui meccanismi fisiopatologici di patologie come aritmie cardiache (fibrillazione atriale, ecc.). Particolare attenzione sarà dedicata alla valutazione del potere predittivo degli indici sviluppati. Saranno inoltre applicate metodiche di bioinformatica su dati di espressione genica che permettono di ottenere informazioni a livello delle dinamiche molecolari delle patologie.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il risultato principale riguarda la messa a punto di nuovi *biomarker* per diverse patologie (cardiache, cardiovascolari ecc.). I *biomarker* saranno estratti da segnali rilevabili mediante la strumentazione diagnostica comunemente utilizzata nella pratica clinica, risultando quindi di immediata applicazione clinica. I *biomarker* molecolari saranno ottenuti dall'analisi di dati di espressione genica di campioni biologici prelevati secondo opportuni protocolli clinici o accessibili sul web. Il risultato a lungo termine è la spinta verso la ricerca interdisciplinare per superare le limitazioni della ricerca classica basata sull'utilizzo di *biomarker* legati ai sintomi, che risultano eterogenei, ridondanti e poco trasferibili alla pratica clinica.

### **Trasferibilità dei risultati**

L'estrazione di *biomarker* di patologie è da considerarsi un sfida importante per la medicina traslazionale contemporanea, viste le potenziali applicazioni delle tecniche di elaborazione dei segnali e di bioinformatica nella pratica clinica. La determinazione di nuovi indicatori di predisposizione verso una patologia, oltre ad essere clinicamente importante può accelerare anche l'identificazione di geni responsabili, permettendo l'identificazione di gruppi di pazienti per ulteriori analisi genetiche. Inoltre l'attenta catalogazione dei *biomarker* molecolari è da considerarsi un prerequisito per lo sviluppo della medicina molecolare, nella quale dettagliate informazioni genetiche sono utilizzate per sviluppare regimi terapeutici personalizzati. L'approccio del progetto è di estrarre i *biomarker* da informazioni comunemente estratte nella pratica clinica, e di affidare l'estrazione delle caratteristiche discriminanti all'elaborazione automatica di tali informazioni.

## **Attività antivirale di peptidi derivati dalla lattoferrina**

È noto che l'uso inappropriato dei farmaci antivirali, in particolare antierpetici e antinfluenzali, ha portato un aumento dell'insorgenza di ceppi virali resistenti rendendo sempre più urgente la necessità dello sviluppo di nuove strategie. Nella ricerca di terapie antivirali alternative, molta attenzione è stata rivolta ai prodotti naturali e, tra questi, la lattoferrina (Lf). La Lf è una glicoproteina multifunzionale dell'immunità naturale, appartenente al gruppo delle transferrine, presente nelle secrezioni esocrine e nel latte materno. Negli ultimi anni gli studi su questa proteina hanno avuto un notevole incremento grazie alla disponibilità di grandi quantità di Lf estratta dal latte bovino (bLf) che ha permesso di scoprirne nuove funzioni particolarmente importanti nella cura delle patologie virali. La Lf è anche precursore di peptidi biologicamente attivi che, sintetizzati in base a una strategia immunitaria ampiamente utilizzata in natura e conservata durante l'evoluzione, sono dotati di attività antimicrobica e antivirale ed esercitano un ruolo modulatore nella

risposta immune innata. Queste caratteristiche, unite alla selettività, velocità d'azione e bassa frequenza di selezione di mutanti resistenti, rendono questi peptidi promettenti candidati per la terapia delle infezioni virali. Sulla base di quanto premesso, lo scopo di questo progetto è quello di analizzare l'effetto dei peptidi derivati dalla Lf sull'infezione da virus influenzale e da virus erpetici.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il presente progetto si propone di individuare e caratterizzare domini della lattoferrina bovina che, a concentrazioni fisiologiche, siano in grado di prevenire gli stadi precoci del processo infettivo virale e che quindi possano essere utilizzati per la messa a punto di interventi terapeutici mirati. Come modelli di infezione virale saranno utilizzati i virus dell'*Herpes Simplex* 1 e 2 e diversi ceppi di virus influenzale. La ricerca prevede: la digestione enzimatica della bLf, l'identificazione di frammenti di bLf dotati di attività antivirale, la determinazione del target virale e delle fasi del processo infettivo sensibili all'azione antivirale, l'analisi della composizione e della struttura dei frammenti attivi. In particolare saranno selezionati peptidi che agiscono su target diversi da quelli degli antivirali presenti in commercio. Attraverso la simulazione in silico dell'interazione tra peptidi attivi e target virale si otterranno indicazioni sugli elementi strutturali implicati nel legame tra peptide antivirale e proteina virale aprendo la strada alla progettazione razionale di piccole molecole mimetiche della bLf. Tali molecole verranno sintetizzate e analizzate per la loro attività antivirale.

I risultati di queste ricerche contribuiranno ad ampliare l'armamentario degli antivirali verso virus ampiamente diffusi nella popolazione quali il virus dell'Influenza e i virus dell'*Herpes Simplex* 1 e 2.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti porteranno alla disponibilità di peptidi e di piccole molecole mimetiche della bLf in grado di contrastare efficacemente l'infezione da virus influenzale e da virus erpetici. Nell'insieme questo studio potrà produrre informazioni importanti per possibili applicazioni terapeutiche di peptidi derivati dalla lattoferrina da soli o in combinazione tra essi o con altre sostanze ad azione antivirale nota, in malattie di rilevanza sanitaria quali l'influenza e l'infezione da Herpes virus. Si prevede, infatti, che l'uso di terapie basate sulla combinazione di antivirali, contrastando più efficacemente la moltiplicazione dei virus e la comparsa di resistenze, sarà la strategia futura per il trattamento di queste patologie.

### **Attività della lattoferrina bovina e dei peptidi da essa derivati sulla modulazione delle infezioni batteriche associate alle malattie infiammatorie intestinali (IBD)**

Le IBD (morbo di Crohn e colite ulcerosa) sono disordini infiammatori cronici dell'intestino. Il notevole incremento di queste patologie in età pediatrica e la scarsità di studi su questo tipo di popolazione, ci ha indotto a focalizzare la nostra ricerca sulle infezioni batteriche associate alle IBD pediatriche. I pazienti con IBD mostrano concentrazioni più elevate di batteri associati alla mucosa. In particolare, è stato proposto un potenziale ruolo per gli *E. coli* adesivi invasivi (*Adhesive Invasive Escherichia coli*, AIEC): gli AIEC aderiscono alle cellule intestinali e sopravvivono all'interno dei macrofagi. Inoltre, l'incrementata espressione, nei pazienti con IBD, di CEACAM6, il recettore usato dai batteri per aderire alle cellule intestinali, suggerisce che i batteri stessi possano promuovere la loro propria colonizzazione. Recentemente, il nostro gruppo di ricerca ha identificato nelle IBD pediatriche la presenza di due ceppi AIEC che inducevano alterazioni morfologiche dell'epitelio intestinale e una imponente risposta infiammatoria. Le proprietà antinfettive

della lattoferrina, una glicoproteina della famiglia delle transferrine, rendono questa proteina un ottimo candidato per ridurre l'infiammazione intestinale nei bambini affetti da IBD. Scopo della nostra ricerca è quindi quello di valutare l'attività antibatterica e immunomodulante della lattoferrina bovina e di peptidi da essa derivati su ceppi AIEC isolati da pazienti pediatrici con IBD e sulle biopsie.

#### **Risultati attesi nel triennio**

L'obiettivo principale di questo progetto sarà quello di verificare, attraverso una serie di esperimenti condotti *in vitro* ed *ex vivo*, la capacità della lattoferrina bovina e dei peptidi da essa derivati di ridurre i livelli di infiammazione in pazienti pediatrici affetti da morbo di Crohn e colite ulcerosa, interferendo con batteri potenzialmente patogeni. Più in dettaglio, saranno valutati, con approcci multidisciplinari (microbiologici, biochimici, molecolari e ultrastrutturali), gli effetti *in vitro* della lattoferrina bovina e dei peptidi da essa derivati relativamente alle proprietà patogene (adesione, invasione, traslocazione, sopravvivenza nei macrofagi, produzione di biofilm) di *E. coli* AIEC isolati da pazienti pediatrici affetti da Crohn o colite ulcerosa. Inoltre, sarà analizzata la modulazione della risposta infiammatoria da parte della lattoferrina bovina o dei peptidi da essa derivati in presenza o assenza di batteri.

Una fase iniziale del progetto prevederà l'analisi di campioni biotici di pazienti pediatrici con IBD allo scopo di isolare e identificare altre specie di *E. coli*, con le caratteristiche invasive e modulatorie sulla mucosa intestinale, da affiancare a quelle selezionate per lo studio precedente. L'incremento del numero di ceppi batterici in esame consentirà di disporre di un repertorio più ampio e quindi più rappresentativo della realtà.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Disponibilità di dati sulla eventuale azione antibatterica della lattoferrina bovina e/o dei peptidi da essa derivati su ceppi di *E. coli* AIEC isolati da pazienti pediatrici con IBD. Identificazione dei fattori di virulenza batterici sottoposti alla modulazione da parte di questi composti in rapporto all'adesione, all'invasione e alla traslocazione dei microrganismi su cellule epiteliali intestinali oltre che alla resistenza alla digestione da parte dei macrofagi. I dati eventualmente ottenuti potrebbero indirizzare verso la messa a punto di un prodotto contenente lattoferrina bovina o peptidi da essa derivati, da utilizzare nel trattamento delle IBD. La realizzazione di tale prodotto consentirebbe di disporre di una terapia, priva di effetti collaterali dannosi, da affiancare alla terapia convenzionale nel trattamento delle IBD, sia durante la fase acuta della malattia, che per allungare eventuali periodi di remissione.

### **Attività tecnico-scientifica di supporto all'autorità competente in materia di Dispositivi Medici (DM)**

Le direttive comunitarie europee sui DM, e il loro recepimento nell'ordinamento giuridico nazionale (DL.vo 46/97 e 507/92, come modificati dal DL.vo n. 37 del 2010) prevedono che l'autorità competente (Ministero della Salute) effettui attività di sorveglianza e vigilanza del mercato dei DM stessi, dopo la loro immissione in commercio, al fine di migliorare la garanzia di sicurezza dei dispositivi. Nasce quindi l'esigenza di un efficace supporto tecnico-scientifico al Ministero della Salute nel caso di incidenti causati da dispositivi medici, nonché di un'attività ispettiva ai fini del controllo delle aziende produttrici, mandatarie e distributrici di dispositivi medici, soprattutto quelli a più alta classe di rischio. Gli stessi riferimenti legislativi citati impongono la valutazione clinica dei dispositivi medici; infatti il mercato dei DM è caratterizzato da dispositivi che presentano tecnologie sempre più innovative, a fronte delle quali appare evidente la necessità di una

valutazione oggettiva dei rischi per un loro utilizzo sicuro ed efficace. Anche in questo settore nasce l'esigenza di un efficace supporto tecnico-scientifico al Ministero della Salute.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Relativamente alla sorveglianza e vigilanza del mercato dei DM, l'attività si tradurrà nella formazione del personale (in particolare, personale laureato con competenze nel settore dei dispositivi medici), e nel mantenimento della qualifica di ispettore, curandone l'aggiornamento.

Verranno eseguite ispezioni come in accordo con i programmi del Ministero e verranno redatti i relativi rapporti ispettivi, che verranno trasmessi dall'Istituto al Ministero della Salute.

Verrà mantenuto un registro relativo alle ispezioni compiute e agli ispettori che le hanno eseguite, con i dati fondamentali dei siti visitati e delle non conformità registrate.

Relativamente alla sperimentazione clinica su DM, l'attività si tradurrà, a valle della necessaria formazione del personale nel settore dei dispositivi medici e delle relative normative nazionali e internazionali, nella emissione di pareri tecnici in merito alla sicurezza dei dispositivi medici nell'ambito della sperimentazione clinica così come definita dall'art. 14 del DL.vo 46/97 e dall'art. 7 del DL.vo 507/92 come modificati dal DL.vo n. 37 del 2010.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'attività prevista si incentra sul monitoraggio e sulla valutazione preclinica dei DM, che costituiscono elementi fondamentali nella valutazione della sicurezza associata ai DM, con un conseguente beneficio sia per i pazienti che per gli operatori.

### **Basi radiobiologiche dell'adroterapia**

Le attuali conoscenze fisiche e radiobiologiche insieme allo sviluppo tecnologico hanno permesso di affiancare alla radioterapia convenzionale l'adroterapia con fasci di protoni e di ioni carbonio. Per il loro tipico modo di deporre energia (picco di Bragg), il trattamento con questi fasci permette di effettuare una radioterapia altamente conformata al letto tumorale, con una dose ai tessuti sani sensibilmente inferiore a quella erogata con le tecniche più avanzate di radioterapia convenzionale e con risparmio degli organi critici. Inoltre, in particolare nel caso di ioni carbonio, le caratteristiche radiobiologiche legate alle modalità dei rilasci energetici lungo la traccia fanno sì che questi fasci presentino anche il vantaggio di un aumento considerevole di efficacia biologica nell'inattivazione di cellule tumorali.

Obiettivo generale del progetto è migliorare le conoscenze radiobiologiche degli adroni approfondendo la comprensione dei loro meccanismi di azione a livello molecolare e cellulare. Per questi scopi si utilizzeranno essenzialmente sistemi cellulari *in vitro*. Tra questi si utilizzeranno in particolare cellule staminali tumorali, radioresistenti, ritenute responsabili dell'insorgenza di recidiva dopo il trattamento radioterapico. L'attività di ricerca prevede inoltre studi di radiobiologia rivolti alla caratterizzazione dei fasci terapeutici di protoni e ioni carbonio presso *facility* già operanti (Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica – CNAO, Laboratori Nazionali del Sud - Istituto Nazionale Fisica Nucleare LNS-INFN) e in fase di implementazione (Terapia Oncologica con Protoni, TOP-LINAC).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto verrà svolto in collaborazione con il Dipartimento di EOMM, l'Università di Pavia, il CNAO, L'ENEA e l'INFN (LNS), integrando in questo modo competenze fisiche, chimiche, biologiche e mediche.

Lo studio del ruolo della qualità della radiazione verrà effettuato mediante l'impiego di acceleratori di particelle agli LNS-INFN, Catania (protoni e ioni carbonio, energia <60 MeV/u) e/o presso *facility* di adroterapia (protoni e ioni carbonio come quelle del CNAO, Pavia (energia >60 MeV/u) e sorgenti gamma presenti presso l'ISS.

I risultati attesi riguardano:

- informazioni, ottenute attraverso un approccio integrato teorico e sperimentale, sui meccanismi alla base della risposta radiobiologica a radiazioni di diversa qualità di cellule staminali umane tumorali provenienti da pazienti con glioblastoma multiforme e in cellule derivanti da tessuto sano, tenendo in considerazione i dati clinici ove disponibili;
- dati radiobiologici utili alla caratterizzazione dei fasci terapeutici.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le conoscenze acquisite sui meccanismi di azione biologica degli adroni in cellule staminali e non, sia tumorali che derivanti da tessuti normali, potranno contribuire allo studio di nuovi approcci terapeutici più efficaci e allo sviluppo di piani clinici di trattamento più specifici con il fine di ottenere un effettivo beneficio terapeutico.

Il trasferimento dei risultati avverrà attraverso pubblicazioni scientifiche, relazioni a congressi e attraverso gli strumenti informatici dell'ISS.

#### **Biomateriali, dispositivi e tecniche in medicina rigenerativa: caratterizzazione microtomografica 3D, ultrastrutturale e biomeccanica**

In base agli accordi di collaborazione scientifica tra l'ISS e l'Università Cattolica del S. Cuore di Roma, l'Università di Roma Tor Vergata, l'Università di Trieste e la Facoltà di Ingegneria dell'Università di Roma Sapienza e dell'Accordo Quadro di collaborazione scientifica, tra ISS, Istituti Ortopedici Rizzoli, il Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche dell'Università Sapienza di Roma e il Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche dell'Università Tor Vergata di Roma, finalizzato allo sviluppo di ricerche scientifiche riguardante lo studio dei materiali e delle metodiche, sia *in vitro* sia *in vivo*, utilizzate e in fase di sviluppo, in medicina rigenerativa odontostomatologica e maxillo-facciale.

L'attività di ricerca proseguirà, rispettivamente, con:

- indagini sperimentali finalizzate al miglioramento della progettazione sia di strumenti sia di tecniche e materiali nel campo dell'endodonzia, dell'implantologia dentale, della biomeccanica del sistema tessuto-impianto e del tessuto osseo umano tramite analisi microCT in comparazione con metodiche tradizionali;
- attività di ricerca nel campo della biomeccanica e della morfologia 3D di materiali sostituiti ossei, di osso umano e dispositivi utilizzati in medicina rigenerativa.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi, nell'ambito delle collaborazioni elencate nella descrizione del progetto, rispettivamente ci permetteranno:

- di contribuire alla progettazione di strumenti, materiali e nuove tecniche meno traumatici nei confronti dei tessuti dentali, con indagini microCT 3D, condotte *in vitro* sulle lavorazioni canalari pre e post;
- di valutare la *Bone Implant Contact* (BIC), indagata, da circa due anni, su campioni *in vitro* e *in vivo* in animale, tramite la biomeccanica del sistema tessuto-impianto e la relativa struttura 3D, in comparazione con metodiche tradizionali quali l'istologia;
- di indagare, tramite tecnica microCT 3D, le potenzialità rigenerative di sostituiti ossei impiantati in umano ed elaborati dopo prelievo, con tecnica di carotaggio, per indirizzare il chirurgo alla scelta più idonea in base alla situazione patologica e anatomica;
- di approfondire la caratterizzazione strutturale e morfometrica 3D dell'osso umano anche in condizioni patologiche (es. l'osteoporosi) e di *scaffold* innovativi utilizzati in ingegneria dei tessuti a supporto di tecniche terapeutiche e riabilitative.

### **Trasferibilità dei risultati**

In base ai risultati prodotti sarà possibile supportare l'applicazione clinica ambulatoriale delle tecniche ricostruttive e rigenerative indagate *in vitro*.

Le continue indagini sulla produzione di *scaffold* di diversa natura e la comparazione tra metodiche innovative permette di ottenere conoscenze atte a informare il personale medico-chirurgo al fine del miglioramento dell'osteointegrazione di dispositivi impiantabili, usati anche in ambito ambulatoriale dell'SSN.

Nelle applicazioni protesiche, la ricerca continua del biomateriale ideale per l'ambiente orale da utilizzare nella pratica clinica, permette di aiutare il personale medico nella selezione dei materiali rendendo più affidabile la prestazione dell'SSN, producendo anche meno sprechi.

Lo studio del comportamento dell'osso umano e dei suoi sostituti fornirà, all'ingegneria tissutale, dati finalizzati a supportare le applicazioni cliniche dei chirurghi dell'SSN in medicina ricostruttiva e rigenerativa.

### **Biomeccanica e tecnologie riabilitative per la qualità della vita dei pazienti**

Il Reparto di Biomeccanica e tecnologie riabilitative, sia per ricerca scientifica che per controllo istituzionale, ha maturato esperienze di valutazione dei DM per il sistema cardiovascolare, l'apparato locomotore e gli ausili protesici per assistenza (es. acustici e motori), di telemetria e *health technology assessment*, dei servizi di riabilitazione e telemedicina.

Si intende promuovere l'integrazione delle competenze con altri Reparti di TES al fine di conseguire esperienze rilevanti per la qualità della vita dei pazienti (domiciliazione dei servizi, teleconsulto, teleassistenza e teleriabilitazione, soluzioni wireless e indossabili, comprese le modifiche organizzative-strategiche per un uso appropriato delle tecnologie informatiche e di comunicazione – *Information and Communication Technology*, ICT).

L'attività che si intende svolgere riguarderà in particolare i seguenti ambiti:

- sviluppo e accreditamento di laboratori sperimentali per la valutazione tecnologica di DM e innovazioni presso le istituzioni con le quali il Reparto già da anni collabora;
- ottimizzazione dei percorsi terapeutici e riabilitativi nelle patologie che coinvolgono le funzioni motorie, cognitive e cardiovascolari (valutazione di esito, *Health Technology Assessment* – HTA, per la telemedicina come alternativa ai sistemi tradizionali);
- sviluppo di DM innovativi basati sull'ingegneria tissutale e le nanotecnologie;
- validazione/certificazione delle soluzioni di ICT orientate all'assistenza e riabilitazione implementate a livello nazionale.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- valutazione dei rischi connessi con l'uso *on label* e *off label* di DM;
- soluzioni innovative di ingegneria tissutale e nanotecnologie orientate alla sostituzione protesica, in particolare cardiovascolare e come ausilio alla cardiologia interventistica;
- assetto e accreditamento di laboratori di prova per DM a supporto dell'autorità competente (fino ad ora sono disponibili valvole cardiache, stent, vasi protesici, anca, lenti, pompe cardiache, nebulizzatori);
- messa a punto di linee guida, percorsi di validazione/certificazione e rapporti di HTA nel caso di tecnologie sanitarie (es. per servizi innovativi di teleriabilitazione e servizi di teleassistenza);

- studi per la realizzazione di linee guida per l'ottimizzazione dei percorsi terapeutico-assistenziali (qualità delle prescrizioni ortesiche/protesiche, protesi acustiche, sistemi di ossigenazione e ventilazione polmonare);
- progetto e realizzazione di DM indossabili per il monitoraggio di parametri fisiologici, integrazione *Wide Area Network* (WAN) per il monitoraggio domiciliare (telemedicina e domotica);
- qualificazione dei parametri utilizzabili per la rilevazione della turbolenza associata a impianto cardiovascolare; sviluppo di controlli clinico/domiciliari efficaci;
- fluidodinamica sperimentale e in silico per la valutazione dei DM cardiovascolari e di procedure chirurgiche ricostruttive o terapie innovative con micropompe circolatorie;
- supporto della diagnostica RMN mediante modellistica biomeccanica e fluidodinamica.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Studio di modelli di circolazione a partire dalla RMN/TAC nei vari distretti corporei correlata con patologie neurocongenite e cardiovascolari.

Sarà curata la integrazione tra differenti unità e reparti, la disseminazione scientifica e formazione a supporto del ruolo istituzionale dell'ISS mediante redazione di report tecnici e linee guida per l'ottimizzazione del contributo terapeutico e riabilitativo delle tecnologie sanitarie.

Particolare attenzione sarà rivolta alle applicazioni di teleassistenza e teleriabilitazione, (modelli di continuità della cura) per il ruolo dell'ISS quale referente istituzionale e guida nazionale nel caso della disabilità e la cronicità.

Si promuoverà l'estensione delle ricerche alla qualità della vita dei pazienti a fronte di interventi terapeutici e riabilitativi con valutazione dell'impatto sociale delle tecnologie sanitarie.

Infine si stimoleranno nuove linee di certificazione di dispositivi e servizi (es. software Open Source).

#### **Caratterizzazione della corrosione di leghe e materiali utilizzati nei DM Innovativi**

L'attività di ricerca ha l'obiettivo di valutare le criticità di alcuni DM innovativi al fine di minimizzare i rischi connessi con il loro utilizzo: si studieranno dispositivi di ultima generazione che consentono il trattamento di alcune patologie, possibilmente non invasivo, con evidenti potenziali vantaggi sia in termini economici che di minore tempo di ospedalizzazione del paziente.

Un esempio importante di DM innovativo è dato dalle protesi endovascolari per il trattamento dell'aneurisma dell'aorta addominale (AAA), che causa più di 2.000 morti/anno in Italia.

Le protesi endovascolari per AAA combinano la tecnologia di uno stent con quella di una protesi vascolare.

Uno dei principali rischi associati con questi impianti è dato dall'inadeguatezza strutturale della protesi a varia distanza di tempo dall'impianto, dovuta ad esempio a fenomeni di corrosione (Heintz *et al. J Endovasc Ther* 2001;8:248-53).

La corrosione dei materiali per usi biomedici è un fenomeno complesso, dipendente da svariati fattori, fra i quali vanno ricordati il tipo di lega, i processi di lavorazione e soprattutto il grado di finitura superficiale. I fenomeni di corrosione verranno caratterizzati mediante una tecnica allo stato dell'arte, la polarizzazione ciclica potenziodinamica (polarizzazione diretta e inversa), nella quale il potenziale del campione sotto test è controllato e la corrente di corrosione viene misurata mediante un potenziostato.

### **Risultati attesi nel triennio**

La ricerca permetterà di studiare i fenomeni di corrosione associati alla struttura metallica (nitinolo o altre leghe) dei DM oggetto dello studio, a varia distanza di tempo dall'impianto. Presso l'ISS è già disponibile strumentazione innovativa, rispondente alle normative internazionali di riferimento, atta ad eseguire misure di corrosione su materiali metallici. Per ogni campione, verranno ottenute le curve potenziodinamiche (o curve di polarizzazione) associate. Queste curve riassumono la propensione alla corrosione di un dato materiale, in funzione dell'andamento della corrente misurata. Nella curva di polarizzazione di una generica lega è possibile distinguere tre zone: zona di attività, zona di passività e zona di transpassività. Queste curve consentono di calcolare il potenziale di *breakdown* (Eb), caratteristico dell'inizio della corrosione. Secondo quanto riportato nel documento della *National Association of Corrosion Engineers* (NACE), sono da considerarsi inaccettabili, alla luce dei potenziali in gioco *in vivo* (400 mV), i potenziali di *breakdown* intorno ai 300 mV. Come da normativa *American Society for Testing and Materials* (ASTM), saranno pertanto impostate condizioni sperimentali tali da rilevare valori di Eb di livello anche molto superiore a questo.

Si potrà quindi disporre di andamenti e parametri facilmente utilizzabili per la qualificazione della corrosione associata ai materiali costituenti i vari DM.

### **Trasferibilità dei risultati**

Disponibilità di strumenti di valutazione di materiali e leghe metalliche utilizzate per la realizzazione dei DM Innovativi, validati dal punto vista della corrosione. Tale caratterizzazione è importante per il mantenimento delle prestazioni biomeccaniche dei DM e per la loro biostabilità.

## **Dalla descrizione teorica dell'attività nervosa a livello di popolazione alla emulazione in dispositivi microelettronici neuromorfi accoppiati con il tessuto nervoso**

Collaborazioni con il Dipartimento di Fisiologia umana e farmacologia dell'Università di Roma Sapienza; Università Pompeu Fabra di Barcelona; Università di Magdeburg; Technion (Haifa); Politecnico di Torino; INFN; Istituto di Microelettronica e microsistemi del CNR (Roma).

L'attività si articolerà secondo le seguenti linee interdipendenti:

- Interpretazione dei segnali di popolazione nei processi di decisione motoria in aree premotorie e prefrontali di primati.
- Sviluppo di griglie di elettrodi sottili e conformabili per registrazione e stimolazione dell'attività nervosa corticale. Simulazione di stroke attraverso inattivazione farmacologica reversibile, e studio della stimolazione elettrica come promotore di recupero funzionale. (Progetto INFN GRECO, progetto ISS-USA BRUCOS).
- Completamento dello studio di un dispositivo microelettronico neuromorfo, interfacciato *in vivo* con una porzione del cervelletto di un roditore, che ne emula il funzionamento allo scopo di dimostrare la sostituibilità funzionale di una porzione lesa di tessuto cerebellare.
- Studio teorico e sperimentale di stimolazioni corticali di bassa intensità, dipendenti dallo stato di attività, per indirizzare la successiva elaborazione nervosa. Sviluppo teorico ed elettronico di una descrizione mesoscopica dell'attività di moduli neuronali. (Progetto EU CORONET).
- Analisi teorica della dinamica stocastica in paesaggi complessi di energia, in relazione all'attività spontanea di popolazioni neuronali (progetto INFN RM61).

### **Risultati attesi nel triennio**

Ricerca di base: l'integrazione tra le ricerche di cui ai punti 1), 4) e 5) speriamo permetterà un salto di qualità nella descrizione di dinamiche collettive complesse di popolazioni neuronali su scale multiple spaziali e temporali, e nella interpretazione unitaria di dati sperimentali da colture, slice e modelli *in vivo*.

Ricadute di interesse in sanità pubblica: l'attività di cui ai punti 2) e 3) hanno come prospettive a lungo termine lo sviluppo di tecniche di neuroriabilitazione post-stroke basate sulla stimolazione diretta del tessuto cerebrale.

### **Trasferibilità dei risultati**

Pubblicazioni scientifiche, formazione, prototipi pre-ingegnerizzati.

## **Dosimetria computazionale, calcolo avanzato e modellistica per applicazioni in fisica medica e per la stima dei rischi**

Le nuove tecnologie introdotte nella pratica clinica per il trattamento radioterapeutico dei tumori (es. le tecniche a modulazione di intensità del fascio terapeutico) hanno necessità di una corretta valutazione della dose rilasciata al paziente. Infatti l'introduzione di trattamenti radioterapeutici ad alto grado di conformazione sul bersaglio tumorale comporta in molti casi un aumento della dose al corpo intero e ad organi sani anche distanti dal bersaglio tumorale. Questo dato, documentato nella letteratura scientifica, ha contribuito ad un rinnovato interesse nello sviluppo di sistemi che forniscano una valutazione accurata della distribuzione di dose nei tessuti. Questo progetto di ricerca contribuisce a quest'area di ricerca sviluppando un sistema di valutazione della distribuzione della dose in organi sani, anche distanti dal bersaglio tumorale, basato sull'utilizzo di codici Monte Carlo. I codici Monte Carlo rappresentano la modalità più accurata per la valutazione del rilascio di dose, ma la necessità di risorse di calcolo considerevoli e la scarsa conoscenza delle caratteristiche fisiche degli acceleratori per uso medico ne hanno limitato l'uso. Per questo progetto verranno utilizzati codici per l'ottimizzazione fisico-matematica per i piani di cura in radioterapia già sviluppati da questo gruppo di ricerca dell'ISS. Infine saranno utilizzate le risorse di calcolo (*cluster* di computer) progettati e realizzati dal gruppo di ricerca proponente.

### **Risultati attesi nel triennio**

L'attività parte da una esperienza consolidata nel gruppo di lavoro di modellizzazione e simulazione di acceleratori lineari per applicazioni mediche e di sviluppo di fantocci dosimetrici matematici. Nel progetto verrà modellizzato con codice Monte Carlo un acceleratore per tomoterapia (*Hi-Art Helical TomoTherapy*) e messi a punto dei sistemi di verifica dosimetria dell'acceleratore che consentiranno di rendere più affidabili e veloci le operazioni di verifica della dose erogata in ambito clinico. La modellizzazione della macchina per terapia consentirà poi la simulazione della dose erogata durante i trattamenti radioterapici permettendo di valutare il rilascio di dose sia ad organi e tessuti sani sia al bersaglio tumorale. Il prodotto di questo lavoro consentirà la valutazione dell'ottenimento dei risultati clinici e della effettiva radioprotezione del paziente.

Questo progetto sarà in collaborazione con laboratori di Fisica sanitaria di strutture cliniche. In particolare la collaborazione è con l'Istituto Scientifico Romagnolo per lo Studio e la Cura dei Tumori (IRST), con l'IRCCS Regina Elena e l'Azienda Ospedaliera San Camillo-Forlanini di Roma e con l'Ospedale Santa Croce e Carlo di Cuneo. Per le attività legate all'uso di codice GEANT4 è in corso già da anni una collaborazione con l'INFN. Infine su questo tema è attiva una convenzione con ISS/Istituto Nazionale per l'Assicurazione contro gli Infortuni sul Lavoro (INAIL) – ex Istituto Superiore per la

Prevenzione e la Sicurezza del Lavoro (ISPESL) (“Calcolo avanzato e modellistica per applicazioni in campo sanitario e per la stima dei rischi” 2008-2012).

#### **Trasferibilità dei risultati**

Pubblicazioni scientifiche, partecipazione a convegni, formazione e informazione verso l’SSN sugli aspetti di calcolo avanzato per applicazioni cliniche

### **Dosimetria in radioterapia**

Obiettivo principale di questa attività di ricerca è lo sviluppo e la caratterizzazione di sistemi potenzialmente idonei per la dosimetria di tecniche di radioterapia altamente conformazionali quali *Intensity-Modulated Radiation Therapy* (IMRT), *Impact Therapy* (IMPT), Stereotassi, ecc., la cui introduzione ha posto problematiche nuove dal punto di vista dosimetrico alle quali i dosimetri usati tradizionalmente non sono in grado di rispondere pienamente. Il nostro interesse è rivolto prevalentemente ai sistemi a stato solido commerciali e non, tra i quali alanina, *tRNA-like domain* (TLD), diamanti naturali e sintetici, ecc.

Inoltre, la complessità delle distribuzioni di dose generate con queste tecniche 3DCRT unita alla possibilità di eseguire i trattamenti sia con acceleratori più convenzionali che con macchine dedicate rende di particolare importanza la verifica dell’uniformità nei trattamenti eseguiti in diversi centri di radioterapia. È quindi in programma la progettazione, realizzazione ed esecuzione di interconfronti dosimetrici, ristretta ad un numero limitato di Centri italiani che impiegano tecniche ad intensità modulata.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Individuazione delle condizioni e limiti di utilizzo dei sistemi dosimetrici per la dosimetria di base e clinica nell’IMRT.
- Determinazione delle proprietà dei sistemi dosimetrici investigati e loro caratterizzazione in fasci IMRT.
- Determinazione su scala nazionale del livello di accordo tra la dose dichiarata dal Centro di Radioterapia e la dose misurata con il sistema dosimetrico scelto in fasci ad intensità modulata. Valutazione delle azioni correttive in caso di superamento delle tolleranze.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati attesi sono di utilizzo presso i Centri di Radioterapia per una corretta dosimetria dei campi utilizzati nei trattamenti conformazionali.

Per gli interconfronti dosimetrici, il dato dosimetrico determinato per ciascun Centro di Radioterapia può venire usato dal Centro stesso per la definizione e applicazione di azioni correttive.

### **Dosimetria retrospettiva**

Obiettivo principale di questa attività, svolta nell’ambito di diversi progetti nazionali e internazionali (EU-SOLO; EU-MULTIBIODOSE; EU-RENEB; EURADOS), è lo sviluppo e l’applicazione di metodi di ricostruzione retrospettiva della dose assorbita di radiazioni ionizzanti in persone potenzialmente esposte a sorgenti di radiazione per cause accidentali o deliberate. Questi metodi sono ampiamente utilizzati: i) nella verifica di dati dosimetrici negli studi epidemiologici finalizzati all’analisi del rischio sanitario in seguito a esposizioni prolungate a basse dosi di radiazioni ionizzanti; ii) nella risposta di emergenza nelle esposizioni radiologiche non controllate, soprattutto nella fase di *triage*. Si intende utilizzare principalmente tecniche fisiche (risonanza paramagnetica elettronica, termoluminescenza,

luminescenza otticamente stimolata, microscopia elettronica, spettroscopia Raman e infrarosso).

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Verifica dei modelli dosimetrici utilizzati negli studi epidemiologici finalizzati all'analisi del rischio sanitario indotto dalle radiazioni ionizzanti nelle popolazioni dei territori dell'ex Unione Sovietica.
- Sviluppo di nuovi metodi e caratterizzazione di matrici, biologiche e non, da utilizzare come indicatori della dose in soggetti potenzialmente esposti.
- Organizzazione di interconfronti internazionali di dosimetria retrospettiva EPR/TL/OSL.
- Organizzazione di un esercizio di simulazione di un incidente radiologico e relativa ricostruzione della dose assorbita.

### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- I risultati ottenuti saranno trasferiti alla comunità scientifica attraverso pubblicazioni su rivista internazionale e comunicazioni a convegni.
- I risultati relativi alla validazione dei modelli dosimetrici saranno utilizzati, nell'ambito delle collaborazioni internazionali, negli studi di valutazione dei coefficienti di rischio alle basse dosi.
- I risultati degli interconfronti internazionali ci si aspetta che permettano una standardizzazione e uniformazione dei metodi di dosimetria retrospettiva con *Electron Paramagnetic Resonance* (EPR), termoluminescenza (TL) e *Optically Stimulated Luminescence* (OSL).
- I metodi sviluppati per la misura retrospettiva della dose individuale potranno essere utilizzati nella gestione delle emergenze radiologiche, sia a livello nazionale che europeo.
- L'esperienza acquisita sarà trasferita nell'elaborazione della norma ISO sui requisiti minimi per la dosimetria retrospettiva con EPR.

## **Effetti biologici di esposizioni a dosi basse e/o protratte di radiazioni ionizzanti: dai meccanismi di base all'impatto sulla salute pubblica**

Le problematiche sanitarie connesse all'esposizione a basse dosi di radiazioni ionizzanti hanno ormai assunto una notevole importanza in relazione ai più recenti sviluppi tecnologici. Le dosi alla popolazione legate alle procedure medico-diagnostiche hanno da tempo superato i livelli di dose derivanti dal fondo naturale. In radioterapia, lo sviluppo di tecniche sempre più sofisticate che consentono di somministrare al tumore alte dosi in maniera estremamente conformata, implicano un incremento del volume totale del corpo esposto a basse dosi con possibili effetti secondari, tra cui neoplasie radio indotte.

Anche in campo ambientale le problematiche connesse alla stima del rischio da esposizione a basse dosi sono estremamente rilevanti. Si pensi ad esempio alle esposizioni dei lavoratori e della popolazione che vive vicino ad impianti connessi al ciclo del combustibile nucleare, alle esposizioni ad alta radioattività naturale (es. il radon), alle esposizioni degli equipaggi durante i voli ad alta quota e le missioni spaziali.

Il Progetto è volto allo studio dei meccanismi alla base degli effetti sulla salute di basse dosi/bassi ratei di dose di radiazioni ionizzanti, e verrà effettuato utilizzando un approccio integrato sperimentale e teorico; saranno utilizzate radiazioni di diversa qualità (in

particolare fotoni e particelle alfa) somministrate con diverse sequenze di irradiazione e diversi dose-rate; si utilizzeranno principalmente sistemi cellulari *in vitro*.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto verrà svolto in collaborazione con altri Reparti del Dipartimento TES (Modelli di sistemi complessi e applicazioni alla stima dei rischi, Tecnologie fisiche in biomedicina, Metodi ultrastrutturali per terapie innovative anti-tumorali), con altri Dipartimenti dell'ISS (BCN, EOMM, AMPP, MIPI) e con l'INFN (LNS). Sono anche previste collaborazioni con IRCCS e Ospedali (Istituti Fisioterapici Ospitalieri - Istituto Regina Elena – IFO-IRE; IRST, Meldola; Policlinico Gemelli).

I risultati attesi riguardano la comprensione dei meccanismi alla base degli effetti biologici di dosi basse e/o protrate, con particolare riferimento: i) alla risposta biologica a diversi tipi di radiazione e per diversi effetti a livello molecolare e cellulare (es. alterazioni del metabolismo ossidativo, danno al DNA, morte cellulare, induzione di mutazioni letali, ecc.); ii) all'identificazione di *biomarker* di esposizione/effetto correlati alle diverse tipologie.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'attività si inserisce in uno sforzo internazionale mirato a risolvere le incertezze sulla stima del rischio associato ad esposizioni a dosi basse e/o protrate, cioè in condizioni che si verificano tipicamente negli ambienti di vita e di lavoro. La soluzione di questo problema ha importanti implicazioni sanitarie ed economiche nell'uso delle radiazioni sia in campo medico che industriale.

Le possibili ricadute riguardano due fondamentali aspetti: i) approfondire i meccanismi dell'azione biologica delle radiazioni ionizzanti che governano la risposta cellulare alle dosi basse e protrate, utili all'ottimizzazione di protocolli diagnostico/terapeutici; ii) ottenere informazioni più realistiche circa i fattori di peso della radiazione utilizzati in radioprotezione, in particolare per particelle cariche.

Il trasferimento dei risultati avverrà prevalentemente attraverso pubblicazioni scientifiche e relazioni a congressi scientifici, nonché mediante gli strumenti informatici dell'ISS.

### **Effetto dell'esposizione a nanoparticelle ingegnerizzate sulla suscettibilità a infezioni respiratorie di origine virale**

Gli studi sui potenziali effetti dannosi sulla salute umana dell'esposizione a nanoparticelle ingegnerizzate (NP) non hanno finora preso in considerazione l'eventualità che un individuo possa essere esposto alle NP contemporaneamente, successivamente o precedentemente al contatto con un agente virale. Il sistema respiratorio è tra i distretti corporei più esposti al contatto con le NP che inalate, possono raggiungere gli alveoli a causa delle loro dimensioni e interagire con le cellule epiteliali polmonari modificandone la risposta alle infezioni virali. Lo scopo di questo progetto è valutare l'effetto dell'esposizione a NP su un modello *in vitro* di infezione virale respiratoria. Come modello sperimentale verranno utilizzate diverse linee di cellule polmonari umane e virus umani causa frequente di infezione del tratto respiratorio. Come prototipo di NP ingegnerizzate verranno utilizzate particelle di diverse dimensioni costituite da metalli in quanto ampiamente utilizzate sia in prodotti commerciali che in ambito biomedico. Saranno seguite diverse strategie: i) le cellule verranno infettate prima dell'esposizione a varie concentrazioni di NP; ii) una miscela virus/NP verrà aggiunta sui monostrati sia direttamente sia previa incubazione; iii) le cellule saranno trattate con varie concentrazioni di NP e successivamente infettate. L'influenza dell'esposizione alle nanoparticelle sull'infezione virale sarà valutata analizzando i diversi aspetti e fasi dell'infezione virale.

### **Risultati attesi nel triennio**

Avvalendosi dei modelli sperimentali descritti, sarà possibile distinguere tra gli effetti provocati da un'esposizione precedente all'infezione e quelli dovuti a un'esposizione contemporanea o successiva all'infezione stessa. I risultati derivanti dal modello i) serviranno per valutare l'effetto di NP sul decorso di un'infezione virale già in atto, come nel caso di un soggetto infetto da un virus respiratorio in maniera anche lieve o asintomatica che viene a trovarsi esposto al contatto con NP per via inalatoria. Il modello ii) si riferisce al caso in cui un soggetto si trovasse a inalare contemporaneamente particelle virali e NP. I risultati di questi esperimenti serviranno a chiarire se la presenza di NP può influenzare (positivamente o negativamente) la fase di entrata del virus nelle cellule bersaglio. Inoltre l'incubazione della sospensione virale con le NP prima dell'aggiunta alle cellule, permetterà di valutare gli effetti di un'eventuale interazione fisica tra i due tipi di particelle (virali e ingegnerizzate). Infine, gli esperimenti eseguiti seguendo il modello iii) potranno contribuire a valutare l'effetto dell'esposizione a NP sulla suscettibilità a contrarre infezioni respiratorie. Questo aspetto diviene decisamente importante nei casi in cui l'esposizione è particolarmente elevata in termini di quantità o prolungata nel tempo come nel caso dei lavoratori coinvolti nella lavorazione industriale di NP.

### **Trasferibilità dei risultati**

Lo studio preventivo dei potenziali rischi di maggiore suscettibilità alle infezioni respiratorie largamente diffuse causate da virus in seguito a esposizione della popolazione a NP presenti in prodotti di uso quotidiano, si rivelerebbe di estrema utilità nell'assicurare il massimo grado di sicurezza a questa nanotecnologia emergente, consentendone la piena potenzialità.

Per una completa comprensione del potenziale impatto dell'uso di nanomateriali sulla salute, si rende necessario acquisire conoscenze, non solo sugli effetti che questi nuovi materiali esercitano direttamente sull'organismo umano, ma anche su eventuali azioni indirette che potrebbero risultare nell'aggravamento di patologie infettive.

Queste conoscenze porterebbero un importante contributo alla creazione di linee guida per la valutazione della sicurezza delle applicazioni di nanomateriali ingegnerizzati.

## **Esposizione al radon e altre sorgenti di radioattività: dalla valutazione dell'esposizione alla stima e prevenzione dei rischi sanitari connessi, incluso il coordinamento del Piano Nazionale Radon**

Le attività sono suddivise in:

- Valutazione dell'esposizione
  - conclusione studio quindicinale sulle variazioni temporali dei livelli di radon in abitazioni;
  - conclusione indagini nazionali, con Telecom-Italia, sul radon nel sottosuolo, in edifici lavorativi e in abitazioni, e su radiazione gamma all'aperto in ambienti urbani;
  - ulteriori indagini e altre attività sul radon *indoor* in diverse Regioni italiane, in particolare in Toscana, Lazio e Abruzzo;
  - sviluppo dell'Archivio Nazionale Radon con raccolta dati regionali;
  - collaborazione a indagini su radon in scuole e abitazioni della Serbia.
- Stima dei rischi
  - valutazione del rischio di tumore polmonare nelle Regioni italiane e nei Paesi europei;

- completamento analisi dati studi epidemiologici su tumore polmonare e leucemia infantile ed esposizione a radon e radiazione gamma;
- valutazione stato di salute dei Comuni italiani sedi di impianti nucleari, su richiesta del Ministero Salute.
- Prevenzione e riduzione dei rischi
  - prosecuzione coordinamento del Piano Nazionale Radon;
  - coordinamento analisi delle *policy* nel progetto UE *Radon Prevention and Remediation*.
- Tecniche di misura
  - sviluppo e valutazione di tecniche di misura attive e passive della concentrazione di radon e toron.

Collaborazioni con il CNESPS, AMPP, Dipartimento di Epidemiologia ASL RM E, ISPRA, Istituto Nazionale di Metrologia delle Radiazioni Ionizzanti – INMRI; ex-ISPEL, ARPA-Regioni; enti di radioprotezione dei Paesi UE.

Consulenze previste al Ministero della Salute, ARPA e Regioni, CE, WHO, *International Atomic Energy Agency* (IAEA).

### **Risultati attesi nel triennio**

- Valutazione dell'esposizione
  - determinazione variazioni temporali su 15 anni dei livelli di radon in abitazioni e valutazione implicazioni su stime di rischio e normative;
  - mappatura nazionale dei livelli di radon nel sottosuolo urbano, in edifici Telecom. Mappatura radiazione gamma *outdoor* in Italia. Mappatura dei livelli di radon nelle abitazioni di tutte le Province italiane;
  - sviluppo di metodi e dati sulla distribuzione territoriale del radon;
  - aggiornamento dei dati di esposizione al radon per tutte le Regioni italiane;
  - valutazione della concentrazione di radon nelle scuole e abitazioni della Serbia e loro correlazione.
- Stima dei rischi
  - stima dei casi attribuibili al radon, da solo e in sinergia col fumo di sigaretta, nelle Regioni italiane e nei Paesi europei;
  - stima rischio di tumore polmonare e leucemia infantile da esposizione a radiazione gamma nelle abitazioni;
  - valutazione dei tassi standardizzati di mortalità e incidenza per diverse patologie, incluso quelle correlate all'esposizione a radiazioni ionizzanti.
- Prevenzione e riduzione dei rischi
  - sito web sul radon; linee-guida e guide tecniche per la riduzione del radon negli edifici; predisposizione di normative;
  - armonizzazione delle strategie di prevenzione e riduzione dei rischi da radon nei Paesi UE.
- Tecniche di misura
  - valutazione *ageing* e *fading* rivelatori passivi di radon; sviluppo tecniche per elevate concentrazione di radon; sviluppo dispositivo per misura concentrazione di toron.

Le attività sono finanziate per la quasi totalità tramite fondi extra-murari (Ministero della Salute, CE, Regioni, Telecom-Italia).

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti saranno diffusi tramite pubblicazioni scientifiche, comunicazioni a convegni, rapporti di vario tipo, sito web ISS, e in casi particolari anche con note per le agenzie di stampa.

Inoltre essi verranno (o potranno essere) trasferiti in:

- piani nazionali e regionali di prevenzione;
- linee-guida e predisposizione di normative nel settore della radioprotezione;
- linee-guida e predisposizione di normative nel settore della protezione della popolazione e dei lavoratori dall'esposizione al radon;
- strumenti urbanistici (piani di coordinamento, piani regolatori, regolamenti edilizi);
- linee-guida nel settore delle tecniche di misura, incluso norme UNI.

### **HTA per Servizi di e-health**

Una delle attività del Reparto è la valutazione di efficacia di prodotti di telemedicina (TM); la teleriabilitazione (TR), una branca della TM, ha come scopo la riabilitazione psicomotoria di pazienti supervisionati da remoto.

Il Reparto è stato coinvolto in progetti europei di ricerca e sviluppo industriale in TR, finalizzati ad analizzare l'efficacia clinica e l'impatto economico/organizzativo di servizi di TR. In collaborazione con altri Reparti è stato sviluppato un modello per la valutazione, secondo le procedure dell'HTA, di servizi di TR; il modello consente la valutazione di tali servizi in termini di: i) outcome clinici, ii) aspetti economici e organizzativi, iii) modelli territoriali legati all'erogazione del servizio, iv) aspetti regolatori.

Nel triennio 2012-2014 si svolgeranno, sia a livello nazionale che europeo, le seguenti attività: i) valutazione di servizi di TR secondo il modello HTA sviluppato; ii) adattamento del modello di HTA per TR sviluppato a realtà applicative differenti quali ad esempio servizi di TM; iii) sviluppo di un nuovo modello HTA e nuovi strumenti per l'esecuzione di un *fast assessment* di servizi implementati; iv) diffusione e disseminazione dei metodi e delle metodologie HTA applicate alla TR. Si attiveranno o manterranno collaborazioni interne (intra e inter-Reparto, inter-dipartimentali) ed esterne (Agenzia nazionale per i servizi sanitari regionali, AGENAS).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Nel triennio considerato verranno portati a termine i progetti di ricerca precedentemente avviati i cui risultati sono una valutazione HTA di servizi di TR. Saranno inoltre interpellate alcune Regioni attive nel settore della TR per investigare possibili criticità nell'utilizzo del modello HTA sviluppato e saranno apportare le modifiche richieste. Verrà portato a termine lo studio relativo all'identificazione dell'iter certificativo, in base alle direttive europee sui DM, delle tecnologie che consentono l'implementazione di servizi di TR. Quest'ultimo punto sarà basato su una stretta collaborazione con i Reparti coinvolti in attività correlate.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La metodologia HTA sviluppata per la valutazione dell'impatto dei servizi implementati, verrà messa a disposizione delle Regioni e delle ASL coinvolte in programmi di TR.

I risultati ottenuti dalla valutazione di vari servizi, saranno catalogati, strutturati in modo da agevolare la fruizione da parte dei *Policy Maker*, sia in ambito nazionale che europeo, e opportunamente divulgati.

### **Impiego delle nanoparticelle nelle terapie antitumorali: contributi al miglioramento del *drug delivery* e dell'efficacia terapeutica, valutazione degli effetti citotossici in cellule normali e tumorali**

Lo sviluppo delle nanotecnologie per la diagnosi, il trattamento e il monitoraggio delle lesioni tumorali sta acquistando grande interesse sanitario. La scelta di *nanocarrier* quali micelle polimeriche, dendrimeri, nanoparticelle metalliche, liposomi, con alta efficienza

funzionale ma con effetti tossici ridotti, rappresenta uno degli importanti obiettivi della ricerca oncologica. Tra questi i liposomi cationici, le micro/nanobolle e micro/nanocapsule costituiscono una classe di *nanocarrier* potenzialmente utili per il miglioramento del *delivery* e dell'*uptake* dei farmaci nelle cellule tumorali.

In questo progetto di ricerca verranno quindi effettuati studi, *in vitro* e *in vivo*, sull'efficacia terapeutica di diversi tipi di liposomi cationici unilamellari (100 nm), opportunamente formulati con fosfolipidi naturali, in presenza e in assenza di tensioattivi, e contenenti sia farmaci di sintesi (Foscan®) che sostanze naturali quali la voacamina, l'aminossidasi di siero bovino e l'aloë.

Inoltre, si studierà la biocompatibilità, l'immunogenicità e l'efficienza di *delivery* di microsfele ottenute da lisozima denaturato che, in base al trattamento agli ultrasuoni ad alta intensità, permette di ottenere microbolle riempite d'aria (MB) o, in presenza di perfluoroesano, microcapsule riempite di olio (MC). Infine, saranno valutati in sistemi *in vitro* i danni indotti dalle nanoparticelle metalliche ZnO, TiO<sub>2</sub>, Au, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> a livello del DNA mitocondriale e del ciclo cellulare.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Disegno di nuovi sistemi di trasporto dei farmaci (liposomi e micro/nano bolle-capsule) caratterizzati da un punto di vista biofisico e ultrastrutturale e ingegnerizzati per la progettazione di sistemi di *drug delivery* sito-specifici; dati *in vitro* sull'assorbimento, distribuzione cellulare ed efficacia terapeutica; dati *in vivo* sulla tossicità e sull'efficienza terapeutica.
- Valutazione degli effetti benefici e/o avversi ottenuti mediante una serie di test appropriati eseguiti *in vitro* quali l'attivazione delle piastrine, l'interazione con le membrane dei globuli rossi, la produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Inoltre, verrà misurato il grado di rilascio delle citochine/chemochine dai linfociti e l'attivazione del complemento.
- Dati su alterazione della distribuzione di proteine precoci, quali la cardiolipina (CL), presente tra la membrana interna ed esterna del mitocondrio; valutazione della sintesi dei radicali liberi, stress ossidativo, induzione di infiammazione e genotossicità dei diversi tipi di nanomateriali su linee di fibroblasti umane normali e tumorali gastrointestinali. Tali dati saranno correlati con quelli provenienti dalla caratterizzazione chimico fisica delle nanoparticelle in termini di dimensioni, forma e composizione di superficie.

### **Trasferibilità dei risultati**

Lo sviluppo di tecnologie innovative basate sull'uso di nanoparticelle come carrier di farmaci in medicina terapeutica, preventiva e rigenerativa, richiede uno studio approfondito delle caratteristiche chimico-fisiche, nonché un'analisi dei processi fisiologici attivati dall'interazione della nanoparticella con i sistemi cellulari.

Nanoparticelle di ZnO, TiO<sub>2</sub>, Au, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> in formulazione con materiali polimerici, sono ampiamente utilizzate in diversi settori, quali cosmesi e diagnostica medica. Ossidi come la magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) sono utilizzati negli imballaggi per alimenti.

Vista l'importanza a livello sanitario, del ruolo del DNA mitocondriale nelle malattie degenerative, i risultati ottenuti consentiranno sia di valutare i potenziali effetti negativi associati alla preparazione di nanoparticelle ingegnerizzate e non, sia di valutare l'adeguatezza delle metodologie di preparazione. Infine, tali dati permetteranno di trasferire i risultati nelle prime fasi della ricerca clinica.

## **Individuazione di marcatori tumorali come bersaglio di nuove terapie antitumorali mediante metodi matematici, biofisici e ultrastrutturali**

L'impiego di sistemi 3D associati a *imaging* a risoluzione nanometrica ha assunto un ruolo fondamentale per lo studio di alcune caratteristiche acquisite dalle cellule tumorali nel corso della progressione neoplastica, quali la perdita di farmacosenibilità, la capacità di infiltrare i tessuti adiacenti e formare metastasi a distanza. Tali caratteristiche costituiscono gli ostacoli maggiormente incontrati nel corso della terapia antitumorale e, spesso, causa del suo fallimento. Nasce da ciò l'esigenza di acquisire sempre più conoscenze sui meccanismi regolanti l'insorgenza della farmacoresistenza, i processi di migrazione e invasione delle cellule tumorali e sulle correlazioni intercorrenti tra i due fenomeni. L'individuazione di nuovi bersagli farmacologici, infatti, rappresenta un prezioso contributo per la messa a punto di strategie terapeutiche intelligenti.

A tal fine nel corso del prossimo triennio ci si prefigge di:

- approfondire i meccanismi di migrazione e invasione di cellule tumorali sia con caratteristiche staminali che con fenotipo non staminale, in modelli tridimensionali quali mammosfere o neurosfere ottenute da pazienti affetti da carcinoma mammario e glioblastoma, rispettivamente;
- analizzare i diversi tipi di morte cellulare (necrosi, autofagia) indotta dal trattamento farmacologico, con particolare riferimento alla presenza di proteine citosoliche e nucleari quali *Damage-Associated Molecular Pattern* (DAMP) e *High Mobility Group Box* (HMGB1).

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati ottenuti permetteranno di:

- definire le caratteristiche genotipiche e fenotipiche associate ad un alto potenziale invasivo di cellule tumorali di diversa origine istologica con particolare riferimento a: espressione di marcatori di staminalità, farmacoresistenza, comportamenti migratori e invasivi, *pathway* di segnali intracellulari;
- valutare i tipi di morte cellulare (apoptosi, necrosi/o autofagia) e delle proteine DAMP e HMGB1 coinvolte nel meccanismo citotossico della terapia farmacologica;
- valutare la risposta immunitaria dopo stimolazione di morte cellulare nei fagociti professionali e nelle cellule dendritiche. DAMP e HMGB1 sono rilasciate dalle cellule in seguito al danno indotto dalla terapia farmacologica. L'anomala persistenza di tali proteine nell'infiammazione cronica e nel microambiente tumorale può favorire la carcinogenesi e la progressione del tumore riducendo l'efficacia dei chemioterapici.

### **Trasferibilità dei risultati**

Questo studio potrà contribuire a chiarire i meccanismi subcellulari e molecolari alla base del fenomeno della polifarmacoresistenza e delle caratteristiche di staminalità e invasività delle cellule tumorali. Nella pratica clinica i fenomeni della farmacoresistenza e della invasività possono essere strettamente correlati. L'individuazione delle proteine specifiche coinvolte permetterà la sperimentazione di nuove strategie terapeutiche che prevedono l'impiego di agenti in grado di inibire selettivamente la funzione dei bersagli molecolari individuati.

La caratterizzazione, la secrezione e l'individuazione dei *pathway* molecolari che portano alla produzione delle proteine DAMP in un tumore non responsivo, può portare ad uno studio mirato con l'obiettivo di migliorare la risposta e la stimolazione del sistema immunitario favorendo la remissione della malattia. I risultati di questa ricerca potranno fornire utili suggerimenti per l'ottimizzazione dei protocolli terapeutici.

## **Integrazione di metodi morfologici e funzionali nello studio delle patologie della retina**

Il progetto si iscrive in una consolidata e produttiva serie di studi che il Dipartimento TES svolge nel campo della visione. Nella fase attuale è emersa l'esigenza di disporre di sensibili indicatori della funzione retinica, particolarmente per il livello dei fotorecettori, per uso in trial clinici. Le patologie interessate sono la degenerazione maculare senile (AMD), la retinite pigmentosa (RP) e la distrofia di Stargardt (STD/FF), note come cause di cecità e ipovisione, con crescente prevalenza (AMD) e impatto sociale (RP, STD/FF).

Recentemente le tecniche di tomografia a coerenza ottica (OCT) riescono a produrre sezioni virtuali della retina da cui si ricavano informazioni precedentemente ottenibili solo dall'esame di preparati istologici. Con gli apparati più perfezionati è possibile riconoscere i differenti strati cellulari e misurarne con precisione le caratteristiche. Questi risultati, ancora non pienamente sviluppati, potranno essere migliorati con l'applicazione di tecniche di elaborazione delle immagini, e integrati con le valutazioni elettrofunkionali da tempo oggetto di studio nel Dipartimento. In particolare potranno essere applicati alcuni recenti risultati ottenuti nella registrazione dei potenziali stazionari da stimolazione *flicker* focale (FERG) o *pattern* (PERG). Con queste tecniche si può seguire il decorso anche degli stadi più avanzati delle patologie citate, ove precedentemente la risposta veniva considerata estinta.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto permetterà lo sviluppo di un sistema che integri le tecniche elettrofunkionali e di *imaging*, in modo da valutare morfologia, microanatomia e funzionalità retinica. Tale sistema costituisce una significativa innovazione nell'identificazione e monitoraggio delle patologie e nella valutazione delle terapie.

Le immagini OCT verranno elaborate numericamente per individuare gli strati retinici in cui sono presenti i fotorecettori e misurare i parametri indice della funzionalità retinica (spessore dello strato, livello di riflettività), con sviluppo e applicazione di algoritmi automatici o semi-automatici.

Per l'acquisizione del segnale ERG di basso livello (Falsini *et al.*, 2000) verrà sviluppata una piattaforma con funzionalità *Digital Signal Processing* (DSP) avanzate, che permetterà di testare varie configurazioni per l'acquisizione di segnali tempo stazionari e per l'estrazione di parametri mediante analisi di Fourier e medie sincrone.

Questi risultati verranno integrati e sottoposti a specifiche valutazioni statistiche, anche basate su misure del rumore (Fadda *et al.*, 2010), al fine di ottenere indicatori con il livello di affidabilità richiesto dalla ricerca.

Collaborazioni scientifiche esterne sono con il Dipartimento di Oftalmologia, Università Cattolica di Roma, con la *Bascom Palmer University*, Miami, FL.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati scientifici della ricerca verranno diffusi mediante pubblicazioni su riviste internazionali e comunicazioni a congressi. Saranno inoltre inclusi nei programmi di aggiornamento per oculisti che si svolgono a Roma presso l'Università Cattolica e la Fondazione Bietti.

La trasferibilità in campo clinico verrà sperimentata nell'ambito delle collaborazioni esterne previste dal progetto. Gli aspetti tecnologici, riguardanti lo sviluppo di programmi e strumenti ottici ed elettronici, potranno essere oggetto di specifiche collaborazioni, da attuarsi nelle forme atte a garantire i diritti di proprietà intellettuale dell'ISS e dei singoli ricercatori interessati.

### **Lavoratore con dispositivi medici impiantabili attivi in ambiente sanitario: rischi derivanti da campi elettromagnetici**

La sicurezza del lavoratore portatore di DM impiantabile attivo (DMIA) quale pacemaker, defibrillatore, ecc. non può prescindere da un'analisi dei rischi derivanti dalle possibili interazioni di questi dispositivi con l'ambiente elettromagnetico circostante. La letteratura mette in evidenza il rischio potenziale derivante da fenomeni di interferenze elettromagnetiche indotte dall'utilizzo di sistemi di trasmissione di tipo wireless (WiFi e RFID) e di strumentazione medica che utilizza campi elettromagnetici (CE) a fini diagnostici (risonanza magnetica) e terapeutici (marconiterapia, magnetoterapia). Inoltre la recente direttiva europea sulla protezione dei lavoratori da campi elettromagnetici (2004/40/CEE) demanda al datore di lavoro la responsabilità di condurre un'analisi dei rischi e puntualizza la specificità rappresentata dalla presenza di lavoratori portatori di DMIA richiedendo un'analisi dei rischi di tipo specifico. Infine il crescente aumento degli impianti e la diminuzione dell'età a cui si effettua l'impianto rende la problematica particolarmente importante per la tutela della salute. Il progetto prevede la messa a punto di simulatori di tronco antropomorfi e trasportabili equipaggiati con strumentazione idonea per il rilevamento di fenomeni di interferenza e per la misura dei CE. All'interno del simulatore verrà alloggiato il DMIA. I DMIA verranno selezionati in modo da ottenere un campione rappresentativo di quanto attualmente presente sul mercato.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto si prefigge di individuare e caratterizzare le sorgenti elettromagnetiche potenzialmente interferenti in ambiente sanitario, aggiornando le conoscenze sui rischi derivanti da tecnologie elettromagnetiche in uso e/o di prossima introduzione in tale ambiente; di individuarne i meccanismi e i parametri principali responsabili dei malfunzionamenti dei dispositivi medici impiantabili attivi in seguito ad interferenza elettromagnetica; di fornire una stima complessiva del rischio connesso alle normali mansioni lavorative in ambiente ospedaliero. In particolare i risultati attesi saranno:

- L'identificazione e la caratterizzazione delle tecnologie potenzialmente pericolose per i lavoratori portatori di dispositivo medico impiantabile attivo.
- La quantificazione e la valutazione dei rischi effettivi per il lavoratore portatore di dispositivo medico impiantabile attivo.
- Lo studio dei meccanismi di interferenza e l'identificazione delle variabili coinvolte (potenza di emissione, distanze di sicurezza, ecc.).
- L'individuazione di soluzioni per gestire e ridurre il rischio stesso.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I dati raccolti e le metodologie messe a punto consentiranno alle direzioni sanitarie e ai servizi di ingegneria clinica e di ICT delle strutture sanitarie di adottare le soluzioni più idonee per gestire il rischio per il lavoratore portatore di dispositivo medico impiantabile attivo. L'approccio metodologico utilizzato in questa attività e parte dei risultati sperimentali, potranno inoltre essere utilizzati per analizzare e gestire i rischi anche in altre realtà lavorative.

### **Metodi e modelli di analisi multivariata e multimodale per dati e segnali biofisiologici**

Il progetto prosegue una attività iniziata negli scorsi anni all'interno del Reparto Valutazione e qualità delle tecnologie biomediche con lo studio di algoritmi mirati alla applicazione di metodi di analisi multivariata a segnali fisiologici. Tecniche note dell'analisi multivariata sono, ad esempio, l'analisi della correlazione canonica, l'analisi fattoriale

(analisi delle componenti principali, analisi dei fattori principali), l'analisi delle corrispondenze, l'analisi dei *cluster* e l'analisi discriminante. Le esperienze in corso hanno prodotto una serie di studi incentrati sia sull'utilizzo della *Cluster analysis* come tecnica non supervisionata ed esplorativa su dati multivariati, provenienti tipicamente da registrazioni di dati biometrici in ambito clinico (analisi del movimento, analisi delle immagini), sia su di un approccio statistico volto alla determinazione di livelli ottimi di soglia del rapporto segnale/rumore.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Nei prossimi tre anni si intende stabilizzare le attività già in corso, estendendo l'applicazione delle tecniche sviluppate anche ad altre tipologie di segnali fisiologici (ERG – risposta elettrofisiologica a varie stimolazioni retiniche, potenziali evocati visivi, elaborazione delle immagini e flussi video) e, soprattutto, estendere e consolidare gli strumenti tecnici (algoritmi) sviluppati internamente per consentire la realizzazione di un database consolidato di metodi validati nell'elaborazione dei segnali basati su tecniche multivariate. Inoltre verrà estesa l'attività generalizzandola nella più ampia area della *Exploratory data analysis* (EDA); per EDA si intende un approccio allo studio di insiemi di dati, spesso multivariati, che impiega una serie di tecniche matematiche per:

- sviluppare ipotesi sulla struttura di un insieme di dati (se c'è, come è fatta);
- identificare variabili “importanti” dell'insieme di dati;
- identificare dati *borderline*, o “anomali”;
- verificare ipotesi costruite sui dati.

L'analisi dei segnali verrà estesa a modalità che integrino l'analisi dei segnali e delle immagini, utilizzando anche approcci di tipo multimodale (stimolazioni ottococinetiche).

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati del progetto saranno soggetti a diffusione scientifica con pubblicazioni su riviste internazionali e comunicazioni a congressi.

L'applicabilità in campo clinico sarà uno degli obiettivi primari della ricerca e sarà perseguita soprattutto per quegli ambiti di intervento già consolidati (analisi dei dati nel campo della *gait analysis* e analisi dei segnali in campo oftalmologico) e dove saranno disponibili collaborazioni esterne adatte e qualificate.

### **Metodi fisici per l'identificazione di alimenti irradiati**

L'attività relativa alla problematica degli alimenti irradiati, svolta in collaborazione con il dipartimento SPVSA è rivolta principalmente all'elaborazione e alla validazione di procedure operative per l'identificazione dell'irraggiamento e la valutazione della dose impartita. In particolare, nell'ambito di un progetto finanziato dal Ministero della Salute è prevista la validazione di metodi per lo screening di alimenti irradiati di origine vegetale: erbe essiccate, spezie e matrici di largo consumo. Verrà avviata, inoltre, l'attività di ricerca relativa ad un nuovo progetto, proposto nel corso del 2011 al Ministero della Salute; tale progetto prevede l'estensione dei metodi di screening e di conferma standardizzati a livello europeo a matrici vegetali complesse, quali integratori a base di erbe e loro ingredienti, per i quali i metodi non sono stati ancora validati attraverso interconfronti condotti a livello nazionale o internazionale.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Si prevede la stesura e la validazione interlaboratorio di protocolli operativi per l'identificazione degli alimenti irradiati e la ricostruzione della dose di trattamento applicabili a matrici alimentari varie, sia di origine animale che vegetale. Per quanto riguarda le matrici vegetali, attraverso la partecipazione a interconfronti a livello internazionale si

prevede di chiarire alcuni aspetti relativi all'applicazione dei metodi basati sulle tecniche di luminescenza a matrici con ridotta sensibilità alle radiazioni (ridotto contenuto di silicati) e di ottimizzare i protocolli preesistenti sulla base delle informazioni ottenute.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti e, in particolare, i protocolli validati, verranno proposti per l'applicazione nel controllo ufficiale. A questo scopo verranno organizzati eventi (workshop, corsi, ecc.), per la diffusione dei risultati ottenuti, rivolti soprattutto al personale in servizio presso gli enti locali incaricati del controllo ufficiale sugli alimenti.

### **Modellazione morfologica e meccanica per studi biomeccanici sperimentali e *in silico***

Varie patologie causano alterazioni morfologiche che hanno un profondo impatto a livello emodinamico e funzionale. Ad esempio, nel caso del sistema cardiovascolare la trasposizione delle grandi arterie (aorta e arterie polmonari) è una patologia congenita che porta a scarsa perfusione e ossigenazione del sangue già nelle prime fasi di vita, rendendo così necessario un intervento chirurgico per ricanalizzare la circolazione in maniera più vantaggiosa per il paziente. In campo cardochirurgico, per patologie di questo genere sono disponibili in letteratura numerose proposte di interventi correttivi, che sono spesso basate sull'intuizione e sull'esperienza del clinico, ma non sono adeguatamente convalidate da approfonditi studi *in vitro* e/o *in silico*. Il presente progetto di ricerca si propone di costruire modelli realistici di importanti patologie che implicano alterazioni morfologiche tramite immagini diagnostiche, con successiva ricostruzione con modello numerico degli aspetti geometrici rilevanti.

La disponibilità di modelli numerici di questo tipo renderà possibile la realizzazione di modelli otticamente trasparenti dei distretti anatomici di interesse, che renderanno possibili, fra l'altro, caratterizzazioni fluidodinamiche di connessioni chirurgiche tramite tecniche laser (Laser Doppler Anemometry – LDA, *Particle Image Velocimetry* – PIV).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Sfruttando la collaborazione già in corso fra il Reparto di Biomeccanica e tecnologie riabilitative e importanti centri clinici dell'area romana (es. Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, OPBG), si acquisiranno serie di immagini con Risonanza Magnetica per *Imaging* (MRI) di pazienti con alterazioni morfologiche dell'apparato cardiovascolare (es. coartazione aortica). Le immagini saranno sottoposte a varie elaborazioni software, fra cui la segmentazione, che permette di isolare il distretto vascolare di interesse dal resto dell'immagine. Successivamente, è possibile ricostruire il distretto vascolare in 3D, tramite appositi software di modellazione. Un primo obiettivo del progetto è quindi la realizzazione di un database di modelli 3D, che potrà servire come ingresso (dominio di calcolo) per studi di fluidodinamica computazionale. Un secondo obiettivo del progetto è la realizzazione di modelli *in vitro*, otticamente trasparenti, che saranno impiegati negli studi di fluidodinamica sperimentale in corso presso il Reparto. Più, in generale, l'acquisizione di know-how nel campo della modellazione numerica e fisica è uno strumento essenziale per studi biomeccanici orientati al paziente.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto parte dalla collaborazione già esistente da diverso tempo (20 anni) con alcune importanti realtà cliniche, come l'OPBG di Roma. L'acquisizione di immagini cliniche sarà corredata da uno scambio di informazioni con i partner in merito all'interpretazione della realtà clinica sottesa alle stesse. Un effetto di tale collaborazione sarà verosimilmente la pronta trasferibilità dei risultati ottenuti in ambito clinico. Un possibile esempio è il

trattamento chirurgico virtuale (a livello di modellistica numerica) di malformazioni dell'apparato cardiovascolare: un successivo studio fluidodinamico potrà confermare o meno la validità dell'intervento proposto rispetto a trattamenti chirurgici tradizionali, costituendo quindi un risultato di immediata trasferibilità per il paziente.

### **Modellizzazione della risposta adattativa indotta da radiazioni ionizzanti in colture cellulari**

La risposta dei sistemi biologici a basse dosi di radiazioni ionizzanti è divenuta oggetto, negli ultimi anni, di un'intensa attività di ricerca. Le implicazioni radioprotezionistiche sono evidenti e sempre più importanti, a causa anche del crescente uso diagnostico delle radiazioni. Il problema principale è costituito dalla complessità della risposta a basse dosi, che non è una semplice estrapolazione lineare della risposta a dosi più elevate. Tra i vari fenomeni che si riscontrano, tutti probabilmente legati fra loro a livello dei meccanismi di risposta, vi è quello della risposta adattativa: gli effetti dannosi di una certa dose su un sistema biologico possono essere attenuati da una piccola dose rilasciata nelle poche ore precedenti. I dati sperimentali mostrano che il valore di quest'ultima dose e del rateo con cui è somministrata devono rimanere in dati intervalli, affinché l'adattamento si manifesti.

In collaborazione con il Reparto di Biofisica delle radiazioni ionizzanti è stato costruito un modello cellulare che rappresenta, sulla base di ipotesi coerenti con le informazioni attualmente disponibili, i diversi meccanismi alla base della risposta a basse dosi. L'adattamento è causato principalmente dalla modulazione, da parte dell'irraggiamento con piccole dosi, della efficienza di riparo del danno al DNA. L'attività proposta prevede l'implementazione del modello, il suo graduale aggiornamento sulla base dei risultati ottenuti, e il confronto coi dati sperimentali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il modello è costituito da un sistema di equazioni differenziali non lineari che descrivono l'evoluzione temporale di un certo numero di variabili legate alla risposta cellulare *in vitro* alle radiazioni ionizzanti. Le equazioni vengono risolte attraverso la simulazione numerica. In particolare, oltre al danno indotto sul DNA, vengono considerati l'efficienza degli enzimi di riparo e il livello degli enzimi antiossidanti. Questi fattori possono essere a loro volta modulati dall'irraggiamento con la piccola dose iniziale, detta *priming*. Sulla base dei risultati incoraggianti ottenuti con l'implementazione del modello nella sua prima versione, che hanno determinato gli intervalli di dose *priming*, e del suo rateo di rilascio, in cui si verifica l'adattamento, si sta ora procedendo all'estensione del modello con l'introduzione della comunicazione intercellulare, che probabilmente, come in tutti i fenomeni a basse dosi, gioca un ruolo essenziale. Lo studio numerico del modello prevederà un'analisi sistematica dei risultati al variare delle modalità di rilascio della dose *priming*. Ci si aspetta che i risultati dipenderanno in maniera significativa, oltre che dal rateo con cui la dose *priming* viene rilasciata, anche dalla qualità della radiazione, opportunamente rappresentata nella struttura del modello. Con opportune modifiche, sarà possibile studiare anche gli effetti di irraggiamenti cronici, quali per esempio quelli dovuti al fondo naturale di radiazione.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'argomento è di rilevanza sia ai fini della conoscenza dei meccanismi alla base della risposta cellulare alle radiazioni ionizzanti, sia a fini radioprotezionistici, come testimoniato anche dai recenti progetti Europei dedicati espressamente a tale argomento. I risultati ottenuti, oltre alla trasferibilità alla comunità scientifica attraverso pubblicazioni, avranno rilevanza anche nell'ambito del network europeo, costruito espressamente per lo studio degli effetti delle basse dosi, di cui il nostro Dipartimento fa parte.

## Radioattività ambientale artificiale e naturale modificata dalle attività umane

Tre sono gli ambiti di studio sulla tematica:

- Dopo l'incidente alla centrale nucleare di Chernobyl l'ISS ha sviluppato un'attività di ricerca sulle conseguenze della contaminazione ambientale, in particolare per embrione, feto e bambino allattato al seno. L'attività ha sempre avuto un aspetto sperimentale e uno più strettamente radioprotezionistico e di calcolo. In questo settore continua la collaborazione con il *Federal Office for Radiation Protection* (BfS) per lo studio della biocinetica di  $^{137}\text{Cs}$  in madri in allattamento, facendo uso dei dati di contaminazione del latte materno e delle urine misurati, negli anni successivi all'incidente in donne italiane.
- Tra i problemi di salute pubblica derivanti dalla radioattività ambientale sono considerate attualmente importanti le esposizioni dei lavoratori e della popolazione a *Naturally Occurring Radioactive Material* (NORM), materiali di origine naturale che, per le lavorazioni a cui sono sottoposti, concentrano il loro contenuto di radionuclidi naturali. Il progetto prevede lo studio dei materiali da costruzione e delle discariche di fosfogessi, sottoprodotto dell'estrazione di acido fosforico da fosforiti, temi sui quali viene richiesta all'ISS anche una significativa attività istituzionale.
- Una nuova collaborazione è nata all'interno della rete *European ALARA (As Low As Reasonable Achievable) Network* (EAN) tra numerosi colleghi di diversi istituti europei per l'analisi del principio di ottimizzazione in radioprotezione (ALARA) e le sue applicazioni pratiche.

### Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi nel triennio per i tre ambiti di studio sono:

- Lo studio della biocinetica del  $^{137}\text{Cs}$  in madri in allattamento è stato esteso dalla sua concentrazione di attività nel latte materno a quello nelle urine, confrontando i valori misurati con i valori di escrezione previsti nei modelli *International Commission on Radiological Protection* (ICRP). Il confronto non è stato soddisfacente per quanto riguarda l'escrezione nelle urine. Si proverà a modificare il modello ICRP, per tener conto dell'influenza del potassio sul metabolismo del cesio.
- L'analisi dei dati di concentrazione di attività nei materiali da costruzione europei, organizzati in un database realizzato negli anni scorsi, ha permesso di valutare la dose gamma da materiali da costruzione indoor per i cittadini europei. L'applicazione al database di alcuni indici per la limitazione dei materiali ad alta concentrazione di attività, proposti da normative nazionali ed europee, permetterà di esaminare l'impatto della nuova direttiva Euratom nei diversi Paesi dell'UE. Lo studio del contenuto di radionuclidi naturali nelle fosforiti e nei fosfogessi permetterà di studiare la significatività dei diversi radionuclidi, ai fini della stima della dose alla popolazione.
- Attraverso l'analisi del principio di ottimizzazione in radioprotezione (ALARA), la proposta di sue applicazioni pratiche e la pubblicazione di un libro in preparazione sulla *ALARA Culture*, si prevede di poter migliorare le conoscenze nel settore.

### Trasferibilità dei risultati

Tra i risultati:

- Se il modello di escrezione ICRP modificato dovesse dare risultati soddisfacenti, potrà essere proposto agli esperti ICRP.
- Così come avvenuto per l'inventario dei materiali da costruzione che, messo a disposizione della CE, è diventato una base per l'elaborazione della relativa direttiva Euratom, così si farà per i risultati del nuovo studio.

- Le discariche italiane di fosfogessi sono state definite “siti di bonifica di interesse nazionale” e gli studi fatti sulle fosforiti e fosfogessi sono fondamentali per i pareri di radioprotezione emanati in merito dall’ISS.
- La pubblicazione del libro sulla *ALARA culture* può contribuire ad una riduzione delle esposizioni.
- L’esperienza di ricerca sulla radioattività ambientale è fondamentale per poter contribuire ai lavori del gruppo di esperti di radioprotezione di cui all’art. 31 del Trattato Euratom, a cui la responsabile del progetto partecipa da anni.

### **Rischi derivanti dall’esposizione ai campi elettromagnetici generati dai sistemi di *imaging* con risonanza magnetica**

Il progetto prosegue l’attività di ricerca portata avanti negli ultimi tre anni sulla valutazione dei rischi derivanti dai campi elettromagnetici generati dai sistemi di *imaging* con risonanza magnetica (MRI) su pazienti portatori di pacemaker o defibrillatori impiantati. I risultati ottenuti hanno fornito importanti contributi alla comunità scientifica internazionale, che hanno portato allo sviluppo e all’entrata in commercio dei primi stimolatori cardiaci impiantabili MRI-*conditional* (compatibili con ambiente MRI in specifiche condizioni). Molte però sono ancora le problematiche aperte che l’attività di ricerca si prefigge di affrontare: la valutazione dei dispositivi ancora in commercio ma non MRI-*conditional*, l’analisi di condizioni di esposizioni diverse da quelle per cui vale la compatibilità in ambiente MRI, l’analisi di altri dispositivi impiantabili attivi, come neurostimolatori o impianti cocleari. Inoltre saranno studiati anche altri aspetti relativi ai potenziali rischi che l’esposizione dei tessuti biologici ai campi generati dai sistemi MRI può comportare, con particolare attenzione verso quelle situazioni attualmente considerate una controindicazione, anche se non assoluta, all’esecuzione di un esame MRI, come la presenza di tatuaggi o di trucco permanente.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Attraverso l’utilizzo dei metodi di analisi, sia sperimentali che numerici, messi a punto negli anni passati, i principali obiettivi che l’attività di ricerca mira a raggiungere sono:

- valutare i rischi dei dispositivi impiantabili attivi non dichiarati MRI-*conditional*, ma che comunque rappresentano, ad oggi, una significativa parte dei dispositivi impiantati nei pazienti;
- studiare i potenziali effetti derivanti dall’introduzione di nuove tecnologie per i sistemi MRI (alto campo statico, bobine RF locali, *gantry* aperto, ecc.);
- per i dispositivi MRI-*conditional*, promuovere un’adeguata informazione sul loro corretto utilizzo nella comunità medica nazionale;
- valutare i rischi associati all’esecuzione di esami MRI, in soggetti con tatuaggi e trucco permanente.

Risultati finali di questa attività di studio e valutazione saranno la stesura di procedure e di linee guida per la gestione del rischio associato all’esecuzione di esami MRI nelle condizioni sopra indicate, attualmente considerate controindicazioni più o meno assolute.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Per l’ISS, questa ricerca consentirà di mantenere aggiornate le conoscenze scientifiche e gli strumenti di controllo in settori particolarmente dinamici quali quelli della risonanza magnetica e dei dispositivi impiantabili attivi. Per l’SSN, la ricerca rappresenta uno strumento indispensabile per accompagnare l’entrata in commercio dei dispositivi MRI-*conditional* a un’adeguata informazione nella comunità medica sulle condizioni per cui vale la presunzione di sicurezza. Inoltre, la grande diffusione che l’MRI ha avuto e continua ad

avere come tecnica diagnostica di elezione per molteplici patologie rende sempre più necessaria una valutazione dei rischi per tutte quelle situazioni attualmente considerate controindicate.

In ambito industriale, i risultati prodotti forniranno utili indicazioni nel percorso che porta da dispositivi MRI-*conditional* a prodotti MRI-*safe*, ovvero sicuri in ogni ambiente MRI.

### **Risposta adattativa indotta dalle radiazioni ionizzanti in sistemi cellulari *in vitro***

Uno dei problemi aperti in radioprotezione è quello di stabilire il tipo di relazione che lega gli effetti biologici osservati alla dose di radiazione ricevuta. La difficoltà nel definire tale relazione alle basse dosi deriva dalla complessità della risposta, osservata sia in sistemi *in vitro* che *in vivo*, che si evidenzia attraverso l'esistenza di vari fenomeni non lineari tra cui la risposta adattativa. Questa rappresenta un fenomeno in cui gli effetti dannosi indotti su un sistema biologico da una certa dose di radiazione, detta dose *challenging*, sono ridotti se qualche ora prima è impartita al sistema una piccola dose di radiazione detta dose *priming*.

L'obiettivo generale del progetto è quello di studiare con un approccio integrato sperimentale e teorico i meccanismi alla base della risposta adattativa. In particolare si prenderanno in considerazione le caratteristiche biologiche del sistema (riparazione del DNA, radioprotettori endogeni) e fisiche dell'esposizione (*dose* e *dose-rate*).

A questo scopo sarà progettata e realizzata presso l'ISS una facility di irradiazione gamma per l'esposizione di cellule coltivate *in vitro* a ratei di dose che variano da pochi mGy/h a circa 100 mGy/h.

Sempre nell'ottica di uno studio sulla risposta adattativa sarà valutata la possibilità che dosi basse come quelle legate al fondo naturale possano condizionare la cellula in modo da renderla più resistente a successive esposizioni acute a radiazioni ionizzanti.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto verrà svolto in collaborazione con il Reparto di Modelli di sistemi complessi e applicazioni alla stima dei rischi del Dipartimento TES, con il Centro Fermi, L'Università dell'Aquila e i Laboratori Nazionali del Gran Sasso (LNGS) dell'INFN. I risultati sperimentali attesi riguarderanno diversi end point a livello molecolare e cellulare. Dai risultati del progetto si otterranno informazioni sulla dipendenza del fenomeno di adattamento dai valori della dose *priming* e del suo rateo. Inoltre, si trarranno informazioni sul ruolo della radiazione di fondo come possibile dose *priming* cronica. Per questo scopo sarà utilizzato il laboratorio per colture cellulari allestito all'interno della galleria degli LNGS. Questa *facility*, situata 1.400 m sotto la vetta della montagna del Gran Sasso, offre un'ottima opportunità di studiare gli effetti di una riduzione significativa dell'esposizione dovuta al fondo naturale di radiazioni avendo un'eccellente protezione dai raggi cosmici.

Tutti i risultati sperimentali saranno confrontati con i risultati ottenuti utilizzando un modello di risposta adattativa in cui si usa un approccio di dinamica molecolare, sviluppato in collaborazione con il Reparto di Modelli di sistemi complessi e applicazioni alla stima dei rischi. Da questo confronto si prevede di ottenere informazioni che consentano di meglio comprendere i meccanismi che stanno alla base del fenomeno.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'attività si inserisce in uno sforzo internazionale mirante a risolvere le incertezze sul rischio associato alle esposizioni a dosi basse e protratte, cioè nelle condizioni che s'incontrano tipicamente negli ambienti di vita e di lavoro. La soluzione di questo problema ha importanti implicazioni sanitarie ed economiche nell'uso delle radiazioni sia in campo medico che industriale.

Le possibili ricadute riguardano: i) l'approfondimento dei meccanismi dell'azione biologica delle radiazioni ionizzanti che governano la risposta cellulare alle dosi basse e protratte; ii) una miglior comprensione del ruolo del fondo naturale di radiazioni nell'evoluzione della vita sulla terra ma anche per la valutazione dei rischi da esposizioni croniche occupazionali.

Il trasferimento dei risultati avverrà prevalentemente attraverso pubblicazioni scientifiche e relazioni a congressi scientifici, nonché mediante gli strumenti informatici dell'ISS.

### **Simulazioni di dinamica molecolare di sistemi complessi**

La dinamica dei sistemi a molti gradi di libertà può essere studiata e analizzata, a livello microscopico, solo attraverso la simulazione numerica delle equazioni del moto che ne descrivono l'evoluzione temporale, poiché uno studio analitico non è accessibile. In sistemi semplici la meccanica statistica corre in aiuto legando il comportamento delle variabili macroscopiche, in generale molto regolare e passibile di una descrizione termodinamica, alla dinamica microscopica, senza la necessità di una dettagliata descrizione di quest'ultima. Tuttavia alcune classi di sistemi, per i quali l'approccio statistico è comunque valido, presentano una dinamica meno regolare, per descrivere la quale è spesso necessario anche lo studio numerico delle equazioni del moto. Sistemi di tale tipo sono quelli con un numero di parametri, nella funzione hamiltoniana, comparabile a quello dei gradi di libertà (quindi estremamente elevato), quelli in cui le interazioni sono a lungo raggio, in modo che ogni grado di libertà interagisce in maniera significativa con tutti gli altri gradi di libertà del sistema, o anche sistemi con una struttura essenzialmente unidimensionale (come ad esempio la macromolecola di DNA) in cui la non linearità delle equazioni permette la localizzazione di stati energeticamente eccitati. Caratteristica peculiare di questi sistemi è la presenza di stati dinamicamente stabili molto al di fuori dell'equilibrio termodinamico.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio di sistemi complessi, sia attraverso un approccio di meccanica statistica che per mezzo della simulazione numerica delle equazioni del moto, è da tempo oggetto di analisi, in collaborazione con l'Università di Roma Sapienza, l'Università di Firenze, l'*École Normale Supérieure* di Lione (Francia) e l'Università di Tolosa (Francia). Si prevede, nel prossimo triennio, di concentrarsi principalmente sullo studio dei sistemi con interazioni a lungo raggio. Abbiamo già dimostrato che in questi sistemi spesso gli stati di equilibrio termodinamico dipendono, contrariamente da quello che accade in sistemi semplici, da quali parametri vengono fissati sperimentalmente (per esempio l'energia del sistema oppure la sua temperatura). Ora l'attenzione si sta focalizzando, da parte dei gruppi di ricerca coinvolti nel settore, sulle proprietà dinamiche degli stati lontani dall'equilibrio e sulle modalità di approccio all'equilibrio. Lo studio verterà sia sulla descrizione della dinamica con equazioni cinetiche, che descrivono l'evoluzione temporale della distribuzione di probabilità degli stati di singola particella, sia sulle simulazioni di dinamica molecolare. I due approcci dovranno essere complementari, poiché la simulazione dovrà fornire le informazioni non ricavabili dalle equazioni cinetiche.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Pubblicazioni scientifiche, comunicazioni a meeting dedicati alla ricerca nel settore.

### **Sostanze naturali e terapie innovative**

Negli ultimi anni la WHO ha riconosciuto l'uso terapeutico delle piante medicinali come parte integrante della terapia medica e ne ha sollecitato lo studio chimico, farmacologico e

clinico. Contemporaneamente vi è un aumento di situazioni a volte gravi come intossicazioni, effetti collaterali, in generale eventi avversi, riferibili all'uso inappropriato e non controllato di prodotti di origine naturale.

Si ritiene quindi importante concentrare l'attività di ricerca del prossimo triennio alla comprensione del meccanismo di azione e alla valutazione dell'efficacia farmacologica e/o del rischio di alcune sostanze naturali di origine vegetale e animale su modelli sperimentali *in vitro* (eucarioti inferiori, cellule tumorali) e su modelli tumorali *in vivo*. Diverse saranno le sostanze naturali di origine vegetale di cui si valuterà l'attività (*Aloe barbadensis*, *Mentha suaveolens*, *Melaleuca alternifolia*, *Boswellia serrata* e *Peschiera fuchsiaeifolia*). Gli studi verranno condotti anche utilizzando dei principi attivi. Si valuterà inoltre l'attività di sostanze naturali di origine animale: la monoaminossidasi da siero bovino e di diversi peptidi di origine umana. Di tutte queste sostanze sarà valutata l'attività citotossica e/o chemiosensibilizzante. Inoltre, si effettueranno studi di citotossicità e di efficacia utilizzando strutture monomeriche e analoghi sintetici.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Per ottenere indicazioni utili sul meccanismo di azione e quindi sulla reale attività farmacologica delle sostanze naturali già elencate verranno impiegate indagini biochimiche e ultrastrutturali. Un chiarimento sui meccanismi molecolari responsabili degli effetti biologici (morte cellulare, attività citostatica) indotti da queste molecole sia *in vitro* (su ceppi farmaco-resistenti) sia *in vivo* sarà ottenuto anche mediante studi pre-clinici eseguiti su animali.
- Allo scopo di ridurre le dosi impiegate in terapia nell'uomo verranno definite le concentrazioni sub-citossiche potenzialmente utili per aumentare l'attività dei farmaci anti-microbici e anti-tumorali convenzionalmente utilizzati in clinica.
- Una volta stabilita la non tossicità e la dose ottimale delle sostanze naturali da utilizzare come potenziali agenti chemiosensibilizzanti, verrà valutato il loro effetto in combinazione con i noti chemioterapici utilizzati attualmente in clinica quali doxorubicina e trastuzumab (Herceptin). Questi farmaci inducono a lungo termine resistenza ed elevata cardiotossicità. Saggi biologici con analoghi naturali e di sintesi verranno effettuati per indagare eventuali altre attività biologiche delle molecole in esame, ai fini di migliorare e ottimizzare le possibili combinazioni terapeutiche.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questi studi hanno quindi lo scopo di trovare nuovi approcci preventivi e terapeutici per migliorare la risposta al bisogno di salute, oltre che a soddisfare la necessità di nuove conoscenze scientifiche. Infatti, la sperimentazione di nuovi composti naturali, l'identificazione dei principi attivi e degli eventuali componenti caratteristici, la valutazione dell'attività antimicrobica e antitumorale se usate da sole, o in combinazione con farmaci convenzionali, potranno contribuire al miglioramento dell'efficacia e/o diminuire gli effetti collaterali negativi. Infine, i risultati di questi studi potranno fornire utili suggerimenti per un migliore processo valutativo sulla sicurezza dei prodotti contenenti sostanze naturali. Tutto ciò avrà un impatto importante sulla salute pubblica offrendo indicazioni utili per l'ottimizzazione dell'impiego terapeutico di alcuni "farmaci naturali".

### **Sostanze naturali nella modulazione dell'apoptosi e/o dell'autofagia indotte da agenti infettivi**

È noto che gli agenti infettivi modulano il metabolismo cellulare a favore della loro replicazione portando alternativamente alla morte o alla sopravvivenza della cellula.

L'apoptosi, o morte cellulare programmata, è un processo fisiologico che prevede il coinvolgimento di specifiche proteasi e di organelli cellulari. L'apoptosi è responsabile del corretto sviluppo dell'organismo, dell'omeostasi tissutale e della risposta cellulare a stress o a patogeni, come ad esempio virus, la cui replicazione e diffusione possono essere inibite dalla risposta apoptotica dell'ospite. I virus hanno sviluppato diverse strategie di sopravvivenza per sfuggire all'eliminazione da parte della cellula, tra cui la regolazione dei segnali apoptotici che permette il perdurare dell'infezione e aumenta l'efficienza della replicazione. L'autofagia è un processo fisiologico, che contribuisce a mantenere l'omeostasi tra sintesi, degradazione e riciclo di molecole per la sopravvivenza cellulare. Lavori recenti hanno dimostrato un ruolo attivo dell'autofagia nelle infezioni: questo processo permette, infatti, alle cellule di eliminare rapidamente agenti patogeni quali virus e batteri intracellulari limitandone la replicazione. Poiché l'inibizione della via apoptotica induce l'attivazione del programma autofagico, e viceversa, lo scopo di questo progetto è quello di utilizzare sostanze naturali per modulare la risposta cellulare ai diversi stimoli infettivi al fine di inibire l'infezione.

### **Risultati attesi nel triennio**

In questo progetto verrà analizzato come sia i virus che i batteri possano indurre o inibire alternativamente i processi di morte e sopravvivenza cellulare durante uno stesso ciclo infettivo a vantaggio della loro replicazione e propagazione. Saranno studiate sostanze di origine naturale in grado di modulare i processi cellulari, quali apoptosi e autofagia, indotti dagli agenti infettivi allo scopo di trovare le condizioni di equilibrio ideali per inibire l'infezione.

Le interazioni tra agenti infettivi, sia batterici che virali, e sistemi cellulari saranno analizzate attraverso indagini di tipo biochimico, molecolare e, in particolar modo, morfologico, aspetto che sarà affrontato mediante l'impiego di tecniche di microscopia ottica, a fluorescenza e di microscopia elettronica a trasmissione e a scansione. Infatti, la microscopia elettronica a trasmissione rappresenta, ancora oggi, una metodica d'elezione per studiare le modificazioni cellulari indotte dalle infezioni virali o batteriche in diverse condizioni sperimentali quali la molteplicità di infezione, la tipologia della cellula ospite, la temperatura e/o il tempo di infezione, e soprattutto per quanto riguarda l'identificazione del processo autofagico. Si prevede che questo progetto, identificando farmaci naturali che agiscano direttamente sulla cellula infettata piuttosto che sul patogeno, possa fornire dati importanti per la messa a punto di terapie antimicrobiche alternative.

### **Trasferibilità dei risultati**

Lo studio della modulazione del rapporto patogeno-cellula ospite attraverso l'utilizzo di sostanze naturali ci permetterà di comprendere meglio sia la patogenesi delle infezioni che i meccanismi coinvolti nella regolazione dell'apoptosi e dell'autofagia. Inoltre, i risultati di questo progetto di ricerca contribuiranno ad aumentare le conoscenze su come i diversi patogeni inducano o inibiscano questi processi cellulari e su come diverse sostanze naturali possano interferire con la capacità, da parte di virus e/o batteri, di modulare il metabolismo cellulare a loro favore. Una migliore comprensione dei meccanismi molecolari che regolano i diversi processi potranno essere utili per un più razionale approccio terapeutico delle malattie infettive. Infine, l'identificazione di sostanze naturali capaci di proteggere la cellula dall'ingiuria degli agenti patogeni potrà fornire importanti informazioni per la cura di queste patologie, comprese quelle neoplastiche causate da virus oncogeni.

## **Strumentazione per protonterapia oncologica**

Il progetto si inserisce nell'ambito di un programma di ricerca e sviluppo, in collaborazione con ENEA e IFO, di un sistema innovativo di radioterapia oncologica basato, per la prima volta, su un acceleratore lineare di protoni.

Esso continua e arricchisce un'attività iniziata nella metà degli anni '90 dal progetto Terapia Oncologica con Protoni (TOP) e raccoglie i ricercatori del Reparto di Fisica e tecnologia nucleare per la salute e di altri Reparti del Dipartimento TES.

La terapia oncologica con protoni offre la migliore precisione balistica intrinseca; il programma intende sfruttare al meglio questa specificità, grazie all'uso di un acceleratore lineare, che opportunamente progettato, permette un rilascio di dose al paziente, modulabile dinamicamente in direzione, energia (profondità) e intensità (dose istantanea).

L'elevata conformazione richiede un sistema di controllo e diagnostica di grande affidabilità e massima precisione. Il progetto, in linea con i risultati degli anni passati, prevede l'aggiornamento e messa a punto di una serie di camere a ionizzazione di diagnostica del fascio; la definizione e implementazione di parte del sistema di controllo; l'integrazione delle informazioni delle camere e dei dati del Piano di Trattamento con il sistema di controllo per correggere, in tempo-reale, rilasci di dose non pianificati e contemporaneamente determinare, in modo indiretto, la dose rilasciata al paziente.

### **Risultati attesi nel triennio**

L'integrazione ed elaborazione in tempo reale tra sistema di diagnostica e dati del piano di trattamento permetterà un controllo accurato del rilascio di dose (impulso per impulso del fascio) permettendo di inibire il sistema se si raggiunge la dose prescritta ovvero di correggere automaticamente eventuali derive dei parametri del fascio dal loro punto ottimale di lavoro.

Sarà inoltre possibile ottenere, in modo indiretto, una stima della dose effettivamente rilasciata, eventualmente corretta degli effetti legati al movimento del paziente (e dei suoi organi interni).

Le camere di diagnostica sono realizzate in tecnologia *micro-pattern* che permette di raggiungere le risoluzioni spaziali richieste (centinaio di micron) nella misura dalla posizione e del profilo del fascio.

Il sistema di controllo prevede tre livelli logicamente e fisicamente distinti: livello di apparato, livello intermedio di raccolta, e livello operatore. In questo modo il sistema ha la necessaria modularità che contribuisce, tra l'altro, ad ottenere l'elevato indice di affidabilità richiesto.

In definitiva si otterrà un sistema integrato e affidabile di diagnostica di fascio e suo controllo, volto a migliorare significativamente, in termini di maggior precisione e sicurezza, il rilascio di dose al paziente.

### **Trasferibilità dei risultati**

L'acceleratore lineare che si intende realizzare risulterà essere il primo al mondo impiegato per protonterapia, e promette di essere relativamente economico e compatto, due aspetti importanti nell'applicazione della protonterapia in ambito ospedaliero.

Questo richiede lo sviluppo di sistemi di diagnostica e di controllo dedicati e ottimizzati alle caratteristiche della macchina, quale risulta essere quello proposto.

L'eventuale e auspicabile successo di questa iniziativa permetterebbe la diffusione di queste tecnologie.

D'altra parte le caratteristiche del fascio sono tali da poter trovare, con opportuni adattamenti, applicazioni nei beni culturali, nella diagnostica di reperti archeologici e artistici.

### **Studio dell'attività del myo-inositolo nella oligoastenoteratospermia**

L'oligoastenoteratospermia è la riduzione del numero, motilità e alterazione morfologica degli spermatozoi. Le cause sono sconosciute e le terapie proposte inefficaci. La ricerca ha studiato lo stress ossidativo, perché si è visto che uno dei fattori che causano l'infertilità maschile è legato alla produzione di specie reattive dell'ossigeno prodotte da spermatozoi con alterazioni morfologiche. Le situazioni che inducono stress ossidativo nel liquido seminale sono molte: patologie a carico dell'apparato riproduttivo, particolari stili di vita, inquinamento ambientale e alimentare etc che rappresentano le principali fonti di stress per gli spermatozoi.

In questo contesto verrà analizzato il possibile ruolo di una sostanza naturale, il myo-inositolo, come agente antiossidante per il trattamento sistemico di infertilità maschile, per migliorare la qualità dello sperma *in vitro* nei casi di fertilizzazione applicata alla riproduzione medicalmente assistita.

L'inositolo è uno zucchero ciclico coinvolto nelle vie di segnalazione intracellulare e trasduzione del segnale attraverso la membrana plasmatica. Regola vari processi cellulari e fa parte della composizione dei fosfolipidi di membrana. Viene utilizzato nella terapia della distrofia muscolare e nelle epatopatie. Controlla inoltre la secrezione di alcune ghiandole endocrine tra cui le gonadi.

Studi recenti hanno ipotizzato il suo coinvolgimento nella maturazione e nella migrazione degli spermatozoi dall'epididimo.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Valutare gli effetti del myo-inositolo sulla funzionalità mitocondriale e quindi sulla qualità degli spermatozoi dei pazienti affetti da oligoastenoteratospermia.
- Valutare gli effetti del myo-inositolo sullo sperma umano utilizzando protocolli diversi.
- Testare gli effetti del myo-inositolo nei pazienti attraverso uno studio clinico randomizzato.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti potranno essere molto utili per migliorare la condizione di oligoastenoteratospermia in quei pazienti che ricorrono alle tecniche di riproduzione assistita oltre che al miglioramento della loro condizione psicologica.

Inoltre, i risultati potrebbero favorire l'interazione con le industrie farmaceutiche.

### **Studio delle sorgenti di radioattività naturale e dell'uranio impoverito**

Lo studio si focalizzerà su due tematiche:

- Sorgenti di radioattività naturale negli ambienti chiusi: attività di ricerca articolata in cinque linee: i) sviluppo di procedure di analisi di spettrometria gamma finalizzate alla misura del contenuto di radioattività naturale di un campione in laboratorio e in campo; ii) elaborazione e sviluppo di modelli per la stima della dose equivalente agli organi dovuta ai materiali da costruzione; iii) elaborazione e sviluppo di modelli per la valutazione dell'impatto radiologico di nuovi materiali da costruzione da materie prime a elevato contenuto di radioattività naturale (NORM); iv) analisi di modelli (*room model*) specifici per il toron e i suoi prodotti di decadimento; v) studio della radioattività naturale nelle acque destinate al consumo umano in quanto sorgente di esposizione della popolazione.
- Uranio impoverito: proseguimento dell'attività di raccolta, catalogazione e analisi della letteratura scientifica, letteratura grigia e di altra documentazione riguardante la

problematica dell'uranio impoverito; proseguimento dell'attività per la realizzazione di un portale dove siano reperibili informazioni bibliografiche (tipo PubMed) per la comunità scientifica, e divulgative per il largo pubblico.

Collaborazioni con l'INAIL (ex ISPESL), con l'ENEA-Casaccia, con l'ENEA-Bologna, con l'ARPA Lombardia, con l'Università di Leuven e con l'IAEA.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Raccolta e analisi di dati di concentrazione di gas toron, in alcuni ambienti domestici e lavorativi, correlati con la stima della concentrazione di attività nei materiali da costruzione e loro utilizzo per la valutazione di modelli (*room model*) specifici per il toron e i suoi prodotti di decadimento; valutazione della dose equivalente da materiali da costruzione ad organi di particolare interesse radioprotezionistico (es. cristallino); stima dell'impatto sulla dose alla popolazione del riciclo di residui industriali (fanghi rossi, ceneri volatili, ecc.) per la produzione di materiali da costruzione.
- L'attività sull'uranio impoverito è finalizzata al raggiungimento dei seguenti obiettivi: analisi e revisione critica della letteratura sulla dosimetria dell'uranio, le diverse modalità di esposizione, i coefficienti di rischio e gli effetti sulla salute di persone esposte; inoltre questa attività permette il trasferimento delle informazioni raccolte attraverso lo sviluppo e la realizzazione di un portale (tipo PubMed) dove la comunità scientifica possa reperire i riferimenti bibliografici sulla letteratura scientifica esistente e dove il largo pubblico possa trovare informazioni scientificamente corrette ma accessibili

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- Stima della dose alla popolazione per l'esposizione a significative sorgenti di radioattività naturale.
- Diffusione presso la comunità scientifica di referenze bibliografiche con la creazione di una sorta di PubMed per l'uranio impoverito e trasferimento al largo pubblico di materiale divulgativo scientificamente corretto.

### **Studio in colture 3D delle caratteristiche di crescita tumorale e risposta farmacologica**

L'impiego di colture cellulari 2D permette lo studio dei processi biochimici e fisiologici della cellula ma limita l'analisi di specifiche funzioni tissutali. Il fenotipo e le funzioni delle cellule sono strettamente dipendenti dall'interazione con la matrice extracellulare e le cellule adiacenti.

Negli studi di tossicità cellulare di farmaci e composti, i risultati ottenuti *in vitro* su colture 2D non sempre hanno un valore predittivo sulla tossicità *in vivo*. L'architettura 3D e l'interazione con la matrice influenzano l'efficacia dei trattamenti. Inoltre, è stato dimostrato che una delle cause principali del fallimento della terapia antitumorale in clinica è la presenza nella massa tumorale di cellule con proprietà *stem* caratterizzate da basso grado di proliferazione (quiescenza), da elevata espressione di proteine trasportatrici di farmaci (pompe di efflusso ATP-dipendenti) e da alto grado di indifferenziamento. Tali caratteristiche le rendono estremamente resistenti ai trattamenti chemioterapici.

Nel prossimo triennio ci proponiamo di:

- allestire colture 3D a partire da: i) linee di carcinoma mammario e di glioblastoma umane stabilizzate caratterizzate da elevata invasività e resistenza ai farmaci

- (sferoidi); ii) cellule con proprietà *stem* isolate da linee cellulari in coltura 2D o da biopsie (mammosfere, neurosfere);
- studiare sulle colture 3D gli effetti di trattamenti con sostanze ad attività antitumorale attualmente impiegate nel reparto su colture 2D.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Tra i risultati attesi:

- I risultati ottenuti permetteranno di definire le modalità di crescita 3D di linee tumorali in termini di proliferazione, adesione intercellulare, comportamento invasivo. Nel caso di colture 3D ottenute da cellule *stem*, particolare attenzione sarà data alla modulazione di espressione delle proteine in grado di legare ed espellere i farmaci (pompe di efflusso) responsabili della scarsa risposta antitumorale da parte di queste cellule.
- I risultati ottenuti permetteranno di valutare in strutture 3D la risposta ai trattamenti con diverse sostanze (naturali e non) con possibile attività antitumorale. Verranno analizzati i meccanismi di citotossicità indotta dai trattamenti e le modalità che possono migliorare la risposta citotossica (trattamenti combinati con più farmaci, uso di composti inibitori delle pompe di efflusso, ecc.).

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'impiego di colture tumorali 3D potrà contribuire ad ottenere dati sulla risposta tumorale a trattamenti farmacologici che abbiano un valore predittivo più preciso sulla tossicità *in vivo*. Chiarire il ruolo svolto dall'architettura 3D, dai legami intercellulari, dai rapporti con la matrice extracellulare nel determinare il grado di sensibilità/resistenza ai trattamenti è infatti di fondamentale importanza per il miglioramento della terapia antitumorale. L'ampliamento dei saggi di tossicità *in vitro* da modelli 2D a 3D permette in modo più preciso di analizzare alcune caratteristiche acquisite dalle cellule tumorali nel corso della progressione neoplastica, quali la perdita di farmacosenibilità, la capacità di infiltrare i tessuti adiacenti e formare metastasi a distanza. Tali caratteristiche costituiscono gli ostacoli maggiormente incontrati nel corso della terapia antitumorale e, frequentemenete, causa del suo fallimento.

#### **Sviluppo di Compton camera basata su rivelatori Gas Electron Multiplier (GEM) per *imaging* molecolare con radionuclidi**

Si intende studiare la fattibilità ed eventualmente sviluppare un prototipo di una Compton Camera per applicazioni nell'*imaging* molecolare con radionuclidi con emissione di fotoni gamma singoli.

Uno dei problemi di base dell'*imaging* con fotoni è l'impossibilità di tracciare direttamente i fotoni rivelati; in generale, la rivelazione della direzione di un fotone richiede l'utilizzo di collimatori passivi, che però degradano o limitano la qualità (efficienza) della misura.

In questa direzione, una alternativa è offerta dall'utilizzo dell'effetto Compton su elettroni atomici (diffusione elastica di fotoni su elettroni dell'atomo) che permette di ricostruire, con collimazione elettronica, la direzione di origine del fotone.

Questo richiede però, non solo la rivelazione accurata del punto di interazione Compton del fotone ma anche la misura dell'energia dell'elettrone diffuso ovvero della sua direzione, e quindi la misura del punto di assorbimento del fotone diffuso, che deve avvenire a distanza significativa rispetto al punto di diffusione, per aumentare la precisione di ricostruzione della direzione.

In definitiva sono richieste una elevata precisione spaziale ma anche grandi volumi di rivelazione, oltre naturalmente ad una adeguata efficienza di rivelazione.

Questo può essere reso possibile da camere a gas realizzate con la recente ed economica tecnologia GEM.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto si prefigge di valutarne la fattibilità con studi MonteCarlo ed eventuale implementazione prototipale.

Per lo studio di fattibilità si intende utilizzare il codice MonteCarlo GEANT4, che si sta affermando negli studio di radiobiologia e di medicina nucleare. Verranno pertanto implementati vari modelli di camere GEM, ottimizzate per rivelare le posizioni di diffusione e di assorbimento del fotone gamma nonché la direzione (ed energia) dell'elettrone Compton. Per questo verranno introdotti nelle camere GEM con geometria non convenzionale opportuni materiali che dovranno aumentare la probabilità di diffusione Compton e assorbimento del fotone. Si valuteranno quindi le accuratèzze e gli intervalli di energie applicabili.

A valle di questo studio verrà realizzato un prototipo GEM con il quale si valideranno i risultati del MonteCarlo ed eventualmente ottimizzeranno i parametri operativi della Compton camera.

Questo permetterà anche di valutare la reale efficacia di un sistema basato sull'effetto Compton per la rivelazione di fotoni gamma da utilizzare in studi di *imaging*.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'esito positivo della ricerca permetterebbe l'implementazione nell'immediato futuro, a costi contenuti, di sistemi di rivelazione Compton Camera, che possono trovare applicazioni non solo nel campo dell'*imaging* molecolare con radionuclidi (proposito diretto del progetto) ma anche in altri campi come la sicurezza pubblica, l'*imaging* industriale e la ricerca in astronomia con raggi gamma.

Da anni infatti si sta cercando di implementare sistemi di questo tipo, con rivelatori tipicamente basati su tecnologie a semiconduttore, generalmente molto costose su grandi volumi, un fattore limitante nella loro diffusione.

### **Sviluppo di metodi per il *risk management* in Radioterapia (RT)**

L'attività qui sintetizzata è connessa alle attività del Reparto di Tecnologie fisiche in biomedicina, di cui è un ampliamento, anche in collaborazione con i Reparti di Biofisica delle radiazioni ionizzanti e di Dosimetria delle radiazioni e difetti radioindotti.

La moderna radioterapia impiega tecnologie sempre più avanzate e complesse che stanno rapidamente soppiantando la radioterapia convenzionale. I progressi tecnologici si associano ad enormi vantaggi clinici per il paziente. La maggiore criticità intrinseca delle nuove tecnologie, rispetto a quelle della radioterapia convenzionale, impone una adeguata valutazione e gestione del rischio correlato al loro impiego. La politica del *Risk Management* in radioterapia sta diventando prioritaria in fase di implementazione di programmi di garanzia di qualità legati all'uso di tecnologie sempre più sofisticate. Le attività del Gruppo di studio ISS sull'Assicurazione di qualità in radioterapia prevede di promuovere, in linea con quanto accade a livello europeo, iniziative di formazione ed elaborazione di linee guida dedicate. Fanno parte del Gruppo di studio professionisti provenienti dai principali Centri di RT operanti nel territorio, delegati dalle Società scientifiche di appartenenza, (Associazione Italiana di Fisica Medica – AIFM, Associazione Italiana di Radioterapia Oncologica – AIRO e Associazione Italiana Tecnici sanitari di Radioterapia Oncologica e Fisica Sanitaria – AITRO) con rinnovi periodici sempre indicati dalle Associazioni scientifiche. Il Gruppo ha pertanto le caratteristiche multidisciplinari necessarie.

### **Risultati attesi nel triennio**

L'identificazione e definizione di procedure e metodi di tipo prospettico (*proactive*) per la riduzione della probabilità di incidenti o eventi avversi, in sostituzione dei metodi retrospettivi attualmente utilizzati, insieme alla ottimizzazione di utilizzo delle procedure di RT con una visione complessiva che coinvolga tutti gli operatori con le relative professionalità.

I metodi *proactive* nella valutazione del rischio insieme a sistemi di reporting (Sistema ROSIS) di incidenti occorsi potranno mettere in evidenza le criticità delle procedure, di individuare le criticità e di costruire su queste indicatori di qualità dedicati che all'interno di audit clinici permetteranno di individuare quelle procedure che maggiormente necessitano di interventi correttivi.

Le attività di formazione permetteranno di fornire alle diverse figure professionali coinvolte gli strumenti necessari per operare nel rispetto di standard di qualità e nella logica del miglioramento continuo, basato su meccanismi *feed-back*, per far fronte alle criticità connesse alla crescente complessità dei dispositivi e dei trattamenti.

### **Trasferibilità dei risultati**

Tutta l'attività del Gruppo di studio e di tutti gli altri Gruppi di lavoro costituitisi di volta in volta per specifici argomenti è oggetto di pubblicazione come Rapporti ISTISAN. Il valore aggiunto di questa attività a livello di trasferibilità è legato al fatto che questi documenti pur non avendo un ruolo cogente, sono punti di riferimento imprescindibili per i Centri di radioterapia e Servizi di fisica sanitaria in quanto strumenti vincolanti per la presentazione di istanze relative a richieste di nuove risorse strumentali e umane presso le proprie Direzioni Sanitarie.

### **Sviluppo di soluzioni innovative (basate sull'ICT) per la gestione e pianificazione delle risorse funzionali in ambito ospedaliero ai fini dell'incremento della sicurezza ed efficienza**

Si intendono conseguire esperienze nei settori della ricerca operativa e della teoria dei controlli, che forniscono numerose metodologie e tecniche per lo studio e la risoluzione di problematiche legate alla gestione di tecnologie nelle strutture ospedaliere al fine di migliorare l'efficienza del servizio sanitario.

I problemi di ottimizzazione e di controllo nell'ambito sanitario possono includere programmazione di risorse, pianificazioni di servizio, logistica, previsioni di richieste sanitarie, ottimizzazioni di terapie mediche, di diagnosi di malattie e di cure preventive.

L'ottimizzazione e il controllo in ambito sanitario forniscono gli strumenti per i seguenti casi di studio di interesse:

- localizzazione delle risorse ospedaliere (persone, dispositivi medici o oggetti utilizzati in ambito sanitario);
- pianificazione dell'intervento dei veicoli di emergenza;
- risoluzione di problemi di logistica, di programmazione delle risorse (ad esempio nei problemi di assegnazione del personale con particolari competenze tecniche) o di classificazione dei pazienti.

In particolare, la localizzazione delle risorse ospedaliere è uno dei maggiori problemi nella gestione delle strutture ospedaliere; per queste motivazioni è in rapida espansione l'utilizzo di sistemi di identificazione automatica per la tenuta sotto controllo delle risorse ospedaliere.

### **Risultati attesi nel triennio**

Verranno presentati un caso di studio di localizzazione di risorse medicali all'interno di una struttura ospedaliera attraverso l'utilizzo di sistemi di identificazione automatica e una ricerca sullo stato dell'arte di varie tecnologie di sensori utilizzate in ambito medicale.

I risultati attesi sono:

- la progettazione di una rete di sensori con una collocazione ottimale di lettori all'interno di un reparto ospedaliero, che permetta di effettuare il monitoraggio in tempo reale delle risorse ospedaliere. Lo scopo è quello di ridurre i tempi di recupero delle risorse, facilitando il lavoro del personale e minimizzando la criticità di queste azioni di ricerca;
- lo sviluppo di modelli per la descrizione dei movimenti delle risorse ospedaliere;
- lo sviluppo di modelli per la descrizione della copertura dei sensori in diverse configurazioni;
- l'allestimento di un *set-up* sperimentale con una tecnologia di sensori scelta;
- l'effettuazione di una sperimentazione presso una struttura ospedaliera.

Saranno inoltre oggetto di studio le metodologie basate sul controllo predittivo cooperativo per la pianificazione di interventi dei veicoli di emergenza, al fine di sviluppare degli algoritmi di gestione delle emergenze mediche, utilizzando le tecnologie disponibili più aggiornate in questo ambito.

### **Trasferibilità dei risultati**

La trasferibilità dei risultati avverrà attraverso gli schemi classici della disseminazione scientifica, principalmente attraverso la pubblicazione su riviste internazionali e rapporti interni e la partecipazione a congressi. Sarà cura del personale del Reparto di porre in atto esperienze pratiche di implementazione per la verifica delle soluzioni adottate.

Collaborazioni con il Dipartimento di Ingegneria informatica, Automatica e Gestionale dell'Università di Roma Sapienza, con il Dipartimento di Ingegneria dell'innovazione dell'Università del Salento di Lecce con il Dipartimento Cardiovascolare dell'Azienda Ospedaliera San Camillo di Roma e con la Società Italiana Telemedicina @ sanità elettronica (SIT).

### **Sviluppo di strumentazione indossabile per il monitoraggio di parametri fisiologici e relativa integrazione in reti wireless**

La linea di ricerca ha come obiettivo lo sviluppo di strumenti indossabili innovativi. Tali strumenti possono presentare una valida alternativa ad altri costosi sistemi di misura: nel caso degli accelerometri ad esempio sono stati già dimostrati vantaggi in tal senso rispetto alla strumentazione optoelettronica. Tali sensori saranno utilizzati per il monitoraggio di parametri fisiologici di interesse biomedico sia in applicazioni cliniche tradizionali sia in applicazioni di telemonitoraggio domiciliare con l'obiettivo di migliorare la qualità della vita dei pazienti. Particolare attenzione sarà rivolta verso le seguenti attività:

- Sviluppo di contapassi per soggetti con disabilità motoria, integrati anche in protesi di supporto gamba-piede.
- Sviluppo di soluzioni per il monitoraggio neuromotorio al videoterminale (VDT) e del *fall risk*, anche per ottenere *medical knowledge* nel mondo del lavoro.
- Sviluppo di ulteriori sensori indossabili per il monitoraggio fisiologico di interesse biomedico.
- Integrazione WAN di *wearable device* per il monitoraggio domiciliare e per il miglioramento della qualità della vita. Si collaborerà con altri Reparti del dipartimento TES.

### **Risultati attesi nel triennio**

In cinematica studi preliminari hanno dimostrato la fattibilità dell'uso di tali strumenti per la ricostruzione della traiettoria (cinematica), negli intervalli temporali di breve durata. Altri studi hanno dimostrato la fattibilità dell'uso di strumenti indossabili nell'investigazione del *fall-risk*. Altri, infine, il vantaggio dell'uso di particolari contapassi sviluppati *ad hoc* nel caso di Parkinson o pazienti con esiti di ictus.

Con riferimento a ciascuna attività:

- Sviluppo di contapassi per soggetti con disabilità motoria. I risultati riguarderanno sia la possibilità di correlare terapia motoria e farmacologia, sia la conoscenza medica relativa a protocolli medici specifici e classificazioni di disabilità.
- Monitoraggio VDT e *fall-risk*. I risultati riguarderanno la possibilità di classificare con tecniche appropriate sia i soggetti coinvolti in protocolli di cura sia i lavoratori.
- Sensori di interesse biomedico. I risultati riguarderanno la possibilità di monitoraggio con dispositivi indossabili di ulteriori parametri biomedici quali temperatura, respiro, consumo energetico.
- Integrazione WAN di *wearable device* per il monitoraggio domiciliare. I risultati riguarderanno sia aspetti di fruibilità della cura in modalità telemedica sia aspetti di accettazione del paziente a casa.

### **Trasferibilità dei risultati**

I sensori indossabili possono presentare importanti vantaggi sia per quanto riguarda la trasferibilità clinica che gli aspetti economici. I sensori cinematici ad esempio possono presentare rilevanti vantaggi per quanto riguarda la trasferibilità in piccoli studi medici di analisi del movimento. I sensori cinematici possono rappresentare un'alternativa a bassissimo costo ai più complessi metodi optoelettronici. Unità operative mediche dotate di uno scarso budget possono pertanto dotarsi di tali strumenti per l'analisi del movimento a basso costo (facilità della somministrazione clinica). La trasferibilità in dettaglio dei risultati avverrà attraverso gli schemi classici della disseminazione scientifica (congressi, riviste internazionali, elaborati di servizio) e tenendo conto del ruolo istituzionale dell'ISS anche attraverso Rapporti Istisan e (tramite interazioni con le autorità competenti), Linee guida.

## **Sviluppo e implementazione di nuove tecnologie fisiche in biomedicina e per il miglioramento di qualità nelle tecnologie che applicano le radiazioni ionizzanti in medicina**

Lo studio sarà rivolto verso tre tematiche:

- *NMR*. Si esamineranno cellule staminali tumorali da pazienti per caratterizzarne il fenotipo metabolico e la resistenza a radiazione gamma e a fasci di protoni o ioni carbonio. Quest'ultimo aspetto è supportato da un progetto finanziato dall'INFN (RADIOSTEM). Saranno approfonditi gli aspetti metabolici correlati con la radioresistenza in diversi tipi di cellule tumorali/normali di cellule di origine umana (es. *Human Umbilical Vein Endothelial Cell*, HUVEC).
- *Dosimetria*. Data l'importanza della ricostruzione accurata della dose impartita al paziente nel corso di RT si proseguiranno gli studi sui gel-dosimetri utilizzando i sistemi di rilevazione ottica messi a punto negli anni precedenti. Si esploreranno anche le risposte di altre matrici utilizzando sia la spettroscopia ottica che la NMR.
- *Qualità nelle scienze radiologiche*:
  - radioterapia (RT): si proseguirà l'attività del Gruppo di lavoro attivo dal 1995 in collaborazione con i Centri di RT e le associazioni professionali per elaborare linee

guida su tematiche generali e promuovere la formazione sulle problematiche emergenti;

- radiologia interventistica (RI): si raccoglieranno dati da un campione significativo di Centri nazionali di RI per informazioni sia sui dettagli tecnici che sulle modalità di impiego delle apparecchiature. Verranno raccolti dati di dose dei lavoratori nelle più diffuse pratiche interventistiche sia di diagnosi che di trattamento e di esposizione dei pazienti relativamente ad alcune procedure interventistiche.

### **Risultati attesi nel triennio**

Tra i risultati attesi nell'ambito delle tre tematiche:

- *NMR*. L'analisi del *pattern* spettrale permetterà di definire il fenotipo metabolico correlandolo ai parametri biologici e, se possibile, ai dati clinici. Le modificazioni indotte dalle radiazioni potranno fornire ulteriori informazioni sulla radioresistenza. I segnali identificati potranno essere considerati *marker* spettroscopici. L'attenzione è concentrata su molecole con segnali visibili anche *in vivo*, in quanto le osservazioni condotte sulle cellule possono preludere ad applicazioni *in vivo* con radiazioni.
- *Dosimetria*. Con tecniche avanzate di rilevazione ottica sarà ricostruita la dose in 2D e 3D in sistemi gel dosimetrici o in altre matrici di interesse. Sarà esplorata la potenzialità della NMR in nuove tipologie di dosimetri.
- *Qualità nelle scienze radiologiche*.
  - RT. Con i Centri con maggiore esperienza nel settore, quali la radioterapia intraoperatoria (IORT), l'irradiazione corporea totale (*Total Body Irradiation*, TBI), la radioterapia ad intensità modulata (*intensity modulated radiotherapy*, IMRT), gli indicatori di qualità generali selezionati per sede di trattamento, saranno aggiornate le Linee guida elaborate.
  - RI. Saranno sviluppati questionari inserendo i dati in un database per raggiungere un primo quadro d'insieme sulle apparecchiature radiologiche impiegate in RI nonché sulle dosi ai pazienti e agli operatori. Il contesto congiunto operatore-paziente per valutare le esposizioni al lavoratore è necessario a causa della vicinanza dell'operatore al paziente nel corso delle procedure. La valutazione delle informazioni raccolte consentirà di formulare un primo insieme di indicazioni per un maggior livello di radioprotezione del paziente e degli operatori.

### **Trasferibilità dei risultati**

L'identificazione di fenotipi metabolici potrà permettere la costruzione di *cluster* possibilmente correlati con dati clinici o biologici. Lo studio delle caratteristiche di radioresistenza, soprattutto in connessione con l'uso di fasci di protoni e di ioni carbonio permetterà una migliore comprensione della resistenza ai trattamenti e delle prospettive aperte dalle nuove terapie. La messa a punto di nuovi sistemi dosimetrici in due o tre dimensioni darà un contributo utile per il maggior controllo della deposizione della dose in RT. Infine i risultati e le informazioni ottenute nell'attività di assicurazione di qualità in radioterapia oncologica e radiologia interventistica potranno essere utilizzati nei settori medici corrispondenti.

### **Sviluppo e applicazione di metodologie strumentali per l'analisi del movimento in clinica**

Attualmente gli ambiti di studio riguardano:

- Sviluppo di metodologie per l'analisi del movimento dell'arto superiore
- Ci si propone di sviluppare metodologie che si basano sia sull'uso di strumenti commerciali che sviluppati in laboratorio per la misura di parametri cinematici/dinamici dell'arto superiore (braccio, avambraccio, mano) anche con riferimento all'attività a VDT.

- Sviluppo di metodologie per l'analisi del movimento dell'arto inferiore.
- Ci si propone di sviluppare metodologie che si basano sia sull'uso di strumenti commerciali che sviluppati in laboratorio, essenzialmente indossabili, per la misura di parametri cinematici/dinamici durante il cammino con verifica congiunta del consumo metabolico.
- Sviluppo di metodologie per l'analisi della postura
- Ci si propone di sviluppare metodologie basate su sistemi indossabili comprensivi di integrazione con sistemi di *biofeedback* audio e vibrotattili per la restituzione di parametri dell'equilibrio posturale in forma audio. In ciascuno di questi ambiti ci si avvarrà di specifici modelli biomeccanici e di tecnologie ICT (telemedicina).

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi per ciascun filone sono rispettivamente i seguenti:

- Realizzazione e applicazione di strumentazione innovativa specifica che permetta l'analisi del movimento dell'arto superiore in termini sia di dinamica che di cinematica. Per quanto riguarda l'attività a VDT saranno disponibili dei protocolli specifici da applicare a casistiche cliniche.
- Realizzazione e applicazione di strumentazione innovativa specifica che permetta l'analisi del movimento dell'arto inferiore in termini sia di dinamica che di cinematica. In particolare ci si focalizzerà su test sul cammino per il consumo metabolico e su kit strumentali specifici.
- Saranno disponibili degli strumenti per l'analisi della postura integrati con sistemi *Biofeedback* audio e vibrotattili e saranno applicati con protocolli specifici.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La trasferibilità dei risultati avverrà attraverso gli schemi classici della disseminazione scientifica, principalmente attraverso congressi, riviste internazionali e Rapporti Istituzionali. Nei dettagli alla conclusione degli studi relativi ai tre ambiti (arto superiore, arto inferiore, monitoraggio della postura) saranno disponibili:

- Metodologie di analisi e classificazione provenienti dall'uso di tali strumenti su sani applicati su protocolli specifici. Saranno disponibili degli indici di classificazione nel caso di patologie specifiche provenienti dall'uso di tali strumenti su sani applicati su protocolli specifici.
- Modelli biomeccanici innovativi anche correlati (come nel caso del cammino) a problematiche di consumo metabolico.

### **Tecnologie e metodologie per la valutazione della funzione autonoma**

Negli ultimi decenni è aumentata la consapevolezza dell'importanza in molte malattie del ruolo del sistema nervoso autonomo, e quindi della necessità di mettere a punto tecnologie e metodiche per una valutazione della funzione autonoma. Più recentemente è inoltre emerso un crescente interesse per il sistema nervoso autonomo anche nella valutazione del benessere complessivo (*wellness*) dell'individuo. L'importanza del sistema nervoso autonomo in molte patologie e negli stati di benessere dipende dal ruolo che questa componente del sistema nervoso esercita nel regolare le funzioni viscerali in risposta agli stimoli interni ed esterni. Lo studio della funzione del sistema nervoso autonomo è possibile in via non invasiva attraverso l'analisi delle fluttuazioni spontanee di alcune grandezze cardiovascolari (*heart rate variability*, HRV), e più recentemente attraverso *imaging* fMRI.

Obiettivo: la ricerca si propone di mettere a punto tecnologie per l'acquisizione di segnali di interesse neurovegetativo e per la somministrazione di stimoli perturbativi dell'omeostasi

cardiovascolare, compatibili con l'ambiente MRI, unitamente a metodiche di analisi integrata dei segnali misurati.

#### **Risultati attesi nel triennio**

La realizzazione di *set-up* sperimentali e la loro validazione su soggetti normali è l'obiettivo principale della ricerca. L'identificazione delle risposte fMRI a stimolazioni neurovegetative e cognitive consentirà di individuare le aree cerebrali coinvolte nell'elaborazione degli stimoli provenienti dalla periferia, e di definire protocolli di prova mirati all'investigazione delle modificazioni indotte a livello centrale in presenza di stati patologici

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le tecnologie e i metodi sviluppati possono trovare applicazione come ausili diagnostici in patologie quali l'ictus ischemico e l'ipertensione arteriosa, nelle quali è noto un coinvolgimento del sistema nervoso autonomo. Ad oggi la mancanza di una metodica integrata fMRI-HRV ha limitato la possibilità di una valutazione specifica della regolazione centrale della funzione autonoma.

### **Tecnologie per la biologia dei sistemi**

Per l'elaborazione di questo piano triennale si trae spunto dalla costituzione, nel corso del 2010, del Reparto che porta il nome di questo progetto. Lo scopo è pertanto proprio quello di, pur nella continuità con alcune attività di ricerca svolte in passato, innestare e rafforzarne altre che si ritengono di significativo valore strategico in termini di ricerca applicata e di base, e potenzialmente importanti in termini di ricadute in biomedicina. In sintesi ci si propone quanto segue:

- creazione e messa a punto di una piattaforma per studi di *systems biology* impiegante tecnologie di calcolo parallelo;
- sviluppo di sistemi hardware/software per la visualizzazione 3D interattiva e in tempo reale di cellule e macromolecole di interesse biomedico, e per applicazioni di realtà virtuale in psicologia e neuroscienze;
- studio della struttura dell'aggregato tossico della calcitonina come sistema-modello di proteina amiloide e studio dell'interazione di tale struttura con modelli di membrane lipidiche;
- sistemi cognitivi: caratterizzazione strutturale e funzionale del sistema percezione-azione nell'uomo. Sviluppo e applicazioni di tecnologie di *augmented* e *virtual reality*.
- attività di ricerca e sviluppo mirata alla realizzazione di un sistema esperto di supporto alla diagnostica medica e per un uso appropriato dei test diagnostici.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Con riferimento ai punti sopra elencati, ci si attende quanto segue:

- Implementazione su sistemi di calcolo parallelo di tecnologie basate su reti multiscala e, in generale, di sistemi *Probabilistic Graphical Model* (PGM).
- Studio di fattibilità e messa a punto di un sistema per la visualizzazione 3D della dinamica di molecole. Valutazione tecnologica della possibilità che può derivare dall'utilizzo di dispositivi e tecnologie interattive di realtà virtuale.
- Lo studio riguardante le proteine amiloidee cercherà di individuare quali siano le caratteristiche strutturali della proteine (*misfolding* e oligomerizzazione) e della membrana cellulare (*raft* lipidici o proteine di membrana) che controllano i meccanismi di neurotossicità.
- Si vogliono individuare come in ogni individuo, sia l'attività cerebrale, sia l'attività percettivo/motoria evidenze delle frequenze caratteristiche. Sulla base dei risultati fin

qui ottenuti si evince una forte relazione funzionale fra i ritmi spontanei cerebrali e comportamentali in compiti di tipo linguistico. Si intende proseguire in tale direzione e verificare l'ipotesi che le frequenze spontanee osservabili nel comportamento abbiano un correlato cerebrale indipendentemente dal compito.

- Messa a punto di un sistema aperto, interfacciato con un applicativo diagnostico, che costituirà una fonte di informazioni di grande utilità non solo per la diagnostica medica, ma anche per indagini epidemiologiche e popolazionistiche.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati che possono essere ottenuti grazie all'applicazione di tecnologie di intelligenza artificiale, sistemi esperti, sistemi cognitivi e calcolo parallelo sono di per sé altamente innovativi e costituiranno delle importanti premesse per ulteriori applicazioni. Infatti questi settori sono rilevanti sia per l'obiettivo che si pongono ma anche, e forse di più, per le metodologie e le tecnologie a cui si farà ricorso. Queste ultime, in effetti, stanno diventando sempre più sia un elemento strategicamente decisivo, sia un elemento di criticità (in relazione alla difficoltà di reperire adeguate competenze).

Per quanto riguarda le malattie amiloidee, esse includono malattie rare come le encefalopatie spongiformi e malattie ad alta prevalenza come la malattia di Alzheimer o di Parkinson. Conoscere le ragioni che rendono i neuroni particolarmente suscettibili all'azione delle proteine coinvolte può contribuire ad identificare nuove e più efficaci terapie.

## **Ultrasuoni in medicina ed estetica**

Il Reparto di Radiazioni non ionizzanti è stato coinvolto recentemente nella problematica dei possibili rischi connessi alle applicazioni degli ultrasuoni nel campo dei trattamenti estetici. Si è evidenziato in modo particolare il problema della cosiddetta "cavitazione estetica", cioè dell'utilizzo di apparecchiature aventi lo scopo dichiarato di indurre rotture delle membrane cellulari degli adipociti (lisi adipocitaria) sfruttando il fenomeno della cavitazione transiente indotta dagli ultrasuoni, ai fini del trattamento delle adiposità localizzate (rimodellamento corporeo). Al momento tali apparecchiature sono proibite nei centri estetici, ma non nei centri di medicina estetica, e comunque sono previsti aggiornamenti della normativa per i centri estetici, per cui resta ancora aperto il problema della valutazione dei rischi per i pazienti.

Il Reparto di Radiazioni non ionizzanti darà il suo contributo scientifico all'analisi delle problematiche sanitarie connesse all'utilizzo degli ultrasuoni in ambito estetico (anche medico), e più in generale al loro utilizzo per altri trattamenti medici, dall'utilizzo di ultrasuoni focalizzati in terapia oncologia alle applicazioni in fisioterapia. Saranno analizzati i problemi aperti relativi alla caratterizzazione fisica del fascio ultrasonoro e alla sua propagazione nei tessuti biologici, nonché il problema (per quanto riguarda la lisi adipocitaria) del destino dei lipidi liberati nel corpo.

### **Risultati attesi nel triennio**

Le apparecchiature per la lisi adipocitaria tramite ultrasuoni sono di introduzione relativamente recente, e rimanendo ancora aperti molti problemi relativi alla caratterizzazione fisica del fascio ultrasonoro e alla sua propagazione nei tessuti biologici, non sono ancora disponibili dati certi sulla loro sicurezza per la salute. Ci si aspetta pertanto un significativo contributo di questo progetto alla valutazione dei rischi. A questo scopo si stanno avviando collaborazioni con altri enti di ricerca, attivi nel settore degli ultrasuoni, che permetteranno di affrontare i vari aspetti di questa problematica interdisciplinare e permetteranno inoltre di sopperire in qualche misura al sottodimensionamento del Reparto.

### **Trasferibilità dei risultati**

L'ISS è chiamato a dare il suo contributo negli aggiornamenti delle schede tecniche, previste dalla legge n. 1 del 1990 sulla disciplina dell'attività di estetista, contenenti le caratteristiche tecniche, le modalità di utilizzo e le cautele d'uso delle apparecchiature utilizzate in campo estetico (non medico). Attualmente in tali schede non sono comprese tali apparecchiature (ma sono previste altre applicazioni degli ultrasuoni in campo estetico non medico) per cui di queste è proibito l'utilizzo nei centri estetici: In considerazione del fatto che il regolamento di attuazione previsto dalla legge 1/90 è soggetto ad aggiornamenti periodici in relazione agli sviluppi tecnologici e agli avanzamenti delle conoscenze, ma anche in considerazione del fatto che tali apparecchiature, proibite nei centri estetici, possono essere liberamente utilizzate in ambito medico estetico, i risultati di questo progetto daranno un utile contributo alle necessarie valutazioni dei rischi.

### **Valutazione biomeccanica della funzione e del danno motorio**

Si proseguirà l'attività volta all'approfondimento delle conoscenze biomeccaniche di base dell'apparato locomotore e delle alterazioni indotte da patologie ad alta incidenza quali diabete e patologie ortopediche e/o neurodegenerative. Proseguirà contestualmente l'attività di ricerca applicata al contesto clinico, anche relativamente a materiali e interventi terapeutici innovativi. Il progetto si fonderà quindi sulle seguenti principali attività:

- *technical assessment* di strumentazione per baropodometria diagnostica, fissa e indossabile, tradizionale e innovativa: sulla base dei buoni risultati ottenuti fino ad ora, è infatti opportuno proseguire le attività per l'ampliamento del set di tecnologie di assessment;
- *technical assessment* dei principali dispositivi presenti nei laboratori di analisi del movimento;
- disseminazione scientifica delle metodologie di *assessment*;
- attività di *consensus* a livello scientifico, anche mirato alla redazione di linee guida ufficiali e, a livello regolatorio, attività di normazione mirate alla produzione di norme tecniche nazionali e internazionali per la valutazione tecnica dei suddetti dispositivi;
- implementazione di indagini biomeccaniche "standardizzate" in clinica, con particolare riguardo al collaudo delle ortesi prescritte a pazienti diabetici a rischio ulcerativo;
- introduzione della modellazione ad elementi finiti, a supporto di tutte le attività precedenti.

### **Risultati attesi nel triennio**

Redazione e disseminazione di linee guida a livello nazionale e internazionale per implementazione, monitoraggio e valutazione di efficacia di interventi ortesici e terapeutico-riabilitativi prescritti a pazienti diabetici a rischio ulcerativo. Generalizzazione ad altre patologie ortopediche e neurodegenerative invalidanti.

Ampliamento del *consensus* scientifico fino ad ora raggiunto circa l'utilizzo di criteri e metodi di test standardizzati per il *technical assessment* di strumenti per baropodometria. Redazione di linee guida ufficiali. Identificazione delle caratteristiche tecniche e delle prestazioni delle soluzioni commerciali innovative attualmente sul mercato. Realizzazione di studi comparativi "sul campo", su strumentazione per baropodometria fissa e indossabile. Costruzione, validazione e utilizzo di strumenti e metodi per periodici test "sul campo".

Redazione di proposte di norme tecniche nell'ambito dell'attività del Comitato Elettrotecnico Italiano (CEI) in materia di dispositivi elettromedicali, auspicabilmente da estendere a livello internazionale.

### **Trasferibilità dei risultati**

Disseminazione di metodologie standardizzate per la valutazione di anomalie funzionali dell'appoggio e del danno motorio a carico dell'arto inferiore. Disseminazione di tecniche di valutazione di efficacia di soluzioni ortesiche e terapeutico-riabilitative in presenza di neuropatia diabetica. Integrazione a regime delle metodiche proposte presso l'ambulatorio diabetologico del Policlinico Tor Vergata.

Produzione di materiale scientifico per la disseminazione e la didattica in materia di caratteristiche metrologiche e di prestazioni delle soluzioni commerciali baropodometria, nonché dei risultati della attività internazionale di *consensus*. Produzione di analogo materiale preliminare in materia di altra fondamentale strumentazione per analisi del movimento.

Disseminazione di materiale informativo circa le eventuali proposte di norme tecniche formulate e accettate in ambito CEI.

### **Valutazione di modelli di teleconsulto specialistico e monitoraggio dell'esposizione nella diagnostica medica**

Attualmente i filoni di studio riguardano:

- Telepatologia e Tele-ecocardiografia
- Da alcuni anni nel Reparto sono state affrontate tematiche relative alla realizzazione di sistemi per il teleconsulto nell'ambito della Telepatologia (con particolare riferimento alla Telecitologia) e nella Tele-ecocardiografia documentati da diversi lavori sulle riviste del settore e gli *Annali dell'ISS* (vol. 45 fasc. 4 del 2009; vol. 46 fasc. 2 del 2010) che permettono la realizzazione della diagnosi a distanza.
- Per quanto riguarda la Teleradiologia si tratta di uno strumento potente, oggi a disposizione, che permette lo scambio di immagini tra le unità ospedaliere di radiologia digitale per la telediagnosi. Per l'interdisciplinarietà del caso, forte sarà la collaborazione con gli altri Reparti che si occupano di problematiche inerenti la radiodiagnostica e il relativo controllo di qualità.
- Per quanto riguarda l'esposizione l'attenzione sarà posta sulla radiodiagnostica. È noto che l'art. 12 del DL.vo 187/2000 richiede alle Regioni la valutazione dell'esposizioni mediche con frequenza quinquennale.

È stato costituito a tal fine un gruppo di lavoro nazionale per rispondere ad un progetto europeo denominato DATAMED2 che affronta questa problematica, tenendo conto che alcune Regioni si sono già attivate (Emilia-Romagna, Friuli-Venezia Giulia, Lombardia e Toscana, Umbria) e hanno svolto negli scorsi anni almeno un'indagine regionale.

### **Risultati attesi nel triennio**

Per quanto riguarda la Telepatologia, la Tele-ecocardiografia e la Teleradiologia in linea con quanto già ottenuto per altri settori telemedici ci si aspetta di ottenere in collaborazione con altri Reparti specifici risultati nei seguenti ambiti:

- Valutazione di modelli di servizio telemedico per l'SSN.
- Studio di percorsi ottimali di standardizzazione di servizi telemedici preesistenti.

Per quanto riguarda l'esposizione nella radiodiagnostica, l'ambito è quello della radioprotezione, e si definiranno i modelli di gestione appropriati nel caso delle procedure per il monitoraggio dell'esposizione in radiodiagnostica ai sensi dell'art. 2 del DL.vo 187/2000.

In presenza di una base di dati regionali riguardante un campione sufficiente (almeno il 25% della popolazione), si otterrà un dato nazionale ai fini dell'indagine europea DATAMED2. I risultati, rappresentano la prima valutazione italiana relativamente alle

esposizione mediche in radiodiagnostica, e potranno essere trasmessi all'*United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR)* per l'inserimento nei report internazionali periodici. Il gruppo di lavoro inviterà i fisici di altre Regioni e coinvolgerà i relativi organismi regionali che vorranno partecipare ai lavori aumentando la dotazione di competenze.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La trasferibilità dei risultati avverrà attraverso gli schemi classici della disseminazione scientifica, e principalmente attraverso congressi, riviste internazionali e Rapporti Istisan. Particolare spazio verrà dato nel caso della Telepatologia, Tele-ecocardiografia e Teleradiologia allo sviluppo di linee guida per la definizione di modelli, per la standardizzazione e per il controllo di qualità in ambito telemedico seguendo le indicazioni del PSN e l'attività dell'autorità competente. Per quanto riguarda la valutazione dell'esposizione nella radiodiagnostica sono previsti:

- alcuni workshop specifici sia sul territorio nazionale che internazionale;
- la realizzazione di un Rapporto Istisan con i risultati del Gruppo di lavoro.

#### **Valutazione di sicurezza e prestazioni dei dispositivi impiantabili cardiovascolari e validazione di procedure ricostruttive in ambito cardiocirchirurgico tramite studio fluidodinamico sperimentale e computazionale**

I DM innovativi hanno reso possibili significativi progressi nel trattamento delle patologie del sistema cardiovascolare. Nonostante l'esperienza di ormai diversi decenni, per certi dispositivi, l'impianto di un DM non è comunque mai totalmente privo di complicanze, a causa dell'interazione con l'ospite (es. tromboembolismo ed emolisi, nel caso di dispositivi di assistenza circolatoria e valvole cardiache). Pertanto, è di importanza fondamentale valutare diversi aspetti progettuali e costruttivi, in particolare la fluidodinamica associata al DM stesso. L'aspetto fluidodinamico è particolarmente critico in quanto, ad esempio, gli occlusori di una valvola meccanica costituiscono, a differenza della valvola nativa, un ostacolo al flusso sanguigno, determinando così alti gradienti di velocità e conseguente produzione di turbolenza. Gli sforzi di taglio associati alla turbolenza costituiscono una sollecitazione potenzialmente letale per la membrana eritrocitaria, quindi è necessario misurare accuratamente tali sforzi. Si propone la caratterizzazione fluidodinamica dei DM cardiovascolari impiantabili, tramite diagnostica laser non invasiva (PIV, LDA). Un altro obiettivo di ricerca sarà l'indagine su procedure chirurgiche per il trattamento di patologie congenite del sistema cardiovascolare (es. circolazione univentricolare, malformazioni a carico della circolazione venosa), tramite modelli otticamente trasparenti dei distretti anatomici di interesse.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Un primo obiettivo dell'attività di fluidodinamica sperimentale sarà la caratterizzazione dei flussi di rigurgito di protesi valvolari meccaniche, tramite un modello fisico della circolazione progettato e realizzato presso l'ISS, che consente un'agevole visualizzazione del flusso da più punti di vista, ed è ottimizzato per indagini con la tecnica stereo-PIV, che prevede la ricostruzione del campo di velocità tramite analisi di immagini sincrone di particolare, riprese da due telecamere. Un altro tipo di DM per cui la valutazione fluidodinamica è essenziale è dato dai DM per *transcatheter aortic valve implantation (TAVI)*, sui quali si intende continuare lo studio computazionale e completarlo con quello sperimentale.

Più generalmente, si intende qualificare i parametri proposti in letteratura per la valutazione dell'impatto degli sforzi associati alla turbolenza, in relazione alla possibilità di definire soglie critiche per il danno ematico.

Gli studi sperimentali offriranno inoltre una base di confronto per gli studi computazionali, nei casi in cui l'approccio in silico non garantisca ancora un'accuratezza sufficiente, data la complessità e l'intrinseca non linearità del problema.

L'indagine computazionale offrirà una base di valutazione per l'ottimizzazione dei parametri geometrici delle procedure chirurgiche ricostruttive, nel caso dello studio sulla circolazione univentricolare, e più in generale in sede di valutazione delle patologie del ritorno venoso (Kawashima, ecc.).

#### **Trasferibilità dei risultati**

Attività di divulgazione relativamente agli aspetti teorici e alle applicazioni (in particolare cliniche) rilevanti per l'impianto protesico, definizione di indicazioni di rischio, valutazione delle complicanze e della loro rilevanza in funzione del risultato atteso per dispositivi medici sul mercato conformi ai requisiti delle direttive comunitarie. Validazione delle prestazioni fluidodinamiche di particolari procedure chirurgiche, con un approccio orientato al paziente, in collaborazione con importanti strutture cliniche dell'area romana (es. Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma). Tale collaborazione, già attiva da diverso tempo con un riscontro in termini di pubblicazioni sulle riviste internazionali di riferimento nell'ambito sia clinico che bioingegneristico, garantisce la pronta trasferibilità nella pratica clinica dei risultati ottenuti.

### **Valutazione e prevenzione dei rischi sanitari dei campi elettromagnetici**

La grande diffusione delle sorgenti di campi elettromagnetici, e il continuo sviluppo di nuove tecnologie che emettono tale agente fisico, determinano un complesso quadro di esposizioni umane ai campi elettromagnetici nei vari ambienti di vita e di lavoro, comprese le strutture sanitarie. Ai fini della valutazione e prevenzione dei rischi per la salute umana connessi a queste esposizioni saranno svolte diverse attività. Sarà continuamente aggiornata la conoscenza delle sorgenti di campo elettromagnetico, delle caratteristiche più rilevanti dei campi emessi e delle modalità di esposizione delle persone. Le esposizioni ai campi elettrici e magnetici a frequenze estremamente basse emessi da linee elettriche e cabine di trasformazione saranno valutate sperimentalmente e teoricamente, mentre in relazione alle esposizioni ai campi elettromagnetici a radiofrequenza e microonde verranno utilizzate tecniche dosimetriche per la determinazione dei campi elettrici indotti all'interno del corpo umano esposto. Valutazioni dosimetriche verranno effettuate anche nei confronti dei campi magnetici a bassa frequenza utilizzati nelle applicazioni diagnostiche della Risonanza Magnetica. Saranno inoltre condotti studi sugli effetti biologici dei campi elettromagnetici e si parteciperà a studi epidemiologici. I prodotti di questo lavoro saranno utilizzati per fornire il contributo dell'ISS all'elaborazione di efficaci strategie di prevenzione nei confronti dei campi elettromagnetici.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Contributo dell'ISS, fondato su un qualificato lavoro di analisi e ricerca, all'identificazione e valutazione dei rischi sanitari connessi con le esposizioni umane ai campi elettromagnetici. Si prevede anche un contributo significativo al dibattito sulla giustificazione e l'efficacia di eventuali misure cautelative nei confronti di rischi per la salute non ancora accertati quali quelli connessi agli effetti a lungo termine dei campi elettromagnetici.

Caratterizzazione delle esposizioni del paziente e dei lavoratori ai campi elettromagnetici utilizzati in risonanza magnetica e in altre applicazioni dei campi elettromagnetici nelle

strutture sanitarie, ai fini di una corretta valutazione rischio-beneficio nel caso del paziente, nonché della protezione dei lavoratori.

Un altro risultato di questo progetto sarà il contributo, mediante l'utilizzo di tecniche sperimentali e teoriche di valutazione dell'esposizione ai campi elettromagnetici, a studi epidemiologici i cui risultati potranno essere considerati anche un prodotto del presente progetto di ricerca.

Il presente progetto fornirà inoltre strumenti di valutazione dosimetrica dei sistemi biologici esposti ai campi elettromagnetici a fini di ricerca sperimentale di laboratorio *in vivo* e *in vitro*.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti potranno contribuire ad una migliore caratterizzazione dei rischi connessi alle esposizioni umane ai campi elettromagnetici. La valutazione del rischio rappresenta l'elemento di riferimento che permette di trasferire il contributo qualificato e aggiornato dell'ISS nelle attività di consulenza, supporto e verifica, svolte in ambito nazionale, in particolare nei riguardi dell'SSN.

I risultati delle attività scientifiche di prevenzione e protezione sono utilizzabili per l'attuazione di programmi specifici di riduzione del rischio basati sia sull'aggiornamento delle norme sia su strumenti di informazione ed educazione sanitaria rivolti ai cittadini esposti in ambienti di vita, ai lavoratori esposti in ambienti di lavoro e a soggetti e gruppi particolarmente a rischio.

### **Valutazione e prevenzione dei rischi sanitari delle radiazioni ottiche**

Il Reparto di Radiazioni non ionizzanti si occupa della valutazione dei rischi sanitari delle esposizioni alle radiazioni ottiche (infrarossi, luce, ultravioletti), non coerenti o coerenti (laser).

In relazione alla radiazione ultravioletta (UV), solare e artificiale, si proseguirà l'attività sperimentale di dosimetria personale e ambientale.

Per quanto riguarda la radiazione visibile non coerente, verranno analizzati i rischi connessi all'utilizzo delle nuove tecnologie a diodo ad emissione luminosa (*Light Emitting Diode*, LED) che rappresentano una nuova e sempre più diffusa causa di esposizione della popolazione alla "luce blu", responsabile della retinite indotta fotochimicamente. Tale attività sarà effettuata in collaborazione con l'ISPRA per quanto riguarda le tecnologie a LED applicate all'illuminazione di ambienti *outdoor*. L'analisi dei rischi riguarderà, anche nell'ambito delle attività di consulenza per il Ministero della Salute, anche l'utilizzo di tali tecnologie nei giocattoli. Sarà pertanto condotta un'analisi critica delle normative di protezione esistenti per quanto riguarda la loro applicabilità alle esposizioni dei bambini.

L'analisi dei rischi connessi alle sorgenti laser sarà svolta nell'ambito delle attività di consulenza per il Ministero della Salute in relazione a sorgenti sequestrate dai NAS e inviate all'ISS per i necessari accertamenti circa il rispetto delle normative di sicurezza, nonché nell'ambito di richieste della Magistratura.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Sviluppo della dosimetria personale della radiazione ultravioletta solare e confronto con le determinazioni di dosimetria ambientale effettuate in collaborazione con il Centro per la meteorologia della Aeronautica Militare di Vigna di Valle e con il CNR. Avvio di una collaborazione anche su questo tema con l'ISPRA nell'ambito della tematica "Esposizione della popolazione alle radiazioni non ionizzanti in situazioni ambientali complesse: metodiche di misura e valutazioni sperimentali e teoriche".

Aggiornamento delle conoscenze circa i rischi connessi alle esposizioni alle sorgenti di “luce blu”. Valutazione dell’appropriatezza delle norme di protezione esistenti in relazione alle esposizioni dei bambini.

Valutazione della classe di pericolosità delle sorgenti laser in commercio sul territorio nazionale e sequestrate dai NAS o su ordine della Magistratura.

Le radiazioni ottiche in generale trovano diverse applicazioni nel campo dei trattamenti estetici, dall’abbronzatura artificiale alla depilazione con laser e lampade a luce pulsata. Un risultato del progetto sarà quindi la valutazione dei rischi per i fruitori dei trattamenti, nonché per i lavoratori esposti, in sede di definizione di aggiornamenti del regolamento di attuazione della legge n. 1 del 1990 relativa alla disciplina di estetista che prescrive le caratteristiche e le modalità d’uso di varie apparecchiature, tra cui quelle che emettono radiazioni ottiche.

#### ***Trasferibilità dei risultati***

Lo sviluppo della ricerca nel campo della dosimetria personale della radiazione UV costituisce il modo più efficace per quantificare il rischio di danni a breve e a lungo termine sulla pelle e sull’occhio.

Le maggiori conoscenze sui rischi da “luce blu” permetteranno di dare un contributo qualificato allo sviluppo di normative specifiche a livello nazionale, nonché al dibattito sull’adeguatezza di linee guida e normative di protezione emanate a livello internazionale.

Le determinazioni sperimentali su sorgenti quali i puntatori laser continueranno a fornire un supporto alle attività di prevenzione svolte dal Ministero della Salute con l’ausilio dei NAS. Tale supporto risentirà inevitabilmente della situazione di grave sottodimensionamento di cui soffre il Reparto di Radiazioni non ionizzanti.

I risultati delle valutazioni di rischio relative all’impiego delle radiazioni ottiche nei trattamenti estetici saranno trasferiti in sede di regolamentazione delle attività di estetista.

**Dipartimento  
Tecnologie e salute**

---

**Attività di controllo, valutazione, parere**



### **Accertamento di idoneità delle strutture e delle attrezzature dei centri clinici di trapianto di organi**

Questa attività è stata inizialmente assegnata per legge all'ISS (art. 10 della L. 2/12/1975 n. 644) e dal 1986 viene svolta dal Laboratorio di Ingegneria Biomedica, confluito nel 2003 nel Dipartimento TES. Con la legge 1/4/1999 n. 91, che riordina la materia e istituisce il CNT, l'attività prosegue sulla base di successive ordinanze del Ministero della Salute (ultima dell'8/8/2001) che hanno prorogato la precedente disciplina di autorizzazione, in attesa del decreto ministeriale di attuazione previsto all'art. 16 della stessa legge. Successivamente, con la riforma costituzionale del 2001, la materia è diventata di competenza regionale ed è stata oggetto di provvedimenti della Conferenza Stato Regioni. Si applicano in particolare gli accordi del 14/2/2002 e del 29/4/2004, ove vengono esplicitamente riconosciute all'ISS competenze per lo svolgimento delle attività di verifica ai fini autorizzativi e per la definizione di standard strutturali e logistici. Nello svolgimento pratico degli accertamenti si presentano solitamente tre fasi successive:

- analisi della documentazione tecnica riguardante le strutture edili, gli impianti tecnologici e le principali apparecchiature, assieme alle risorse e procedure utilizzate per la loro gestione;
- sopralluogo presso i centri clinici, con esecuzione di verifiche e misure per accertamento di idoneità e classificazione di alcuni impianti tecnologici, secondo la normativa tecnica esistente e criteri elaborati in base alla letteratura scientifica;
- redazione di una relazione tecnica, con discussione dei risultati del sopralluogo, analisi delle capacità di gestione tecnica e parere finale di idoneità.

Per quanto riguarda la definizione degli standard strutturali e logistici l'attività si realizza mediante partecipazione all'attività della Consulta permanente per i trapianti, del CNT e di progetti di ricerca finalizzata finanziati dal Ministero della Salute.

#### **Attività programmata**

Si prevede che le attività descritte continueranno a svolgersi in collegamento con il CNT e con i Centri Regionali, con alcuni aggiornamenti riguardo gli obiettivi e le modalità organizzative.

In primo luogo si dovrà operare, in accordo con il CNT, per razionalizzare il complesso insieme delle procedure di accreditamento e verifica utilizzate nei centri trapianto delle varie Regioni, per dare continuità e certezza all'azione di controllo e mantenere l'elevato standard qualitativo delle strutture fin qui garantito.

Per quanto riguarda gli aspetti tecnici occorre notare che il processo di rinnovo delle strutture ospedaliere, l'affermarsi di centri multiorgano e l'evoluzione in generale delle tecnologie rendono urgente un adeguamento delle linee guida, sia per quanto si riferisce ai requisiti strutturali e strumentali che per le procedure e sistemi gestionali.

Si prevede infine di dover procedere ad un adeguamento della strumentazione di misura impiegata e all'aggiornamento della documentazione tecnica di riferimento.

### **Analisi mediante tecniche di microscopia elettronica analitica di campioni biologici e non-biologici**

Attività di analisi con tecniche di microscopia elettronica analitica (microscopia elettronica a scansione e microanalisi a raggi X mediante spettroscopia a dispersione di energia) su richiesta di strutture dell'SSN, dei NAS dei Carabinieri, di organi di polizia giudiziaria e/o di enti privati di:

- campioni biologici, quali cellule, microrganismi, reperti biotipici e autotipici, per la determinazione di caratteristiche morfologiche e strutturali;

- campioni non-biologici, quali polveri, fibre, materiali in massa per la determinazione di caratteristiche morfologiche, strutturali e chimiche.

Attività di controllo su DM non attivi anche ai fini della certificazione e/o rinnovo del marchio CE.

#### **Attività programmata**

Le attività sopra descritte proseguiranno nel prossimo triennio 2012-2014.

### **Assicurazione della Qualità**

La certificazione secondo le direttive europee per la libera circolazione dei DM prevede l'ispezione e il controllo del sistema di qualità dei fabbricanti. Questa attività viene svolta dall'Istituto nella sua veste di Organismo Notificato e prevede ispezioni annuali ai siti produttivi. Per questa attività è necessaria una competenza specifica sulle normative europee che regolano la gestione dei sistemi di assicurazione della qualità.

#### **Attività programmata**

L'attività relativa ai prodotti certificati da questa sezione di ON 0373 (presso il Dipartimento TES), in termini di certificati emessi e ispezioni ai sistemi di qualità dei produttori il lavoro svolto nell'anno 2011 assomma a 38 certificati di tipo emessi, 97 certificati dei sistemi di qualità emessi, otto ispezioni ai sistema di qualità dei produttori.

In termini economici la stessa attività ha portato alla emissione di fattura per un ammontare totale pari a 312.739 (di cui 246.561 € per la certificazione di tipo secondo l'allegato III della direttiva comunitaria e 66.178 € per la certificazione dei sistemi di qualità dei produttori secondo l'allegato V della direttiva comunitaria).

### **Assicurazione di Qualità in radioterapia (e radiodiagnostica)**

Nel Dipartimento TES, la valutazione tecnologica nelle scienze radiologiche costituisce una delle tematiche portanti, in continuità con le tematiche di radioprotezione del paziente.

La qualità del trattamento radioterapico è un argomento di attenzione prioritario da parte degli operatori del settore. La garanzia di qualità in radioterapia è divenuta una procedura obbligatoria in base al DL.vo n. 187 del 26/5/2000, in recepimento della direttiva europea 97/43.

Per sviluppare in ambito nazionale delle linee guida su questo tema, in analogia a quanto fatto dagli altri Paesi europei, il Dipartimento TES dell'ISS ha attivato da molti anni Gruppi di studio interdisciplinari composti, oltre che da personale dell'ISS, da tutte le principali figure professionali coinvolte nel campo della radioterapia, i.e., medici oncologi radioterapisti, esperti in fisica medica e tecnici sanitari di radiologia medica. L'attività dei Gruppi di studio sull'Assicurazione di Qualità in Radioterapia (AQR) è volta ad affrontare tematiche emergenti, in risposta a quanto richiesto dai Centri di Radioterapia, sia attraverso l'elaborazione di linee guida, sia nel campo della formazione con l'organizzazione di Corsi-dibattito. Attualmente sono coinvolti in questa attività i Reparti di Biofisica delle radiazioni ionizzanti, Dosimetria delle radiazioni ionizzanti e difetti radio indotti e Tecnologie fisiche in biomedicina.

Dalla costituzione del primo Gruppo di studio ad oggi, sono stati elaborati 26 documenti, pubblicati come Rapporti tecnici ISTISAN, su tematiche riguardanti argomenti generali, tecniche speciali, quali: brachiterapia, *Total Body Irradiation* (TBI), IORT, IMRT, oltre alla progettazione e realizzazione di interconfronti dosimetrici, studi pilota per l'implementazione di audit clinici, aspetti etici e formazione. Su alcuni di questi argomenti sono anche uscite pubblicazioni su riviste internazionali.

In ambito radiodiagnostico un analogo gruppo di studio di più recente costituzione, che ha visto coinvolti i medici radiologi oltre alle altre già citate figure professionali, ha elaborato e pubblicato come Rapporti ISTISAN due documenti sulla garanzia di qualità in radiodiagnostica.

#### **Attività programmata**

Sulla base della forte richiesta da parte dei Centri italiani di radioterapia e dei Servizi di fisica sanitaria, ci si propone di proseguire l'attività in ambito AQR. Uno degli elementi caratterizzanti l'attività in questo settore è l'attenzione ai continui sviluppi tecnologici che rende mandatoria la necessità di linee guida sulle nuove tematiche emergenti, ma anche l'aggiornamento periodico delle linee guida già elaborate. Particolare attenzione sarà dedicata alle tecniche speciali. Una richiesta in questa direzione ci è già pervenuta in relazione alle linee guida sulla IORT. Tra le attività previste rientra anche il proseguimento dell'attività legata al Questionario conoscitivo sull'IMRT. I progressi tecnologici citati, pur associandosi ad enormi vantaggi clinici per il paziente presentano maggiori criticità intrinseche rispetto alla radioterapia convenzionale. Questo aspetto impone una adeguata valutazione e gestione del rischio correlato al loro impiego. Il Gruppo di studio sull'AQR prevede di promuovere, in linea con quanto accade a livello europeo, iniziative di formazione ed elaborazione di linee guida dedicate. Per quanto riguarda la radiodiagnostica, è in fase di valutazione sulla base delle risorse umane il prosieguo dell'attività del Gruppo di studio sull'AQ in radiodiagnostica.

#### **Attività di controllo connesse alla farmacovigilanza**

Effettuazione di controlli mediante microscopia elettronica analitica dei corpi estranei nei farmaci (Circolare del Ministero della Sanità n. 4 del 26/2/1997).

#### **Attività programmata**

L'attività sopra descritta proseguirà durante il prossimo triennio 2012-2014.

#### **Certificazione di prodotto dei DM**

La certificazione dei DM è un'attività complessa che consiste nella verifica e attestazione della conformità dei prodotti ai requisiti essenziali indicati nell'allegato I delle Direttive europee (93/42CEE, 90/385/CEE) che ne regolano la libera circolazione. L'attività, in funzione della classificazione del DM e della procedura richiesta dai produttori, è basata su: prove tecniche finalizzate alla verifica della sicurezza, in accordo alle norme europee, o in assenza di norme a specifici protocolli realizzati allo scopo. Tale attività sperimentale è svolta utilizzando le competenze e le strutture dei laboratori di prova del Laboratorio del Dipartimento TES o di altri Laboratori dell'Istituto qualora necessario. Valutazione del progetto e delle attività di qualificazione del prodotto effettuate dal fabbricante. Valutazione della sicurezza e dell'efficacia basata sui dati clinici forniti dal fabbricante. Tale attività è svolta, in caso di prodotti innovativi, utilizzando le competenze di una commissione di esperti clinici del settore specifico. Questa attività dovrebbe essere mantenuta e finanziata almeno grazie alle tariffe del Decreto del Presidente dell'Istituto del 14/5/2010 sulla base del quale i fabbricanti effettuano i pagamenti per la certificazione richiesta. Attualmente vengono emessi dall'Organismo Notificato Sezione presso il Dipartimento TES oltre 100 certificati/anno. L'attività potrebbe essere ulteriormente incrementata considerando che i dispositivi medici appartengono ad oltre 30.000 diverse famiglie, ma occorre considerare che uno sviluppo di questa attività (qualunque tipo di controllo si debba effettuare, anche se

limitato ai dispositivi con rischio medio alto) implica un importante utilizzo di risorse (attrezzature, personale, spazi) e competenze (formazione).

#### **Attività programmata**

La certificazione dei DM è un'attività complessa che consiste nella verifica e attestazione della conformità dei prodotti ai requisiti essenziali indicati nell'allegato I delle Direttive europee (93/42/CEE, 90/385/CEE, 2007/47/CE, 2003/32/CE) che ne regolano la libera circolazione. L'attività, in funzione della classificazione del DM e della procedura richiesta dai produttori, è basata su: prove tecniche finalizzate alla verifica della sicurezza, in accordo alle norme europee, o in assenza di norme a specifici protocolli realizzati allo scopo. Tale attività sperimentale è svolta utilizzando le competenze e le strutture dei laboratori di prova del Dipartimento TES o di altri Laboratori dell'Istituto qualora necessario. Valutazione del progetto e delle attività di qualificazione del prodotto effettuate dal fabbricante. Valutazione della sicurezza e dell'efficacia basata sui dati clinici forniti dal fabbricante. Questa attività dovrebbe essere mantenuta e finanziata almeno grazie alle tariffe del Decreto del Presidente dell'Istituto del 14/5/2010 sulla base del quale i fabbricanti effettuano i pagamenti per la certificazione richiesta. Attualmente vengono emessi dall'Organismo Notificato, sezione presso il Dipartimento TES, oltre 100 certificati/anno.

#### **Consulenza ed elaborazione di normativa di radioprotezione**

L'attività è finalizzata alla preparazione di documenti e alla formulazione di pareri relativi ai progetti di normativa riguardante la protezione dalle radiazioni ionizzanti. Tale consulenza si esplica nei riguardi del Ministero della Salute, ma anche del Governo e di organi dell'SSN, principalmente attraverso la partecipazione al "Comitato di coordinamento per gli interventi per la radioprotezione dei lavoratori e della popolazione", ai gruppi di studio istituiti dal Ministero della Salute, alle riunioni del CSS e alla Commissione "Grandi Rischi" della Protezione Civile. Una parte importante dell'attività di consulenza è legata all'elaborazione delle normative e delle linee guida previste dai DL.vi 187/2000, 241/2000 e 257/2001, nonché all'applicazione del DL.vo 230/1995, in materia di protezione sanitaria dalle radiazioni ionizzanti sia in campo medico che nei confronti della popolazione e dei lavoratori. I seguenti argomenti richiederanno particolari approfondimenti, anche per la preparazione di specifiche linee-guida: i) procedure relative alle pratiche radiologiche clinicamente sperimentate; ii) criteri di riferimento per le esposizioni mediche; iii) raccomandazioni per l'espletamento di verifiche cliniche in ambito professionale specialistico; iv) criteri di accettabilità delle apparecchiature radiologiche; v) valutazione dei piani di emergenza radiologica; vi) informazione alla popolazione nelle emergenze radiologiche.

Partecipazione agli incontri IAEA, nell'ambito della delegazione NEA, per la discussione del documento preliminare su *Basic Safety Standard* e rilascio versione 2 dello stesso. Partecipazione alle riunioni annuali del *Committee on Radiation Protection and Public Health* (CRPPH).

#### **Attività programmata**

Si prevede di continuare e sviluppare le attività in corso sulla base delle problematiche attuali o di quelle che emergeranno nel corso del triennio. Tali attività istituzionali sono subordinate alla disponibilità di fondi, necessari quantomeno alla partecipazione alle riunioni dei gruppi di lavoro e plenarie.

## **Disattivazione impianti nucleari e gestione rifiuti radioattivi**

I rifiuti radioattivi presenti in Italia derivanti sia dalle passate attività nucleari sia dalle attuali attività propedeutiche alla disattivazione degli impianti, sono immagazzinati negli stessi siti dove furono prodotti. Questi rifiuti sono solo in parte condizionati, cioè trasformati in manufatti opportunamente cementati. Per quanto riguarda il combustibile irraggiato è in corso il suo trasferimento all'estero per le operazioni di ritrattamento. Al fine di consentire lo smantellamento accelerato delle centrali dismesse va affrontato al più presto un problema, del quale si discute da diversi anni, che è quello di dare una adeguata sistemazione ai rifiuti radioattivi che comportano un'eredità pesante per le popolazioni future. Vanno quindi realizzati nuovi depositi temporanei dei rifiuti presso gli impianti e va inoltre individuato in tempi brevi un sito dove realizzare un deposito nazionale di tutti i rifiuti radioattivi presenti sul territorio nazionale e di quelli derivanti dal trattamento del combustibile irraggiato che dovranno rientrare in Italia. Nel corso del 2008 sono state definite le procedure e le metodologie per la scelta del sito nazionale e i criteri per l'individuazione di aree idonee per la localizzazione del deposito.

### **Attività programmata**

Nel corso del triennio 2012-2014 si prevede di continuare ad affrontare le seguenti tematiche:

- gestione dei rifiuti radioattivi;
- smantellamento impianti nucleari;
- realizzazione di idonee strutture di deposito dei rifiuti radioattivi.

Tali problematiche vengono affrontate nell'ambito della Commissione Tecnica per la Sicurezza Nucleare e la Protezione Sanitaria (art. 9, DL.vo 230/95). Sono stati già approvati i progetti di disattivazione della centrale del Garigliano e dell'impianto FN di Bosco Marengo e i depositi temporanei presso le centrali del Garigliano e di Latina, mentre è ancora in corso l'esame del progetto di disattivazione delle centrali nucleari di Trino Vercellese e di Latina.

## **Identificazione degli alimenti irradiati**

Attualmente in Europa il trattamento con radiazioni ionizzanti è disciplinato dalle direttive quadro 1999/2/CE e 1999/3/CE recepite nel nostro Paese dal DL.vo 30/1/2001, n. 94.

Tali direttive stabiliscono, a maggior tutela della libera scelta del consumatore, che tutti gli alimenti e/o ingredienti che vengono sottoposti al trattamento con radiazioni ionizzanti, debbano riportare in etichetta la dicitura "irradiato" e che ogni stato membro debba effettuare controlli sugli alimenti presenti sul mercato al fine di individuare la correttezza dell'etichettatura.

La normativa vigente demanda all'ISS i seguenti compiti:

- Consulenza allo Stato per gli aspetti riguardanti il rilascio del nulla osta degli impianti di irraggiamento.
- Consulenza allo Stato e alle Regioni per gli aspetti riguardanti i metodi di identificazione degli alimenti irradiati.
- Definizione dei metodi di identificazione da implementare e utilizzare a livello regionale.
- Analisi di revisione.
- Attività di formazione.
- Ricerca e sviluppo nell'ambito dei metodi di identificazione.

Tali compiti vengono svolti in collaborazione con il Dipartimento SPVSA.

### **Attività programmata**

Si porteranno avanti le attività previste dalla normativa vigente, in relazione alle problematiche che emergeranno nel periodo. In particolare, si prevede di proseguire:

- l'attività di controllo attraverso l'esecuzione di analisi di revisione su matrici di origine animale e vegetale;
- l'attività di formazione rivolta ai laboratori regionali coinvolti nel controllo ufficiale, relativamente all'applicazione dei metodi di analisi basati su tecniche di tipo fisico.

### **Prove di laboratorio e valutazione tecnica di DM per cardiostimolazione**

Il laboratorio di prova per i pacemaker e i relativi programmatori e accessori ha iniziato la sua attività nel 1984 nell'ambito della normativa italiana prevista dal DM n. 72 del 3/11/1984 per l'autorizzazione all'immissione in commercio di tali prodotti. Attualmente il laboratorio di prova opera a supporto delle seguenti attività:

- Certificazione del tipo secondo lo schema della direttiva 90/385/CEE sui dispositivi medici impiantabili attivi (DMIA) in conformità all'allegato III. Tale attività prevede l'esecuzione di attività di controllo sia documentale che sperimentale. La prima attività consiste nella valutazione dei contenuti del dossier tecnico del prodotto che prende in considerazione aspetti specifici inerenti il DM, quali gli schemi di progettazione, le specifiche dei materiali, i metodi di fabbricazione, la rispondenza ai requisiti essenziali previsti dalla direttiva, l'analisi del rischio, la valutazione clinica, gli aspetti legati alle istruzioni e all'etichettatura dei dispositivi, gli eventuali processi speciali, aspetti legati alla sterilizzazione e biocompatibilità dei materiali utilizzati. La seconda attività, quella sperimentale, consiste invece nell'effettuazione di prove tecniche sul prodotto, quali prove meccaniche, elettriche, termiche, compatibilità elettromagnetica etc. tendenti a valutare l'affidabilità, la sicurezza e il corretto funzionamento del dispositivo.
- Valutazione del rischio associato con l'uso dei DMIA ai fini dell'emissione di pareri per gli organi dell'SSN.
- Controllo ai fini della sorveglianza del mercato e vigilanza sui DMIA oggetto di incidente o quasi incidente sui prodotti sequestrati dai NAS sul territorio nazionale. Anche in questo caso si tratta di una attività di controllo sia documentale che sperimentale tendente ad accertare che i dispositivi siano fabbricati in conformità alle norme tecniche, siano esse armonizzate o meno.
- Ispezioni al sistema di qualità messo in atto dalle ditte produttrici di DM mediante la messa a disposizione di esperti di tipo sul prodotto specifico che affiancano in sede di ispezione gli esperti della qualità.
- Elaborazione di normative e norme in ambito comunitario inerenti i DMIA. Anche questa attività si esplica con la partecipazione di esperti di prodotto a commissioni tecniche e a gruppi di lavoro sia in ambito nazionale: CEI, che internazionale: *Comité Européen de Normalisation Electrotechnique* (CENELEC).

### **Attività programmata**

Nel corso dei prossimi anni continuerà l'attività di certificazione dei DMIA che al solito prevede sia prove tecniche di laboratorio sui prodotti, che ispezioni al sistema di qualità messo in atto dalle ditte costruttrici. Nell'ambito di questa attività saranno sviluppati nuovi protocolli di prova; in particolare nel corso del 2012 verrà certificato per la prima volta dall'organismo notificato 0373 TES un analizzatore di soglia per pacemaker in ottemperanza alla direttiva 90/385/CEE. Inoltre verrà incrementata la valutazione dei rischi connessi con l'utilizzo dei DM. Tale valutazione riguarderà: l'esame di protocolli di sperimentazione

clinica di dispositivi medici innovativi, l'esame di report di incidenti o quasi incidenti sui DM; l'esame di pratiche riguardanti problematiche sui DM che verrà condotta nell'ambito della partecipazione di esperti dell'ISS alla commissione CUD e al CSS, e infine continuerà la consulenza in termini di pareri alle Regioni e in generale a tutti gli organi dell'SSN così come l'attività di supporto al Ministero della Salute per la sorveglianza e vigilanza del mercato sui DM e quella di supporto agli enti normatori sia nazionali che internazionali (CEI, CENELEC).

### **Rappresentanza nazionale e consulenza al Comitato Consultivo del Programma di ricerca EURATOM – Fissione Nucleare nella tematica prioritaria “Radioprotezione”**

L'attività riguarda la rappresentanza al Comitato Consultivo del Programma di ricerca EURATOM – Fissione Nucleare e il ruolo di consulenza per aspetti collegati, su richiesta del Comitato stesso.

La competenza fornita dall'ISS riguarda la radioprotezione, che rappresenta una delle tematiche prioritarie del Programma, dal momento che il consolidamento e lo sviluppo delle conoscenze e della competenza dell'Europa nelle scienze radiologiche sono essenziali per l'uso sicuro e competitivo della fissione nucleare e degli altri usi industriali e medici delle radiazioni ionizzanti, inclusa la gestione delle sorgenti naturali di radiazione

#### **Attività programmata**

Si prevede che tale attività, iniziata in corrispondenza al VI Programma Quadro Euratom e continuata con il VII (che per Euratom ha coperto il quinquennio 2007-2011), continuerà per l'attuale Programma Quadro, denominato FP7+2, coprendo il biennio 2012-2013. Essa comporterà la partecipazione, in generale a Bruxelles, di una persona per le riunioni del Comitato, l'esame dei documenti per la preparazione delle riunioni, la discussione delle problematiche con vari esperti dell'ISS e con l'altro rappresentante italiano, l'elaborazione dei rapporti al MIUR.

### **Valutazione degli aspetti etici relativi alle attività dell'ISS: partecipazione al Comitato etico dell'ISS in qualità di componente segretario**

È prevista attività istituzionale di valutazione e consulenza in relazione alle attività del Comitato etico dell'ISS. Il Dipartimento TES ospita la segreteria del Comitato, in quanto una sua componente è stata eletta segretaria del Comitato stesso nel corso della prima riunione. Le attività di segreteria sono previste dalla normativa a sostegno alle attività del Comitato. Il Comitato dovrà stabilire le nuove attività di consulenza e valutazione nei riguardi degli organi direttivi dell'Istituto in ottemperanza al DM 24/2/1999 che lo ha istituito. In particolare dovrà fornire le valutazioni sulle sperimentazioni cliniche dei medicinali previste dai Decreti ministeriali 18/3/98 e 19/3/98, oltre che su tutte le attività di competenza dell'ISS che richiedono una valutazione etica, comprese quelle svolte con finanziamenti esterni e i programmi multilaterali. La competenza specifica è conseguenza della pregressa partecipazione alla Commissione bioetica dell'ISS e alla partecipazione ai lavori del Comitato Nazionale di Bioetica.

#### **Attività programmata**

È prevista attività istituzionale di valutazione e consulenza in relazione alle attività del Comitato etico dell'ISS. Il Dipartimento TES ospita la segreteria del Comitato, in quanto una sua componente è stata eletta segretaria del Comitato stesso nel corso della prima riunione. Le attività di segreteria sono previste dalla normativa a sostegno alle attività del Comitato. Il Comitato dovrà stabilire le nuove attività di consulenza e valutazione nei riguardi degli

organi direttivi dell'Istituto in ottemperanza al DM 24/2/99 che lo ha istituito. In particolare dovrà fornire le valutazioni sulle sperimentazioni cliniche dei medicinali previste dai Decreti ministeriali 18/3/98 e 19/3/98, oltre che su tutte le attività di competenza dell'ISS che richiedono una valutazione etica, comprese quelle svolte con finanziamenti esterni e i programmi multilaterali. La competenza specifica è conseguenza della pregressa partecipazione alla Commissione bioetica dell'ISS e alla partecipazione ai lavori del Comitato Nazionale di Bioetica.

La valutazione dei progetti è connessa all'attività di esame della documentazione, di conservazione e gestione dell'archivio e di risposte e monitoraggio. Inoltre è prevista attività formativa anche per mezzo di partecipazione alla stesura di documenti su tematiche di rilevanza bioetica.

### **Valutazione dei rischi connessi con l'uso dei DM**

Il Dipartimento TES svolge attività di consulenza (pareri, interrogazioni parlamentari ecc.) verso il Ministro della Salute, le Regioni e in generale per tutti gli organismi dell'SSN nel settore della bioingegneria e in particolare nel settore dei DM. Tale attività è svolta sulla base dei risultati delle attività di ricerca, delle bibliografie internazionali, dei dati presenti in archivi specifici (es. FDA, MDD, ecc.) e delle normative europee e internazionali. In tale ambito, ad esempio, si esprimono pareri relativamente alla sicurezza ed efficacia dei DM, ai fini della loro certificazione europea, o relativamente alla sicurezza e l'efficacia delle apparecchiature biomediche, durante il loro utilizzo, e si effettuano studi per evitare o valutare possibili effetti avversi ed, in generale, i rischi per la salute dei cittadini, connessi con l'uso delle tecnologie biomediche.

Attualmente vengono emanati dal Laboratorio pareri e vengono eseguiti studi al fine di definire appropriate metodologie di analisi del rischio a partire dalla normativa armonizzata europea attualmente vigente (UNI EN ISO 14971).

Considerando il forte impulso avuto dalle tecnologie nel mercato della salute, come risulta da dati del Ministero della Salute e delle associazioni dei produttori, (i DM appartengono a decine di migliaia di famiglie diverse) emerge chiaramente la necessità di valutare i rischi connessi con il loro utilizzo.

A fronte di questa necessità si comprende quanto vasto sia il campo di competenza necessario così come quanto grande sia l'onere di acquisire o mantenere strumentazione allo stato dell'arte, e le risorse in generale.

#### **Attività programmata**

Il Dipartimento TES attività di consulenza (pareri, interrogazioni parlamentari, ecc.) verso il Ministro della Salute, le Regioni e in generale per tutti gli organismi dell'SSN nel settore della bioingegneria e in particolare nel settore dei DM. Tale attività è svolta sulla base dei risultati delle attività di ricerca del Dipartimento di TES, delle bibliografie internazionali, dei dati presenti in archivi specifici (es. FDA, MDD, ecc.) e delle norme europee e internazionali. In tale ambito, ad esempio, si esprimono pareri relativamente alla sicurezza ed efficacia dei DM, ai fini della loro certificazione europea, comprensivi del rischio BSE/TSE, relativamente alla sicurezza e l'efficacia delle apparecchiature biomediche, durante il loro utilizzo, e si effettuano studi per evitare o valutare possibili effetti avversi ed, in generale, i rischi per la salute dei cittadini, connessi con l'uso delle tecnologie biomediche. Considerando il forte impulso avuto dalle tecnologie nel mercato della salute, come risulta da dati del Ministero della Salute e delle associazioni dei produttori, (i DM appartengono a circa 30.000 famiglie diverse) emerge chiaramente la necessità di supportare con esperti la valutazione dei rischi connessi con il loro utilizzo.

## **Valutazione dei rischi sanitari delle radiazioni non ionizzanti**

Nel campo della valutazione dei rischi sanitari delle radiazioni non ionizzanti, il Reparto di Radiazioni non ionizzanti svolge tradizionalmente attività di valutazione delle esposizioni, dei connessi effetti biologici e infine dei rischi per la salute umana, in relazione ai campi elettromagnetici (campi elettrici e magnetici statici e a frequenze estremamente basse, campi elettromagnetici a radiofrequenza e microonde) e alla radiazione ottica (con particolare riferimento alla radiazione ultravioletta non coerente emessa dal sole e da sorgenti artificiali e alla radiazione laser). In relazione ai continui sviluppi tecnologici, e alla diffusione di sempre nuove sorgenti di radiazioni non ionizzanti, si sono avviate più recentemente attività di valutazione dei rischi connesse alle esposizioni, con particolare riferimento ai bambini e ad altri soggetti sensibili, alla “luce blu” emessa dalle nuove tecnologie a LED, e all’utilizzo di ultrasuoni in medicina, compresa la medicina estetica, e in estetica non medica. Tali attività di valutazione del rischio permettono di trasferire anche nelle attività di consulenza supporto e verifica, svolte in ambito nazionale, in particolare nei riguardi dell’SSN, il contributo qualificato e aggiornato dell’ISS. Particolarmente rilevante è il supporto del Reparto di Radiazioni non ionizzanti al Ministero della Salute e al CSS sulle problematiche sanitarie inerenti i campi elettromagnetici, con particolare riferimento alla problematica dei telefoni cellulari, nonché alla regolamentazione dei trattamenti estetici effettuati mediante apparecchiature che emettono radiazioni non ionizzanti.

### **Attività programmata**

Il Reparto di Radiazioni non ionizzanti si propone di proseguire l’attività di valutazione dei rischi per la salute delle esposizioni alle radiazioni non ionizzanti mediante analisi critica delle normative di protezione, valutazioni delle esposizioni anche in collaborazione con altri Enti, partecipazione a studi epidemiologici. Le attività saranno focalizzate nei seguenti ambiti: rischi per la salute e la sicurezza di lavoratori e pazienti derivanti dall’utilizzo nelle strutture sanitarie di tecnologie emergenti basate sui campi elettromagnetici; valutazione delle esposizioni a campi magnetici generati da cabine di trasformazione negli edifici residenziali nell’ambito di uno studio epidemiologico sulla leucemia infantile; rischi per la salute connessi all’utilizzo di lampade e lettini per l’abbronzatura artificiale, nonché alle esposizioni alla radiazione solare; in collaborazione con l’ISPRA verranno analizzati i possibili rischi per la salute connessi alle esposizioni della popolazione alla luce con forte componente blu emessa da impianti di illuminazione pubblica basati sulle tecnologie a LED; attività di studio e ricerca nel campo delle applicazioni degli ultrasuoni in medicina ed estetica.

## **Valutazione tecnica di artroprotesi di anca**

Come già svolto finora nell’ambito delle attività espletate dall’Organismo Notificato 0373, verranno esaminati i dossier tecnici forniti con il prodotto dalla Ditta che ha presentato domanda per ottenere autorizzazione per l’apposizione sul prodotto del marchio CE ai sensi della Direttiva della Comunità europea n. 93/42 relativa ai DM impiantabili non attivi. L’analisi del dossier e del prodotto verrà eseguita per verificarne la rispondenza ai requisiti essenziali come descritto nella predetta direttiva. Nel caso si ritenga necessario, verranno eseguite prove meccaniche come indicato dalle normative vigenti. Verranno inoltre formulati pareri su richiesta del Ministro e del Presidente dell’Istituto su problematiche inerenti l’utilizzo dei dispositivi ortopedici, e su richiesta dei NAS per segnalazioni di rotture dei dispositivi o per informazioni riguardanti i materiali utilizzati nella realizzazione di dispositivi ortopedici impiantabili.

**Attività programmata**

Nell'ambito delle attività espletate dall'ON 0373, la valutazione tecnica delle componenti protesiche articolari dell'anca ai fini dell'apposizione del marchio CE si svolgerà sulla base delle seguenti linee principali: esame della documentazione (dossier tecnici più eventuale documentazione aggiuntiva richiesta, esiti di studi specificatamente richiesti, evidenze da letteratura, ecc.) fornita dalle Ditte in relazione alle loro richieste di nuova certificazione, rinnovo, modifiche di prodotto, ecc.; esecuzione di prove meccaniche sui campioni di prodotto appositamente inviati dalle Ditte, utilizzando i *set-up* strumentali specificatamente realizzati e validati, e implementando le procedure redatte allo scopo, nel rispetto delle normative vigenti in materia; approfondimenti di tematiche biomeccaniche legate alle modalità di impianto e di utilizzo delle protesi, di interesse come potenziali fattori di rischio di fallimento di impianto, anche mediante l'utilizzo di metodi e modelli ad elementi finiti.

Medesimi approcci e metodologie verranno utilizzati per la formulazione di pareri, su richiesta del Ministro di pertinenza, del Presidente dell'Istituto e dei NAS, su problematiche inerenti l'utilizzo e il fallimento dei dispositivi ortopedici impiantabili, e sui materiali impiegati per la loro realizzazione.

**Centro nazionale  
AIDS per la patogenesi e vaccini contro HIV/AIDS**

---

**Attività di ricerca**



## **Analisi dei fattori associati alla diffusione e progressione dell'infezione da HIV-1 nei Paesi in via di sviluppo**

L'infezione da HIV-1 presenta un'elevata prevalenza nell'Africa subsahariana ove vi è carenza di strategie preventive, strutture assistenziali e limitata disponibilità di farmaci antiretrovirali. Inoltre, lo stato di malnutrizione e la presenza di infezioni concomitanti contribuiscono all'aggravamento del decorso dell'infezione. Pertanto, questa situazione socio-ambientale comporta notevoli difficoltà nell'attuazione di strategie preventive e terapeutiche negli standard dei Paesi occidentali.

Il presente progetto si propone la valutazione di fattori che influenzano la progressione dell'infezione da HIV in regioni del Sudafrica e del Camerun in relazione ad aspetti socio-culturali e ambientali. Studi epidemiologici saranno effettuati per valutare la prevalenza e la distribuzione dei sottotipi di HIV e le caratteristiche genetiche della popolazione. La progressione dell'infezione sarà valutata in coorti selezionate, rappresentative delle differenti componenti della popolazione. Verranno quindi potenziate le strutture clinico-diagnostiche sul territorio e verranno effettuati studi virologici (plasmaviremia) e immunologici (risposta umorale e cellulo-mediata). La prevalenza di co-infezioni da principali microrganismi patogeni sarà valutata mediante metodiche sierologiche e di amplificazione genica. Un'analisi statistica multivariata consentirà di determinare il ruolo specifico dei fattori socio-culturali e ambientali nella diffusione e progressione dell'infezione da HIV-1.

### **Risultati attesi nel triennio**

L'obiettivo principale del progetto è lo studio delle caratteristiche della diffusione e decorso dell'infezione da HIV-1 in Paesi in via di sviluppo quali il Sudafrica e il Camerun, che presentano un'alta prevalenza di infezione. A questo scopo sarà estremamente importante acquisire informazioni sui parametri epidemiologici e sulla peculiare distribuzione di sottotipi virali e background genetico della popolazione di questi Paesi. Sarà inoltre di estrema utilità la valutazione del peso specifico dei fattori socio-ambientali, quali gli aspetti educazionali, la malnutrizione e la prevalenza di infezioni da microrganismi patogeni, nella incidenza e nella progressione della malattia. Particolare risalto verrà dato all'analisi del ruolo della consapevolezza della prevenzione, della accessibilità a strutture diagnostiche e a presidi terapeutici nel controllo dell'infezione virale.

### **Trasferibilità dei risultati**

I piani strategici di intervento sul controllo dell'epidemia da HIV-1 in Africa, inclusi i programmi vaccinali su larga scala, richiedono un'adeguata conoscenza delle modalità e dell'andamento dell'infezione virale a livello delle diverse realtà locali. Infatti, la peculiarità della distribuzione degli isolati virali in queste aree geografiche e la presenza di diversi aspetti socio-culturali e ambientali, quali un'alimentazione non adeguata e la prevalenza di infezioni da altri microrganismi patogeni, conferiscono alla progressione dell'infezione da HIV-1 caratteristiche totalmente diverse rispetto a quelle riscontrabili nei Paesi occidentali. Le informazioni derivate da questo studio consentiranno una maggiore conoscenza dei fattori che influiscono sulla diffusione e progressione dell'infezione da HIV-1 nei questi Paesi e permetteranno la messa a punto di specifici interventi sul territorio per il controllo dell'epidemia.

## **Analisi dei fattori virologici, genetici e immunologici associati all'infezione da HIV in cittadini italiani e stranieri residenti in Italia**

I cittadini stranieri residenti in Italia sono in costante aumento negli ultimi 20 anni e costituiscono oggi l'8% della popolazione totale. Sebbene attualmente gli stranieri contribuiscano in modo modesto all'epidemia di HIV/AIDS nel nostro Paese, i dati a

disposizione indicano che la diffusione dell'infezione da HIV tra la popolazione migrante in Italia è in aumento. La maggior parte dei migranti sul territorio italiano proviene dall'Europa dell'Est, dall'Africa e dal Sud America, in cui sono presenti sottotipi di HIV-1 differenti dal B prevalente nell'Europa occidentale e in Italia. Inoltre, la prevalenza di infezioni da differenti microrganismi patogeni (virus, batteri, parassiti) risulta maggiore nei soggetti migranti e non adeguatamente gestita nell'ambito dei presidi sanitari pubblici. Poiché la progressione dell'infezione da HIV è associata alle caratteristiche del virus infettante, ai fattori genetici dell'ospite e allo stato di attivazione cronica del sistema immune dovuta alle infezioni concomitanti, il controllo dell'epidemia nel territorio implica necessariamente un attento monitoraggio dei fattori che favoriscono la diffusione del virus nella popolazione migrante.

L'obiettivo del progetto è quindi la valutazione degli aspetti genetici, socio-culturali e dei fattori virologici e immunologici che caratterizzano l'infezione da HIV/AIDS in coorti di individui stranieri e italiani HIV-positivi residenti sul territorio nazionale.

### **Risultati attesi nel triennio**

Allo scopo di caratterizzare adeguatamente le caratteristiche e la storia naturale dell'infezione da HIV/AIDS in Italia in relazione alla presenza di individui migranti da diverse aree geografiche, questo studio si propone di ottenere informazioni riguardo:

- le caratteristiche etniche, socio-culturali e l'accessibilità a strutture clinico-diagnostiche nei soggetti migranti nel territorio italiano;
- la prevalenza e l'incidenza dell'infezione da HIV in coorti di individui migranti;
- le caratteristiche biologiche e molecolari dei sottotipi di virus HIV-1 circolanti nelle popolazioni migranti e sul territorio italiano e il loro impatto sulla progressione della malattia;
- le caratteristiche genetiche dell'ospite in riferimento ai geni *Human Leukocyte Antigen* (HLA) di classe I e II e il loro ruolo nello sviluppo della risposta immune antivirale;
- la prevalenza e l'entità di infezioni concomitanti da parte di microrganismi patogeni;
- la risposta immune HIV-specifica di tipo cellulare e umorale.

### **Trasferibilità dei risultati**

Il decorso e la diffusibilità dell'infezione da HIV/AIDS sono associate alle caratteristiche del virus infettante, a fattori genetici e immunitari dell'ospite. Poiché la pianificazione e lo sviluppo di strategie terapeutiche e preventive atte a contenere la diffusione dell'infezione richiedono la conoscenza delle modalità dell'infezione nel territorio, i risultati acquisiti nel corso di questo studio contribuiranno a fornire una visione più completa della storia naturale dell'infezione da HIV/AIDS in Italia anche in relazione alla presenza di individui migranti da altre realtà geografiche. Queste informazioni contribuiranno pertanto a rispondere in modo più adeguato alla necessità di attivare misure che, attraverso la consapevolezza e il coinvolgimento di soggetti migranti residenti in Italia, potranno contribuire al contenimento dell'infezione da HIV in Italia.

### **Analisi del genoma, trascrittoma, proteoma e correlati di protezione dall'infezione da HIV**

La progressione della patogenesi indotta da infezioni croniche è fortemente condizionata dal contesto genetico dell'ospite. Nel caso dell'infezione da HIV, grande attenzione è stata posta nello studio del polimorfismo CCR5 e nell'analisi delle molecole HLA. È stato in proposito dimostrato come la presenza di certi HLA (es. A1, A2, B7 e B8) può accelerare la progressione della malattia mentre, al contrario, un controllo della malattia è stato dimostrato in pazienti HLA B27, B57 e Bw4. Tuttavia una sistematica caratterizzazione dei correlati genetici della progressione della malattia AIDS rimane un obiettivo prioritario ancora

lontano da essere perseguito. Per dare un contributo a questo obiettivo, il presente progetto intende, in collaborazione con l'Università di Ferrara, esaminare il genoma, il trascrittoma e il proteoma in gruppi di soggetti selezionati da appropriate coorti di individui. In particolare, verranno utilizzate coorti di soggetti che non controllano l'infezione (progressori) in confronto con soggetti che la controllano efficacemente, quali i non progressori (*long-term non-progressors*, LTNP) e i soggetti ripetutamente esposti al virus ma non infettati (*multiple exposed uninfected*, MEU). Cellule ottenute da soggetti di queste coorti verranno analizzate mediante i più moderni approcci di studio del genoma, del trascrittoma e del proteoma utilizzando tecniche di *microarray* e di analisi multidimensionale delle proteine.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto si propone di sviluppare lo studio raccogliendo una adeguata casistica di progressori, LTNP e MEU e al tempo stesso iniziare, previo consenso informato, il campionamento biologico (sangue periferico, linfociti o cellule mononucleate congelate) e le analisi cliniche e sociosanitarie per il *matching* dei soggetti (età, sesso, terapia, tempo dalla sierconversione, carico virale, conte CD4, ecc.) necessari per l'analisi del genoma e del trascrittoma. Il progetto si propone i seguenti obiettivi per il triennio:

- identificare polimorfismi nel genoma umano correlabili con una più alta o bassa capacità dell'ospite di controllare il decorso dell'infezione da HIV;
- correlare il decorso della malattia con i profili trascrizionali delle singole sottopopolazioni cellulari dell'ospite più rilevanti per la patogenesi AIDS, quali le diverse sottopopolazioni di linfociti, di cellule dendritiche e macrofagiche;
- verificare a livello di analisi le proteine riguardo più specificatamente alle differenze più significative rilevabili a livello trascrizionale tramite le analisi *microarray*;
- analizzare tramite studio di appropriati modelli *in vitro* l'impatto sulla replicazione di HIV dei *marker* molecolari individuati attraverso gli approcci trascrittomici e proteomici

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questi studi potrebbero aprire la strada all'identificazione di marcatori/correlati di protezione (controllo) dell'infezione da HIV da monitorare per lo sviluppo razionale di strategie preventive e terapeutiche efficaci. La comprensione del ruolo di questi fattori per la protezione dall'infezione apriranno nuovi orizzonti nel campo della virologia e dell'immunologia. In particolare, l'identificazione del *footprint* di protezione, cioè dell'insieme di geni la cui accresciuta o diminuita espressione è significativamente associata alla protezione dall'infezione nella scimmia e nell'uomo, rappresenterebbe un enorme progresso nel campo delle infezioni da retrovirus e, in generale, delle infezioni virali, e uno strumento obbiettivo per la valutazione, l'implementazione, la validazione e lo sviluppo futuro delle terapie farmacologiche e vaccinali contro l'HIV/AIDS.

#### **Azione concertata per lo "Studio di fase II per la terapia di pazienti affetti da sarcoma di Kaposi classico con gli inibitori della proteasi di HIV"**

Il sarcoma di Kaposi (KS) è un tumore angioproliferativo associato all'infezione da HHV8 che insorge con accresciuta incidenza nei soggetti anziani dell'area mediterranea (*Classical Kaposi Sarcoma*, CKS), nei trapiantati d'organo (*post-transplant KS*, PTKS), e nei pazienti infettati con HIV (AIDS-KS). Il KS insorge in un contesto di immunodisregolazione caratterizzato da aumentata produzione di citochine infiammatorie (gammaIFN, IL-1beta, TNFalpha) e induzione di fattori angiogenici (bFGF) e metalloproteasi della matrice (MMP). Non vi è trattamento d'elezione per il KS, e le terapie convenzionali manifestano elevata tossicità, hanno carattere palliativo, ed efficacia parziale e

temporanea. Studi condotti nel Centro hanno indicato che gli inibitori della proteasi di HIV sono in grado di inibire l'angiogenesi e l'invasione tumorale mediante il blocco dell'attivazione proteolitica di MMP-2. Sulla base di questi dati è stata condotta una sperimentazione multicentrica di fase II per il trattamento del CKS con Indinavir. La sperimentazione è avvenuta nel quadro dell'Azione Concertata sul Sarcoma di Kaposi (Programma Nazionale AIDS), in collaborazione con Merck Italia. I risultati dell'analisi *ad interim* indicano che una risposta clinica favorevole è associata ad elevati livelli plasmatici di farmaco, e ad una riduzione di bFGF plasmatico, di cellule endoteliali circolanti e dei titoli degli anticorpi diretti contro HHV8. L'analisi finale dello studio è in corso.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Obiettivo generale dello studio è valutare l'uso di Indinavir in un *trial* clinico multicentrico per il trattamento di pazienti affetti da CKS.

In particolare, i risultati attesi dello studio sono:

- la determinazione delle risposte cliniche all'indinavir nel trattamento del CKS progressivo di grado lieve o medio-grave;
- la determinazione del tempo alla risposta, della durata della risposta e del tempo di progressione nei pazienti trattati.

Altri risultati attesi dello studio sono:

- la valutazione della sicurezza e del profilo farmacocinetico del trattamento con Indinavir nei pazienti anziani affetti da CKS;
- la determinazione dei parametri biologici predittivi di risposta e dei correlati biologici della risposta al trattamento (marcatori di immunoattivazione e di risposta Th1 e Th2, marcatori di angiogenesi, livelli plasmatici di MMP, risposte umorali e cellulari ad HHV8).

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati dello studio rappresentano la base per una nuova indicazione di Indinavir quale farmaco antiangiogenico e antitumorale, e per avviare le procedure di registrazione del farmaco per la nuova indicazione d'uso.

Lo studio proposto avrà un impatto immediato non solo per le linee guida relative al trattamento di pazienti con CKS, ma anche per l'allestimento di terapie innovative in pazienti neoplastici infettati o no da HIV.

Il trasferimento all'SSN di terapie innovative per la prevenzione e la terapia del KS basata su Indinavir contribuirà ad accrescere gli standard sanitari nel Paese.

Le proprietà intellettuali dei risultati della sperimentazione sono salvaguardate da un brevetto per la nuova indicazione d'uso degli inibitori della proteasi di HIV. Ciò garantirà il mantenimento dei risultati in ambito pubblico e lo sviluppo futuro di questi farmaci in una corretta sinergia tra settore pubblico e Industria.

#### **Caratterizzazione chimico-fisica e funzionale dei complessi Tat/Env di HIV-1**

La proteina Tat di HIV è rilasciata dalle cellule T acutamente infettate e lega gli eparan-solfati delle membrane cellulari e della matrice extracellulare. Abbiamo evidenze che Tat extracellulare favorisce interazione tra Env, CD4 e il co-recettore per HIV, e l'entrata del virus nelle cellule target. In presenza di Tat extracellulare, cellule T esprimono livelli sub-ottimali di co-recettore divengono suscettibili all'infezione; Tat è riconosciuta da anticorpi monoclonali diretti contro epitopi conformazionali dei co-recettori, presenti nella regione del co-recettore che lega il V3 *loop* di Env; anche Tat forma un complesso stabile con il V3 *loop* di Env ed è in grado di modificare il *pathway* di entrata di Env in cellule dendritiche ed endoteliali. Ciò indica che Tat è in grado di legare Env e di mimare i co-recettori per HIV

favorendo l'entrata del virus. Tuttavia, l'entrata Tat-dipendente richiede la presenza di livelli sub-ottimali di co-recettore; cellule negative per l'espressione dei co-recettori rimangono non permissive all'infezione anche in presenza di Tat extracellulare. Ciò indica che Tat potrebbe agire stabilizzando transizioni conformazionali di Env transienti ma cruciali per un'efficace interazione con il co-recettore. Quindi, Tat renderebbe possibili eventi cineticamente proibitivi quando il co-recettore è espresso a livelli limitanti. È di estrema importanza indagare questi aspetti per l'identificazione di nuovi target terapeutici e vaccinali contro l'HIV/AIDS.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Obiettivo del progetto è lo studio delle interazioni tra Tat, il V3 *loop* e molecole di Env monomeriche e trimeriche mediante ELISA, microcalorimetria e biosensori (in collaborazione con l'Università di Ferrara). Le proteine/peptidi verranno lasciate interagire in presenza e assenza di CD4 solubile per mimare il complesso di entrata ed esporre il V3 *loop* nel contesto dell'Env. Esperimenti di competizione con anticorpi monoclonali identificheranno le regioni di Env e Tat implicate nel legame. In un successivo approccio, verranno determinate (con dicroismo circolare, microcalorimetria e resistenza all'azione di agenti denaturanti) le modifiche conformazionali di Env e CD4 in complesso, in presenza o assenza di Tat. Infine, cellule T verranno esposte a anticorpi o ligandi per bloccare o indurre l'internalizzazione del co-recettore, e infettate con HIV in presenza o assenza di Tat durante la graduale riespressione del co-recettore, per determinare il ruolo di Tat nell'assistere l'entrata del virus.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questi studi chiariranno aspetti cruciali dei meccanismi di entrata di HIV e del ruolo di Tat nell'espandere l'infettività e il tropismo virale; porteranno all'identificazione di nuovi target per lo sviluppo di farmaci in grado di bloccare l'entrata e la disseminazione del virus; consentiranno il *design* di nuovi immunogeni basati su frammenti di Tat, Env, e CD4 e altre molecole coinvolte nel complesso di entrata di HIV, per lo sviluppo di strategie vaccinali e immunoterapeutiche contro l'HIV/AIDS.

### **Caratterizzazione genetica e antigenica delle regioni ipervariabili della proteina Env di HIV-1 in soggetti HIV-positivi dell'Africa subsahariana a differenti stadi della malattia: possibili implicazioni per la patogenesi dell'infezione da HIV**

L'Africa Subsahariana continua a sostenere il peso maggiore dell'epidemia globale da HIV/AIDS, con prevalenza oltre 35% in alcuni Paesi. Poiché gli individui più colpiti appartengono alla categoria sessualmente attiva (15-50) risultano essenziali le strategie idonee a contenere la trasmissione virale. La variabilità genetica dell'HIV-1 è molto elevata e sono presenti tutti i sottotipi conosciuti e le forme ricombinanti, con differente capacità di replicazione e di resistenza alla risposta immunitaria. In particolare, la proteina Env, per la pressione selettiva immunitaria, risulta soggetta a mutazioni a carico delle regioni variabili, la cui lunghezza è associata alla suscettibilità alla neutralizzazione anticorpale.

Pertanto, gli interventi preventivi e terapeutici in Africa richiedono un monitoraggio della variabilità genetica dei ceppi virali circolanti.

A tale scopo lo studio si propone di:

- valutare la distribuzione dei sottotipi di HIV-1 in Sudafrica e in Camerun;
- studiare, tramite amplificazione e sequenziamento, la variabilità genetica della proteina Env dei virus circolanti in questi Paesi in differenti stadi di infezione;

- caratterizzare le regioni variabili e costanti di gp120 per la lunghezza, la presenza di *Putative N-Glycosylation Sites* (PNGS) e la carica elettrica in relazione con lo stadio della malattia;
- generare pseudovirus contenenti differenti sequenze di gp120 e valutarne l'infettività e la resistenza alla neutralizzazione *in vitro*.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Nonostante in letteratura ci siano pochi studi sui sottotipi “non-B”, studi recenti in Africa subsahariana sulle coppie donatore-ricevente hanno rivelato che la proteina Env dei virus isolati nei riceventi mostra delezioni nelle regioni variabili rispetto a quella osservata nei virus isolati dai donatori. I nostri studi si baseranno su isolati da individui sudafricani e del Cameroon infettati da diversi sottotipi di HIV-1, in maggioranza dal sottotipo C. Gli studi, pertanto, saranno effettuati su virus diversi dal sottotipo B, che è stato il sottotipo maggiormente studiato. Ci attendiamo che virus con delezioni nelle regioni variabili della proteina Env e con un minor numero di siti di glicosilazione siano favoriti al momento dell'infezione primaria e che virus con regioni variabili più lunghe e con un maggior numero di siti di glicosilazione siano presenti nella fase cronica della malattia e più resistenti alla neutralizzazione. Lo studio potrà fornire informazioni essenziali per la generazione di nuovi immunogeni efficaci nel prevenire l'infezione da HIV.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questi studi possono dare un notevole contributo alla conoscenza dei meccanismi patogenetici dell'infezione da HIV e ad un disegno razionale di vaccini contro l'HIV/AIDS in Africa.

### **Caratterizzazione molecolare e studio dell'infettività di isolati primari di HIV-1**

E' noto che la progressione dell'AIDS è associata ad un aumento del tropismo dei virus R5 per le cellule della linea monocita/macrofago. I meccanismi tramite i quali varianti di HIV-1 con aumentato tropismo macrofagico causano deplezione dei linfociti CD4+ T *in vivo* non sono attualmente definiti. Scopo di questo studio sperimentale è valutare la patogenicità dell'infezione da HIV-1 tramite lo studio dell'infettività di ceppi R5-tropici ampiamente diffusi nella popolazione mondiale e di chimere da essi derivanti in cellule primarie quali linfociti T CD4+, DC e macrofagi.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati dei nostri studi permetteranno: i) di comprendere i meccanismi che mediano le prime fasi dell'infezione virale, ii) di caratterizzare la diversa permissività delle cellule bersaglio ai virus con differente tropismo che sono di fondamentale importanza per chiarire le strategie di disseminazione virale in individui neoinfetti e per monitorare la progressione della malattia.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'analisi delle relazioni tra struttura dell'envelope ed efficienza di infezione in cellule primarie potrà fornire strumenti utili per lo sviluppo di nuovi farmaci antivirali e di terapie mirate e più efficaci.

### **Complesso Tat/Env: studi strutturali**

I nostri studi indicano che Tat lega Env in una regione parzialmente sovrapposta al sito di legame per il co-recettore (CCR5). In particolare, la regione *cystein-rich* di Tat lega il V3 *loop* di Env, mentre altri determinanti legano regioni di Env alla base dello *stem* del V3 *loop*. Tat contatta la faccia di Env opposta alla superficie di interazione con CCR5. Questo

modello suggerisce un meccanismo di interazione cooperativa tra Tat e CCR5 e potrebbe spiegare la capacità di Tat di accrescere l'efficienza di entrata del virus per fusione di membrana. Questo modello, realizzato mediante *modeling/docking* molecolare, è stato confermato con studi di legame (ITC, Biacore) utilizzando peptidi V3 lineari e ciclici, ed Env trimerici deleti del V3 *loop*. Tuttavia, la struttura esatta del complesso, e le regioni precise di interazione, debbono ancora essere definite e verificate. La loro determinazione consentirebbe di acquisire importanti informazioni circa le dinamiche di entrata del virus e il design razionale di immunogeni Tat/Env di seconda generazione. Questo progetto, in collaborazione con il *Karolinska Institute* di Söckolma, analizza il complesso Tat/Env mediante studi di microscopia elettronica ad elevata definizione.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio intende risolvere la struttura del complesso Tat/Env mediante crio-microscopia elettronica *single particle* e tomografica. In particolare, molecole ricombinanti trimeriche di Env verranno pulsate con Tat a varie concentrazioni e la struttura del complesso risolta con microscopia elettronica *single particle* dopo congelamento istantaneo. In un secondo approccio particelle virali non infettanti verranno pulsate con Tat e la struttura del complesso formata alla superficie del virione risolta mediante crio-microscopia elettronica tomografica. Infine, la struttura del complesso formato sulle particelle virali durante l'infezione verrà determinata mediante immuno-microscopia elettronica su cellule infettate *in vitro* o derivate da linfonodi di scimmie acutamente infettate.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questi studi consentiranno lo sviluppo di immunogeni di seconda generazione mediante *rational design* per la loro validazione in modelli animali.

### **Cross-talk tra endoteli e linfo-monociti nell'infezione da HIV mediata da Tat extracellulare**

I nostri studi indicano che la proteina Tat dell'HIV-1 viene rilasciata dalle cellule infette nell'ambiente extracellulare, dove essa esercita molte e importanti funzioni. In particolare, Tat viene selettivamente adsorbita da cellule presentanti l'antigene (DC, macrofagi, cellule endoteliali), attivandole e potenziando così la risposta immunitaria diretta contro l'HIV. Tuttavia, Tat può anche aumentare l'infettività di HIV (ed espanderne il tropismo) perché lega il V3 *loop* di Env, mimando i co-recettori per HIV.

*In vivo*, Tat extracellulare è presente soprattutto sulla superficie degli endoteli attivati, specialmente a livello dei linfonodi. In questo micro-ambiente, i linfociti e i monociti passano continuamente dal sangue/linfa al compartimento extravascolare, e viceversa. Ciò avviene tramite la migrazione dei linfociti e dei monociti verso la parete vasale, la loro adesione alle cellule endoteliali, e il passaggio attraverso di esse. È perciò di estremo interesse studiare gli effetti che la Tat presente sull'endotelio ha nell'infezione dei linfociti e dei monocito-macrofagi da parte dell'HIV.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Esperimenti iniziali valuteranno la migrazione di linfociti e monociti (infettati o meno con HIV) verso cellule endoteliali pre-trattate (o meno) con Tat. In seguito, verrà analizzata l'adesione dei linfo-monociti (HIV-infetti o non infetti) sulle cellule endoteliali esprimenti o no Tat. Test successivi valuteranno la capacità che anticorpi anti-Tat o sieri di soggetti vaccinati con Tat hanno su questi modelli sperimentali di migrazione e adesione. Infine, verrà esaminato l'impatto che le cellule endoteliali esprimenti Tat hanno sull'infezione di cellule T aventi zero o bassi livelli di co-recettori per HIV.

### **Trasferibilità dei risultati**

Gli studi in oggetto consentiranno di trasferire conoscenze chiave nel campo del *cross-talk* tra sistema vascolare e immune nel contesto dell'infezione da HIV, e di individuare nuovi target per approcci preventivi e terapeutici innovativi contro l'HIV/AIDS.

### **Effetti degli inibitori delle proteasi di HIV nella patogenesi del carcinoma della cervice uterina e sull'infezione da HPV**

Le recenti terapie HAART hanno indotto una significativa riduzione dell'incidenza dei tumori AIDS-associati, quali il KS, i linfomi non-Hodgkin (NHL) e il carcinoma intraepiteliale della cervice uterina (CIN). Il trattamento con HAART, inoltre, è spesso associato alla regressione di queste neoplasie. Ciò riflette la soppressione della replicazione di HIV, la ricostituzione del repertorio immunitario, e il ripristino di efficaci risposte immuni contro i virus oncogeni. Studi recenti indicano, tuttavia, che la terapia HAART eserciti sui tumori anche effetti indipendenti dalle sue azioni su HIV e sul sistema immunitario. Questi farmaci sono infatti in grado di inibire lo sviluppo di tumori umani impiantati in topi nudi. Indinavir, uno tra i primi di questi farmaci, si è rivelato efficace nel trattamento del KS classico in soggetti HIV-negativi. Studi recenti indicano che gli HIV-PI esercitano queste azioni anti-tumorali bloccando l'angiogenesi e l'invasione tumorale e inibendo/modulando il proteasoma. Recentemente, è stato riportato che gli HIV-PI riducono significativamente il rischio di recidiva di CIN rispetto ad altri farmaci anti-retrovirali egualmente efficaci contro HIV. Questi dati sono di grande rilevanza per il trattamento del CIN, una neoplasia allo stadio iniziale potenzialmente assai sensibile al blocco dell'angiogenesi e alla modulazione della espressione del virus HPV tramite il proteasoma.

### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio, in collaborazione con l'Università di Tor Vergata a Roma e con l'Università di Torino, si propone di determinare gli effetti degli HIV-PI nella patogenesi del CIN e sull'infezione da HPV. I modelli impiegati saranno colture di cheratinociti umani infettati latentemente da HPV oncogeni e topi transgenici per la regione precoce di HPV-16 indotti a sviluppare CIN in seguito a somministrazione di estrogeni. L'*end-point* degli studi sarà la perdita della capacità proliferativa, dell'espressione delle funzioni virali oncogene e dell'episoma virale nelle colture cellulari, e il blocco della progressione o l'induzione della regressione dei CIN nei topi transgenici. I risultati di questi studi consentiranno il passaggio alla sperimentazione nelle donne a rischio di CIN o con CIN.

### **Trasferibilità dei risultati**

Lo studio è volto ad allestire terapie farmacologiche per il CIN e per le lesioni condilomatose ano-genitali. Finanziamento: Programma per la Ricerca Oncologica del Ministero della Salute

### **Generazione nel modello del primate non umano e caratterizzazione di anticorpi contro Tat ed Env di HIV-1 con attività antivirale per interventi preventivi o terapeutici contro HIV/AIDS**

HIV-1, dopo una viremia iniziale può rimanere in uno stato di latenza in diversi santuari virali. Anticorpi neutralizzanti Anti-Env (NAbs) sono indotti o in corso di vaccinazione o durante l'infezione naturale ma, attraverso diversi meccanismi (mutazioni nel gene Env, glicosilazione, l'accesso ad epitopi criptici, ecc.) non sono sufficienti a bloccare l'infezione virale. L'attività effettrici di Abs (quali ADCC, ADCVI) sono stati suggeriti come correlato di protezione negli studi preclinici. Comprendere l'equilibrio tra le diverse attività di Abs è di fondamentale importanza. Tat è una proteina che presenta attività biologiche coinvolte

nella regolazione di geni virali e cellulari, promuove l'attivazione ed espansione delle cellule B ed espleta un ruolo fondamentale nella trasmissione e propagazione dell'infezione nell'ospite. Nostri dati indicano che la presenza di anticorpi anti-Tat correla con la non progressione clinica dell'infezione in pazienti esposti ad HIV. Abs anti-Tat per i loro effetti inibitori sul ciclo virale e per la capacità di neutralizzare le attività disregolatorie sulle cellule viciniori, possono impedire l'infezione e la trasmissione del virus. La generazione di anticorpi anti-Tat e -Env di HIV-1 capaci di bloccare l'infezione rappresenta quindi un importante step per indirizzare approcci vaccinali preventivi, per prevenire l'infezione dopo esposizione mucosale al virus e per interventi di immunoprofilassi in pazienti già esposti.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Alla luce di quanto sopra detto intendiamo:

- studiare in scimmie, vaccinate e non, il profilo delle risposte umorali (IgM, IgG e sottoclassi) (*binding*, epitope *mapping*);
- valutare la correlazione tra profilo delle sottoclassi di IgG, risposte cellule mediate e outcome virologico;
- analizzare le attività antivirali (neutralizzazione, ADCC, ADCVI) degli anticorpi e la loro associazione con la osservata protezione;
- generare *in vitro* e caratterizzare anticorpi prodotti da cellule B di scimmie vaccinate verso gli antigeni vaccinali;
- valutare *in vitro* le attività antivirali degli anticorpi (ADCC, ADCVI, neutralizzazione) e la capacità di inibire *in vitro* le attività biologiche indotte da antigeni vaccinali;
- selezionare cloni cellulari produttori anticorpi della attesa specificità e attività biologica e loro caratterizzazione molecolare (amplificazione, clonaggio);
- generare anticorpi ricombinanti e caratterizzarli per quanto riguarda il *binding*, attività antivirali e capacità di inibire *in vitro* le attività biologiche degli antigeni vaccinali;
- valutare *in vitro* e nel modello del primate non umano la tossicità e l'attività protettiva degli anticorpi ricombinanti selezionati.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Lo studio delle risposte umorali nel modello preclinico del primate non umano contribuiranno al chiarimento non solo di aspetti importanti della patogenesi e immunopatogenesi da HIV ma serviranno anche ad indirizzare lo sviluppo di approcci vaccinali basati sull'uso di antigeni di nuova generazione. Inoltre, da questi studi emergeranno anche dati importanti per la generazione e sviluppo di anticorpi terapeutici da trasferire in campo clinico. La verifica dell' assenza di tossicità e dell'efficacia nel primate non umano di un trattamento con anticorpi contro Tat ed Env rappresenta uno step essenziale per approntare protocolli di interventi nell'uomo. È chiaro che tali anticorpi ricombinanti derivati da cellule di scimmia, necessitano di essere modificati (umanizzati) al fine di evitare effetti tossici gravi se inoculati nell'uomo

### **Network europeo (EUOPRISE) per lo sviluppo di interventi preventivi e terapeutici contro HIV/AIDS**

La diffusione dell'infezione da HIV e il numero sempre maggiore di decessi per AIDS soprattutto nei Paesi in via di sviluppo evidenziano l'urgenza della messa a punto di strategie preventive e terapeutiche efficaci, nell'ambito della quale un ruolo chiave è rappresentato dall'utilizzo di vaccini e microbicidi. Il CNAIDS ha già partecipato o ha sviluppato e coordinato progetti (AVIP, MUVAPRED) miranti allo sviluppo di nuovi approcci vaccinali nuovi sistemi di *delivery*. È sulla base di questa vasta e qualificata esperienza che il CNAIDS partecipa al progetto europeo EUOPRISE la cui missione principale è quella di riunire

esperienze europee sui vaccini e microbici al fine di coordinare e definire futuri approcci preventivi/terapeutici contro HIV che dalla ricerca di base giungano, passando per la sperimentazione preclinica, alla sperimentazione nell'uomo. In particolare, la nostra partecipazione ad EUROPRISE è stata focalizzata a:

- sviluppo e validazione di un gold standard per il test di neutralizzazione (HIV e SIV);
- standardizzazione e validazione di saggi per il monitoraggio delle risposte cellulomediante;
- validazione dei metodi per il monitoraggio virologico quantitativo nella scimmia;
- sviluppo di reagenti e alla standardizzazione di saggi (ADCC);
- studi comparativi di neutralizzazione e ADCC in plasmi di pazienti infettati con ceppi diversi di HIV-1 (ADCC Network).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto EUROPRISE ha ottenuto un'estensione fino al giugno 2012. Nell'arco di questo tempo, il CNAIDS proseguirà la sua partecipazione focalizzandosi in particolare: i) sulla generazione di reagenti per lo studio *in vitro* delle funzioni effettrici (ADCC) e ii) sullo studio multicentrico sulle attività neutralizzanti di anticorpi di scimmia con diverse ceppi di SIV.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le conoscenze e l'esperienza del CNAIDS nel campo della patogenesi dell'infezione e dello sviluppo di nuovi approcci vaccinali rappresentano un valido contributo sia per la costituzione di un network europeo che per il raggiungimento delle specifiche finalità di EUROPRISE. Inoltre, la standardizzazione dei saggi e lo sviluppo di nuove metodologie rappresentano una risorsa facilmente trasferibile al monitoraggio dei *trial* clinici

### **Nuovi terapeutici e immunogeni generati dall'incorporazione di *short RNA* o di antigeni in esosomi**

Sono state avviate nuove linee di ricerca finalizzate a modificare *short RNA* interferenti o antigeni proteici al fine di veicolarli preferenzialmente negli esosomi, per poter così ottenere una nuova generazione di terapeutici o di vaccini per l'induzione di una risposta citotossica (vaccini CTL).

È stato dimostrato che le molecole di RNA contenute negli esosomi possono essere funzionali nella cellula che internalizza gli esosomi. Recentemente abbiamo individuato sequenze all'interno del genoma di HIV capaci di veicolare RNA "carga" all'interno degli esosomi. Questo ci permetterà di produrre esosomi contenenti grandi quantità di *short RNA* interferente (es. *silencing* RNA, pre-microRNA) la cui resistenza all'ambiente extracellulare, grazie al rivestimento membranoso, sarà grandemente più elevata rispetto alle formulazioni degli RNA terapeutici attualmente in uso in studi pre-clinici e clinici.

Gli esosomi sono largamente studiati anche come veicoli vaccinali. Abbiamo identificato un mutante della proteina Nef di HIV-1 denominato Nefmut, che mostra una spiccata tendenza a localizzarsi negli esosomi sia come tale che come prodotto di fusione con proteine eterologhe. Sfruttando questa caratteristica, nonché la possibilità di ingegnerizzare le membrane degli esosomi con proteine fusogene, abbiamo pianificato di creare una nuova piattaforma biotecnologica per la produzione di vaccini CTL per il trattamento di malattie infettive e di tumori.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Gli obiettivi delle nostre ricerche si possono così sintetizzare:

- messa a punto di un metodo originale di incorporazione di RNA terapeutici in esosomi. L'efficacia di questa strategia verrà comparata con le metodiche più moderne di trattamento terapeutico con *short RNA* interferenti;

- creazione di una originale piattaforma biotecnologica per la produzione di vaccini CTL basati sull'uso di esosomi ingegnerizzati con prodotti di fusione di Nefmut con antigeni virali e tumorali. Questo risultato rappresenterebbe un significativo avanzamento in termini di sicurezza, flessibilità e costo di produzione rispetto a strategie vaccinali alternative basate su nano particelle che sono attualmente in sperimentazione.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il campo delle terapie sperimentali basate sull'utilizzo delle proprietà interferenti di *short RNA* è in rapida espansione. L'efficace *delivery* cellulare degli *short RNA* nonché la loro resistenza all'azione degradativa dei fluidi extra-cellulari sono problemi ancora non risolti. In questo ambito, l'uso di esosomi caricati di *short RNA* interferenti rappresenterebbe un avanzamento che avrebbe una sua immediata applicabilità in test pre-clinici e clinici.

Lo sviluppo di immunogeni efficienti, sicuri e a basso costo rappresenta il fine ultimo di qualsiasi strategia vaccinale innovativa. Se portata a buon fine, la piattaforma vaccinale CTL che abbiamo intenzione di sviluppare è attesa rispondere a tutti i suddetti criteri e quindi potrà avere una ovvia trasferibilità nell'applicazione di test pre-clinici e clinici di vaccini terapeutici contro malattie infettive croniche e contro tumori associati all'espressione di specifici *tumor-associated antigen*.

#### **Produzione di complessi Tat/Env basati su isolati virali V1-V2 short**

La proteina Tat di HIV, rilasciata dai linfociti T acutamente infettati, partecipa ai processi di penetrazione di HIV. I nostri studi indicano che Tat lega Env con elevata affinità e stabilità. Questo legame potenzia entrambe le vie di penetrazione di HIV -“fusione” di membrana ed endocitosi”, ma l'effetto è particolarmente evidente sull'endocitosi. Tat riduce la capacità di Env di riconoscere i suoi recettori naturali per l'endocitosi, le lectine di tipo C per cui il virus viene “diretto” sulla integrine RGD-dipendenti, i recettori di Tat. Legando Tat, HIV penetra perciò in queste cellule con accresciuta efficienza ed essendo un meccanismo Tat-dipendente, il virus diviene “insensibile” agli anticorpi bloccanti diretti contro Env. Anticorpi in grado di bloccare l'endocitosi Tat-mediata possono tuttavia essere indotti usando quale vaccino Tat, o il complesso Tat/Env. I nostri studi indicano che la stabilità del complesso Tat/Env è accresciuta da delezioni nella regione variabile V1-V2 di Env. Queste forme Env delete sono simili a varianti naturali note come varianti V1-V2 *short* che emergono alla porta di entrata durante la penetrazione del virus nel corso dell'infezione primaria ed espongono epitopi conservati di Env (cioè i bersagli naturali per un vaccino preventivo).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Questo progetto, in collaborazione con l'Università di Ferrara, si propone di sviluppare gp140 come immunogeno e di utilizzare varianti naturali di Env per generare complessi Tat/Env caratterizzati da elevata stabilità e immunogenicità. Da questo punto di vista si intende continuare la caratterizzazione biologica e molecolare dei cloni HIV-1 clade C gp140/160 già ottenuti al fine di poter selezionare il clone che ad una prima analisi possedga i requisiti bio-molecolari da noi richiesti. Si procederà quindi alla produzione *in vitro* da cellule eucariote della proteina ricombinante e allo studio della sua immunogenicità in modelli preclinici. e il candidato più immunogenico ed efficace verrà prodotto in condizioni GMP per la sperimentazione sull'uomo. Al tempo stesso, come modello di challenge nel primate non umano, lavori saranno svolti miranti alla generazione di virus chimerici HIV/SIV contenenti gp160 di HIV-1 *clade C*.

### **Trasferibilità dei risultati**

Questi studi condurranno alla produzione di complessi Tat/Env di seconda generazione per lo sviluppo di strategie vaccinali e immunoterapeutiche contro l'HIV/AIDS. Inoltre la possibilità data dal nuovo virus chimerico HIV/SIV di *clade* C permetterà nel modello preclinico della scimmia di ottenere anche dati sull'efficacia dell'approccio vaccinale.

Programma per sostenere il Ministero della Salute del Sudafrica nello sviluppo di un Programma nazionale di risposta globale all'HIV e AIDS

Il "Programma per sostenere il Ministero della Salute del Sudafrica nello sviluppo di un Programma nazionale di risposta globale all'HIV e AIDS", finanziato dal MAE, è implementato dal CNAIDS e strutturato in tre componenti: i) rafforzamento del servizio sanitario in siti selezionati del Sudafrica; ii) rafforzamento delle competenze e trasferimento tecnologico per la creazione di una struttura per la produzione di vaccini (Biovac) in ottemperanza alla normativa GMP e iii) conduzione di un *trial* clinico terapeutico di fase II (T-003) con il vaccino Tat in siti sudafricani selezionati (*Medunsa Clinical Research Unit – MeCRU* e *Walter Sisulu University HIV Vaccine Research Unit – WSU-HVRU*). Il *trial*, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, in soggetti in ART è stato approvato dalle autorità competenti sudafricane.

Nell'ambito del programma è anche iniziato uno studio osservazionale (OBS T-004) per valutare la correlazione tra sieroprevalenza di risposte anticorpali anti-Tat e status immunologico, virologico e clinico in 700 individui HIV+ sudafricani.

Nei prossimi anni il progetto continuerà: i) ad intervenire a supporto dei piani strategici nazionale e provinciali nelle Province del Gauteng, Eastern Cape e Mpumalanga, ii) a completare il potenziamento della ditta Biovac per la produzione in GMP di vaccini, iii) a completare l'OBS T-004 e iniziare e portare a termine il *trial* clinico terapeutico di fase II (ISS T-003).

### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto si concluderà nell'arco temporale previsto dal presente piano triennale. In particolare, saranno completate le attività relative ad ognuna delle tre componenti del progetto, inclusi la conduzione e il completamento del *trial* clinico vaccinale terapeutico di fase II.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti nell'ambito del Progetto porranno le basi per la conduzione di *trial* clinici avanzati per la verifica dell'efficacia dell'approccio vaccinale terapeutico basato sulla proteina Tat. Inoltre, le attività condotte nell'ambito di tutte e tre le componenti del progetto rafforzeranno le capacità del Sudafrica nel contenimento non solo dell'infezione da HIV, ma anche di altre malattie infettive.

## **Risposte umorali nell'infezione da HIV e in risposta a vaccinazione con antigeni di HIV/SIV**

La prevalenza di anticorpi anti-Tat, infatti, è assai bassa negli infettati, ma significativamente più elevata nei *long-term non-progressor*. Al contrario, le risposte umorali contro gli antigeni virali strutturali sono assai frequenti in tutti gli infettati. Molti soggetti infettati, inoltre, hanno anticorpi anti-HIV neutralizzanti (Env) i quali, tuttavia, non sono in grado da soli di controllare l'infezione né di bloccare la progressione. Rimane ancora da chiarire i meccanismi attraverso cui gli anticorpi esplicano il loro ruolo protettivo. Le attività effettrici di Abs (ADCC, ADCVI) sono stati suggeriti come correlato di protezione negli studi preclinici. Un ulteriore meccanismo attraverso antivirale Ab-dipendente è associato al rilascio di beta-chemochine, suggerendo che gli Absi possono rendere i linfociti

refrattari all'infezione. Riteniamo dunque essere importante valutare *in vivo* il profilo delle risposte umorali e le associate attività biologiche in modo sistemico utilizzando il modello del primate non umano (vaccinazione, infezione naturale). Comprendere l'equilibrio tra Abs con attività antivirali o attività *enhancing* sono determinanti per ottimizzare antigeni vaccinali di nuova generazione, per la comprensione della patogenesi virale, per la caratterizzazione delle risposte ai vaccini in fase di sviluppo e sperimentazione, e per l'allestimento di future strategie vaccinali e immunoterapeutiche efficaci.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- valutazione delle risposte umorali verso Tat ed Env nell'infezione naturale (soggetti infettati e primati non umani);
- valutazione del profilo delle sottoclassi delle IgG e loro correlazione con le risposte cellulo-mediate indotte da immunizzazione/vaccinazione nei modelli animali prescelti e nell'uomo;
- caratterizzazione degli anticorpi presenti nel siero/plasma mediante determinazione di: i) titolo degli anticorpi neutralizzanti; ii) spettro d'azione (riconoscimento di antigeni/virus appartenenti a ceppi e/o sottotipi virali diversi da quello vaccinale); iv) specificità epitopica (epitopi lineari e conformazionali); v) attività ADCC e ADCVI;
- studio degli effetti di Tat sul fenotipo, differenziamento, sopravvivenza, priming, funzione (*switch* isotipico, produzione di Ig) della cellule B in risposta ad altri antigeni di HIV/SIV;
- studio della localizzazione di Tat, Env e dei relativi anticorpi nei centri germinativi (endoteli, cellule dendritiche follicolari) in tessuti mucosali e linfoidi di animali infettati, vaccinati (protetti o *controller*);
- determinazione degli effetti degli anticorpi nei sieri di primati infettati/vaccinati e di soggetti infettati/vaccinati di neutralizzare Tat.

### **Trasferibilità dei risultati**

Gli studi relativi all'immunità umorale nel corso dell'infezione naturale chiariranno aspetti importanti della patogenesi e immunopatogenesi da HIV, e indirizzeranno i futuri studi vaccinali. La caratterizzazione delle risposte umorali generate nei vari modelli animali di vaccinazione e/o infezione consentiranno lo sviluppo e la selezione dei candidati vaccinali più efficaci. Le metodiche sviluppate e applicate alla valutazione di vaccini nei vari modelli animali saranno direttamente trasferibili o adattabili alla valutazione dell'esito degli studi clinici nell'uomo

## **Ruolo degli RNA *multispliced* nell'immunodisregolazione mediata dalla terapia antiretrovirale**

L'HAART è composta da farmaci che bloccano il ciclo di replicazione dell'HIV a vari stadi e che sono usati in combinazione per ridurre il rischio di farmacoresistenza. L'HAART si associa nel tempo con disturbi del metabolismo e con elevata tossicità ma la sua sospensione porta inevitabilmente alla riattivazione dell'HIV suggerendo che la trascrizione virale può avvenire in assenza di replicazione virale rilevabile e può tradursi nella disfunzione immunitaria persistente e nell'invecchiamento precoce osservati nei soggetti sottoposti ad HAART.

La trascrizione di HIV produce tre classi di mRNA: gli RNA *multiplied* (MS), i parzialmente *spliced* e gli *unspliced* (US). Gli MS vengono prodotti a tempi precoci, codificano per le proteine Tat, Rev e Nef, sono persistentemente espressi dal DNA non integrato e sono stati rilevati in cellule di pazienti trattati con HAART negativi per plasma

viremia. L'HIV è in grado di incorporare gli RNA MS all'interno del virus e di retrotrascrivere questi RNA. La retrotrascrizione degli RNA *spliced* è, inoltre, meno sensibile all'azione dell'inibitore AZT che non l'RNA genomico. Inoltre, il rapporto delle forme di RNA MS/US aumenta nei macrofagi di pazienti trattati.

La comprensione dei meccanismi molecolari alla base dell'infezione latente da HIV, di come i *reservoir* virali siano generati, mantenuti e riattivati è essenziale per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche finalizzate a debellare l'infezione da HIV.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Vogliamo studiare gli effetti della HAART e delle citochine pro-infiammatorie, che possono essere trovati in pazienti sotto HAART, sulla produzione di RNA MS in cellule trattate con diverse combinazioni di farmaci antiretrovirali.

Dati preliminari ottenuti in linee T infettate con HIV, hanno dimostrato che il trattamento dei farmaci è in grado di aumentare il rapporto degli RNA MS/US. È nostra intenzione continuare questo studio utilizzando macrofagi infettati con HIV R5-tropici dove le forme non integrate di HIV possono avere un ruolo rilevante nella produzione di RNA MS. Vogliamo studiare se l'aumento di MS porti ad un aumento di espressione di Tat. Tat è una proteina regolatoria prodotta a tempi precoci dall'infezione che svolge un ruolo chiave nella replicazione del virus HIV e nella patogenesi dell'AIDS. La presenza di una risposta immunitaria umorale al Tat, si associa ad un minor rischio di progressione della malattia da HIV-1 ed è stato inoltre dimostrato, che la vaccinazione terapeutica con Tat riduce l'immunoattivazione di soggetti sotto HAART. Abbiamo in programma di analizzare l'effetto di citochine infiammatorie sugli RNA MS di HIV e sulle proteine da essi codificate. L'attivazione immunitaria osservata nei pazienti trattati con HAART potrebbe infatti, portare alla produzione di citochine pro-infiammatorie che sono in grado di sinergizzare con Tat nell'attivazione della trascrizione LTR-dipendente esercitando così una pressione positiva sul virus.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questo studio potrebbe portare all'identificazione dei meccanismi patogenetici sconosciuti per l'HIV e portare alla identificazione di nuove strategie terapeutiche per prevenire l'infezione e la comparsa o la progressione della malattia e per il trattamento delle manifestazioni cliniche non correlate all'AIDS osservate nei pazienti trattati con HAART.

### **Ruolo dei fattori dell'ospite e dei fattori virali nell'infezione sperimentale di macachi cinomologi con SIV o SHIV**

I fattori genetici dell'ospite sono importanti nel determinare perché alcuni individui controllano l'infezione da HIV mentre altri vengono infettati dal virus. Nell'ambito di protocolli vaccinali basati sulla proteina TAT ed ENV, è in corso uno studio sulla potenziale influenza dell'MHC e del TRIM5 sulla replicazione del virus SIV/SHIV e la progressione della malattia in macaco cinomologo. A tale scopo stiamo: i) definendo gli aplotipi MHC I e II in una popolazione di macaco cinomologo di origine mauriziana e indocinese; ii) caratterizzando il polimorfismo del TRIM5 sull'outcome dell'infezione da SIV o SHIV; iii) caratterizzando *in vitro* l'attività restrittiva delle varianti di TRIM5 rilevate nella nostra corte di animali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Effettuando studi di associazione che utilizzano differenti parametrici quali i genotipi MHC e TRIM5, le dosi dell'inoculo virale, la via d'infezione, l'outcome della vaccinazione, ci aspettiamo di fornire importanti delucidazioni sugli effetti dei fattori dell'ospite coinvolti

nell'infezione da SIV e SHIV in macaco cinomologo, un modello animale ampiamente usato nella valutazione dell'efficacia dei vaccini.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La comprensione dei meccanismi tramite i quali i fattori genetici dell'ospite e i fattori virali interferiscono con la replicazione virale fornirà nuove forme di interventi terapeutici in HIV/AIDS.

### **Ruolo di Tat nell'infettività e nel tropismo dell'HIV**

Tat è la proteina regolatoria dell'HIV-1, viene prodotta a tempi precoci dall'infezione ed è essenziale per la replicazione e l'espressione dei geni virali. L'alta espressione di Tat nell'infezione acuta si associa con il rilascio della proteina biologicamente attiva nell'ambiente extracellulare in assenza di morte cellulare o di alterazioni della permeabilità di membrana. Il Tat extracellulare viene rilevato nel siero e nei tessuti di pazienti HIV infetti dove si trova prevalentemente legato alle cellule e ai vasi. Dopo il rilascio, una parte della proteina rimane in forma solubile mentre l'altra si lega ai proteoglicani eparansolfati della matrice cellulare. La forma solubile entra nelle cellule e si localizza nel nucleo dove attiva l'espressione genica e la replicazione dell'HIV-1 in cellule infette. Non si sa molto del ruolo svolto dal Tat legato all'ECM nell'infezione da HIV. Abbiamo dimostrato che il Tat extracellulare aumenta l'infezione da HIV con un meccanismo indipendente dalla capacità transattivante della proteina. I dati preliminari dimostrano che Tat immobilizzata è in grado di aumentare preferenzialmente l'infezione di ceppi R5-tropici. Lo studio di questi effetti di Tat extracellulare è di estrema importanza per chiarire i meccanismi dell'infettività e della patogenesi virale. La comprensione dettagliata dell'interazione di Tat con l'envelope dell'HIV sarà importante per lo sviluppo di strategie vaccinali sia preventive che terapeutiche contro l'HIV/AIDS.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Abbiamo dimostrato che Tat immobilizzato è in grado di aumentare l'infettività di vettori sia retrovirali che lentivirali in linee T. In particolare i nostri dati usando HIV dimostrano che Tat è in grado di aumentare l'efficienza di infezione con virus R5-tropici in linee T esprimenti bassi livelli di CCR5 senza influenzare il livello di espressione del corecettore. È nostra intenzione proseguire nel progetto di ricerca e studiare i meccanismi alla base dell'aumento di infezione mediata da Tat immobilizzata. Valuteremo eventuali differenze di infettività con pseudotipi che utilizzano envelope di diversi isolati virali R5-tropici. Indagheremo su quale stadio del ciclo virale Tat esercita la sua azione (aumento dell'entrata, della retro trascrizione, o dell'integrazione del virus). Caratterizzeremo i *domain* delle glicoproteine virali responsabili dell'aumento dell'infettività virale. I nostri dati hanno inoltre evidenziato la capacità del Tat extracellulare di interagire con l'*envelope* delle particelle virali favorendo così il processo di trasmissione virale. Cercheremo inoltre, di identificare le molecole dell'envelope virale interessate in questo legame. Lo studio di questi meccanismi e in particolare del ruolo biologico svolto da Tat nell'ambiente extracellulare, è di estrema importanza nella comprensione delle strategie evolute dal virus per aumentare la propria infettività.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Poiché Tat viene prodotto a tempi precoci dall'infezione virale e viene rilasciato dalle cellule al momento della massima espressione genica, è possibile rilevarlo a livello dei vasi di pazienti infetti. È probabile che questo sia un meccanismo utilizzato da Tat per facilitare la diffusione dell'HIV nell'ospite soprattutto nei primi stadi dell'infezione quando vengono isolate in modo predominante varianti R5-tropiche. L'identificazione delle molecole responsabili del legame al Tat, aprirà la strada allo sviluppo di molecole dell'*envelope* in

grado di bloccare tale interazione. Questo studio costituisce, perciò, un approccio innovativo per la comprensione dei meccanismi patogenetici del virus e per lo sviluppo di nuovi inibitori dell'infezione da HIV.

### **Sperimentazione clinica di fase I (preventiva) di formulazioni vaccinali innovative basate sulla combinazione di proteine strutturali (Env) e regolatorie (Tat)**

Le strategie vaccinali basate sull'utilizzo di proteine virali strutturali, finora perseguite allo scopo di allestire un vaccino efficace, hanno fallito nel prevenire l'infezione da HIV. Nuovi approcci vaccinali basati sull'utilizzo di proteine regolatorie hanno dimostrato nel modello animale di contenere la replicazione virale e prevenire l'insorgenza della malattia. La combinazione di antigeni strutturali e regolatori con funzioni chiave nel ciclo di replicazione virale e nelle interazioni virus-ospite costituisce il razionale su cui si basa il design di candidati vaccinali innovativi. Nel perseguimento di tale ipotesi, si intende quindi realizzare una sperimentazione clinica di fase I di un vaccino basato sulla combinazione delle proteine Tat ed Env, con particolare riferimento ad una modificazione di quest'ultima che ne comporta l'esposizione di epitopi conservati (delezione del dominio V2, DeltaV2 Env), sviluppata nell'ambito dei progetti AVIP, VIAV e ISS/Novartis. I singoli componenti di tale vaccino combinato sono stati già testati in trial clinici di fase I sponsorizzati dall'ISS (Tat) e dalla Novartis (DeltaV2 Env), che ne hanno dimostrato l'innocuità e l'immunogenicità nell'uomo e recentemente, dopo autorizzazione delle autorità competenti e dei Comitati Etici, è stata attivata in tre centri clinici in Italia la sperimentazione clinica preventiva di fase I basata sulla combinazione delle due proteine in 50 volontari sani.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Nell'ambito di questa attività si intende valutare la sicurezza e l'immunogenicità di formulazione vaccinale innovativa basata sulla combinazione della proteina Tat e della proteina DeltaV2 Env. Proseguirà in Italia il *trial* clinico di fase I su volontari adulti HIV sieronegativi (protocollo preventivo) nel corso del quale saranno effettuate le seguenti valutazioni di sicurezza e immunogenicità:

- monitoraggio clinico e di parametri ematologici, biochimici e immunologici;
- valutazione della risposta immune umorale antigene-specifica (determinazione e titolazione di IgM, IgG e IgA specifiche, mappatura degli epitopi B-cellulari, valutazione della attività neutralizzante degli anticorpi identificati, *cloning* e caratterizzazione di cellule B specifiche);
- valutazione della risposta immune cellulare antigene-specifica (determinazione della risposta proliferativa e citotossica specifica, mappatura degli epitopi T-cellulari, *cloning* e caratterizzazione di cellule T specifiche).

Inoltre, saranno effettuate valutazioni immuno-virologiche più approfondite ed esplorative di seconda linea al fine di identificare i parametri rilevanti alla valutazione della vaccinazione.

Tale sperimentazione clinica è stata disegnata nell'ambito del progetto AVIP, coordinato dal CNAIDS e finanziato dalla UE e proseguirà con il finanziamento del Ministero della Salute nell'ambito del Programma di sviluppo di un vaccino contro l'HIV/AIDS basato sulla proteina Tat.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Lo sviluppo di candidati vaccinali innovativi basati sulla combinazione di proteine del rivestimento del virus e di proteine regolatorie essenziali nella regolazione della replicazione virale, permetteranno di realizzare programmi di sperimentazione vaccinale volti

all'induzione di una risposta immune in grado di controllare sia le interazioni virus-ospite che la replicazione virale, impedendo l'insorgenza e la progressione della malattia.

### **Sperimentazione clinica di fase II (terapeutica) del vaccino anti-HIV/AIDS basato sulla proteina Tat**

Il CNAIDS ha sviluppato un vaccino innovativo contro l'HIV/AIDS basato sulla proteina regolatoria Tat di HIV-1. Tat svolge un ruolo chiave nella regolazione della replicazione virale e il suo utilizzo come candidato vaccinale si basa sull'ipotesi secondo cui potrebbe essere possibile controllare la replicazione del virus dopo la sua entrata nelle cellule, bloccare l'infezione e, conseguentemente, lo sviluppo di malattia. Sulla base di questo razionale e degli incoraggianti risultati ottenuti negli studi preclinici e clinici di fase I, in cui il candidato vaccinale si è dimostrato sicuro e immunogenico, il CNAIDS dell'ISS sta conducendo una sperimentazione clinica vaccinale terapeutica di fase II basata sulla proteina ricombinante biologicamente attiva Tat (ISS T-002). L'ISS T-002 è uno studio multicentrico, in aperto, randomizzato su 160 pazienti in trattamento HAART. Esso si configura come uno studio di *dose-finding*, volto ad individuare la dose di Tat (7,5 o 30 µg) più efficace e sicura e il numero minimo efficace di inoculazioni (3 o 5) somministrate per via intradermica. L'arruolamento dei pazienti è stato recentemente completato e le indicazioni ottenute dalla valutazione dei primi 87 pazienti che hanno completato la fase di trattamento indicano che l'immunizzazione terapeutica con la proteina Tat è sicura, immunogenica e, agendo in sinergia con l'HAART, è in grado di promuovere l'immunoricostituzione dei pazienti (Ensoli, *PLoS One* 2010).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Sulla base di tali risultati si procederà a sperimentazioni cliniche avanzate di fase IIB del vaccino, articolata in Italia e Sudafrica. Tale fase detta *proof of concept* mirerà a valutare le risposte immuni al vaccino su migliaia di volontari e ad ottenere prime indicazioni di efficacia. Sarà realizzata in Italia per la vaccinazione terapeutica (finanziamento del Ministero della Salute) e in Sudafrica per la vaccinazione preventiva/terapeutica (finanziamento del MAE).

Saranno effettuate valutazioni di sicurezza e immunogenicità: i) monitoraggio clinico e di parametri ematologici, biochimici e immunologici (includendo per il protocollo terapeutico il monitoraggio delle cellule CD4+ circolanti e della viremia plasmatica); ii) valutazione della risposta umorale anti-Tat specifica (titolazione ed epitope *mapping* di IgM, IgG e IgA), valutazione della attività neutralizzante degli anticorpi anti-Tat, valutazione della risposta cellulare proliferativa e citotossica specifica.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La conclusione dei *trial* clinici di fase II permetterà la valutazione dell'immunogenicità e della sicurezza del vaccino Tat su un numero più ampio di soggetti sottoposti a differenti regimi terapeutici, permettendo così la messa a punto dei protocolli clinici di fase III, che avrà l'obiettivo di confermare l'efficacia del vaccino per la prevenzione e la terapia dell'HIV/AIDS.

### **Studi epidemiologici, immunologici, virologici e molecolari in Paesi in via di sviluppo e sperimentazione clinica di un vaccino contro l'HIV/AIDS**

La pandemia di HIV ha cumulativamente causato oltre 60 milioni di infezioni nel mondo, principalmente nell'Africa subsahariana, nell'Asia all'America Latina. L'infezione da HIV nei Paesi in via di sviluppo non è solo un problema sanitario, ma anche e soprattutto un

problema economico e sociale. Infatti, l'infezione colpisce prevalentemente le persone sessualmente attive, che rappresentano la maggior parte della forza lavoro. Occorre, pertanto, attuare strategie di contenimento della diffusione dell'infezione da HIV, tra cui lo sviluppo di un vaccino contro l'HIV/AIDS.

Poiché i Paesi in via di sviluppo sono i maggiori beneficiari di un vaccino anti-HIV/AIDS, è importante che la sperimentazione clinica, dalla fase II in poi, sia basata sulle popolazioni di questi Paesi. È pertanto necessario, eseguire nelle popolazioni target studi preliminari per le future sperimentazioni cliniche. Questi studi devono essere volti a produrre conoscenze sulla prevalenza e sull'incidenza dell'infezione da HIV, sulla distribuzione e l'eterogeneità dei sottotipi e dei ceppi virali circolanti, sul background delle risposte immuni verso gli antigeni vaccinali negli individui infettati, allo scopo di valutare la capacità del sistema immunitario di riconoscere in modo "crociato" gli antigeni vaccinali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Gli obiettivi dello studio sono:

- monitorare la prevalenza dell'infezione da HIV in Paesi in Via di Sviluppo e stimarne l'incidenza;
- valutare la distribuzione dei sottotipi e dei ricombinanti di HIV;
- studiare la capacità del sistema immune di individui infettati da HIV di riconoscere in modo "crociato" i possibili candidati vaccinali;
- identificare coorti di individui sieronegativi e sieropositivi per la sperimentazione clinica con vaccini contro l'HIV/AIDS. Si procederà pertanto alla standardizzazione delle tecniche biochimiche, ematologiche, immunologiche e virologiche per la determinazione dei parametri di background della popolazione in studio su coorti di volontari HIV-positivi e -negativi che siano in grado di ripresentarsi a scadenze ben precise. In questo contesto, il monitoraggio della prevalenza verrà effettuato, a definite scadenze, utilizzando i kit sierologici commerciali di riferimento; l'incidenza verrà stimata tramite determinazione dell'Indice di Avidità su di un campione rappresentativo della popolazione in esame. Gli studi immunologici di background verranno compiuti su campioni di individui infettati da HIV determinando la presenza e il titolo di anticorpi verso gli antigeni vaccinali e valutando, tramite Elispot, la produzione antigene-dipendente di citochine da parte di cellule del sangue periferico. La variabilità virale sarà studiata mediante valutazione sierologica e genotipica del sottotipo virale infettante.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Gli studi descritti sono fondamentali per valutare la possibilità di eseguire i futuri *trial* clinici vaccinali avanzati con l'antigene prescelto, o con combinazioni di antigeni, nella popolazione target. Le attività del progetto implementeranno le capacità dei laboratori coinvolti nella sperimentazione, contribuendo alla crescita della comunità scientifica del Paese.

#### **Studi osservazionali e per la valutazione delle risposte immuni dirette contro la proteina Tat in soggetti HIV+ in trattamento antiretrovirale (ISS OBS T-002) o in soggetti HIV+ asintomatici (ISS OBS T-003)**

Tat di HIV è una proteina regolatoria prodotta precocemente e fondamentale per la replicazione del virus, la trasmissione virale e la progressione della malattia. Tat è quindi un bersaglio per la risposta immune dell'organismo ospite e un candidato ottimale per lo sviluppo di un vaccino contro l'HIV/AIDS. Vari studi sull'infezione naturale indicano che una risposta immune contro Tat può avere un ruolo protettivo nella progressione della malattia; in particolare la presenza di risposte anticorpali anti-Tat correla con la non

progressione clinica e lo stato asintomatico. Tuttavia, anticorpi anti-Tat sono prodotti solo da circa il 20% di individui con HIV, mentre risposte immuni cellulari di tipo Th1 (IFN) sono più frequenti (50-70%). Ciò suggerisce che l'induzione di anticorpi anti-Tat sia auspicabile per contrastare la progressione dell'infezione. Inoltre è importante raccogliere dati immunologici in soggetti in HAART per valutare gli effetti dei diversi regimi terapeutici sulla risposta immune naturale contro Tat. Non sono noti infatti gli effetti dell'HAART sulle risposte immuni adattative contro gli antigeni virali, né l'influenza delle diverse classi di farmaci sulla ricostituzione immunitaria e il mantenimento/generazione di risposte immuni. Gli studi osservazionali del CNAIDS hanno lo scopo principale di raccogliere dati inerenti la frequenza, la qualità e la persistenza della risposta immune contro Tat in soggetti HIV+ sia in stadio asintomatico che in HAART.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Nel corso del triennio gli studi osservazionali saranno conclusi e le informazioni raccolte permetteranno la valutazione della frequenza, dell'intensità, della qualità e della persistenza della risposta immune contro la proteina Tat in soggetti con infezione da HIV asintomatici e in trattamento efficace con terapie antiretrovirali altamente attive (HAART). Sarà possibile valutare l'andamento immunologico, virologico e clinico di pazienti positivi per risposta immune anti-Tat in confronto a quello dei soggetti negativi, al fine di determinare l'impatto della risposta immune contro la proteina Tat sulla progressione dell'infezione da HIV e di definire marcatori prognostici utili alla gestione clinica e terapeutica della malattia. Inoltre sarà implementata una rete di centri clinici operanti secondo metodologie standardizzate per la conduzione di futuri protocolli vaccinali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti nel corso degli studi osservazionali sono essenziali al fine di valutare prospetticamente l'andamento immunologico, virologico e clinico di pazienti con risposta immune anti-Tat rispetto a soggetti anti-Tat negativi e di definire le potenziali applicazioni di questa indagine immunologica nella gestione clinica e terapeutica dei pazienti con infezione da HIV. Questi studi sono inoltre essenziali per la creazione di una rete di centri clinici operanti secondo metodologie standardizzate per la conduzione di futuri protocolli vaccinali.

### **Studi preparatori immunologici, virologici e clinici mirati allo sviluppo e sperimentazione di vaccini contro l'HIV/AIDS in popolazioni residenti e immigranti**

L'Istituto San Gallicano (IFO), in cooperazione con il CNAIDS, ha costituito una piattaforma congiunta clinica e laboratoristica, specificamente dedicata alla medicina preventiva e allo sviluppo di vaccini contro l'HIV/AIDS. A tale scopo è necessaria l'acquisizione preliminare di una serie di informazioni e quindi l'allestimento di studi *ad hoc*, di ordine clinico, socio-culturale, e laboratoristico (aspetti immunologici e virologici) sia per il corretto inquadramento clinico-psicologico e infettivologico, che per la realizzazione delle misurazioni immunologiche necessarie alla sperimentazione di candidati vaccinali. Peraltro, le popolazioni residenti e immigrate offrono, su un piano sociale, clinico e biologico, importanti peculiarità che offrono elementi essenziali per lo sviluppo, conduzione e monitoraggio di *trial* clinici vaccinali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

- Si sono allestiti e sono tuttora in corso i seguenti studi immunologici e virologici:
- Definizione dei parametri laboratoristici di routine (ematologia, biochimica, valutazione delle sottopopolazioni linfocitarie) e determinazione delle principali IST, inclusa sierologia e viremia plasmatica HIV-1.

- Valutazione della risposta immune naturale e adattativa contro proteine regolatorie (Tat, Nef) e/o strutturali (Gag, Env) dell'HIV-1, allestita come segue: i) immunità umorale (determinazione e titolazione di IgG, IgA e IgM specifiche, mappatura degli epitopi B-cellulari, valutazione della attività neutralizzante degli anticorpi identificati); ii) immunità cellulo-mediata (risposta linfoproliferativa, determinazione della risposta CTL, mappatura degli epitopi T-cellulari).

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le attività allestite forniscono un contributo originale ed essenziale per lo sviluppo clinico e la messa a punto del monitoraggio immuno-virologico di un vaccino contro l'HIV/AIDS nell'ambito di piattaforme multicentriche coordinate dall'ISS sia in ambito nazionale (*Italian Concerted Action on Vaccine Development, ICAV*) che europeo (*AIDS Vaccine Integrated Project, AVIP*) e specificamente proiettate allo sviluppo di programmi vaccinali nei Paesi in via di sviluppo.

#### **Studio clinico di fase II per il trattamento del sarcoma di Kaposi classico avanzato con l'inibitore della proteasi di HIV Indinavir in associazione a chemioterapia con Vinblastina e Bleomicina.**

Il CKS insorge in età avanzata in soggetti ad elevata vulnerabilità ed elevato impegno assistenziale. Le terapie convenzionali per il CKS sono caratterizzate da elevata tossicità, hanno carattere palliativo, effetti temporanei, e non vi è trattamento d'elezione. Nostri studi condotti in precedenza hanno indicato che l'inibitore della proteasi di HIV Indinavir (IDV) è in grado di inibire l'angiogenesi e l'invasione tumorale mediante azioni sulle metalloproteasi della matrice extracellulare (MMP). Sulla base di questi dati è stata avviata una sperimentazione clinica multicentrica di fase II per valutare l'attività di IDV come monoterapia in pazienti con CKS iniziale o avanzato. I risultati dell'analisi *ad interim* hanno indicato che il trattamento con IDV è ben tollerato e induce un'elevata frequenza di risposta nei soggetti con CKS iniziale, ma una temporanea stabilizzazione di malattia, generalmente seguita da progressione, nel CKS avanzato e complicato. La risposta al trattamento richiede elevati livelli plasmatici di farmaco ed è associata ad una significativa diminuzione del numero di cellule endoteliali circolanti e alla stabilizzazione dei livelli plasmatici di MMP e di fattori angiogenici, quali il bFGF. Questi dati indicano, perciò, che nel CKS avanzato il trattamento con IDV potrebbe essere efficace in associazione a chemioterapia convenzionale e/o come terapia di mantenimento dopo riduzione della massa tumorale.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Sulla base di questi dati, è stata avviata una sperimentazione di fase II per il trattamento del CKS avanzato con IDV in associazione a chemioterapia con Vinblastina e Bleomicina. Lo studio prevede un trattamento *debulking* d'induzione con IDV associato a Vinblastina e Bleomicina, e una fase di mantenimento con IDV in monoterapia.

Obiettivi dello studio:

- determinare il numero di risposte complete ottenute al termine della terapia (induzione e mantenimento);
- valutare il numero di risposte complete, risposte parziali, miglioramento di malattia, malattia stabile e progressioni nella fase di mantenimento. Al termine della fase d'induzione verrà effettuata una nuova stadiazione di malattia allo scopo di determinare la massa tumorale residua per la valutazione delle risposte ottenute con la terapia di mantenimento.

Obiettivi secondari dello studio sono:

- valutare l'entità delle risposte parziali e il tempo alla progressione;

- valutare la fattibilità e la tossicità dell'associazione di IDV e chemioterapia, e il profilo farmacocinetico di IDV nelle fasi di induzione e mantenimento;
- valutare i marcatori biologici predittivi di risposta e i correlati biologici della risposta al trattamento (cellule endoteliali circolanti, livelli plasmatici di MMP e fattori angiogenici, quali bFGF e VEGF, marcatori di attivazione del sistema immune e vascolare, livelli viremici e risposte immuni umorali e cellulo-mediate ad HHV8, un virus oncogeno associato alla patogenesi del KS).

#### **Trasferibilità dei risultati**

Lo studio consentirà di trasferire all'SSN nuovi approcci e protocolli terapeutici basati sulla combinazione di farmaci citotossici e antiretrovirali per la terapia dei tumori in fase avanzata. Poiché i farmaci sono già commercializzati, il trasferimento dei protocolli alla pratica clinica avverrà in tempi brevi, previa la registrazione di Indinavir per la nuova indicazione d'uso.

#### **Studio dell'immunità nativa e adattativa in risposta ad antigeni di HIV/SIV**

Abbiamo recentemente dimostrato che la proteina Tat biologicamente attiva: i) promuove la maturazione e l'attivazione delle cellule dendritiche di origine monocitaria e ne potenzia l'attività di presentazione dell'antigene. Abbiamo inoltre dimostrato che Tat ii) lega Env formando un nuovo complesso di entrata per il virus. Similmente alla proteina Tat, anche la proteina Nef seppure con diversi meccanismi ha effetti immunomodulatori/disregolatori tendenti a favorire l'*uptake* e la disseminazione di HIV alla porta di entrata. Al tempo stesso, nostri dati indicano che Tat (per quanto riguarda Nef gli studi sono ancora in corso) esercita anche una funzione immunomodulatoria/adiuvante associata ad antigeni di HIV ma che potrebbe interessare anche antigeni di altri patogeni infettivi. Questi dati grande sono rilevanti: i) per la comprensione della patogenesi virale, in quanto Tat e Nef espresse molto precocemente nel corso dell'infezione potrebbero deviare sia la risposta naturale che quella acquisita in una direzione favorevole per il virus e ii) in approcci vaccinali, perché costituiscono la prima dimostrazione che un antigene virale oltre a molteplici attività immunoregolatorie esercita immunoadiuvanza. Poiché il CNAIDS è fortemente impegnato in studi sia di patogenesi che di vaccinologia, è di grande importanza la messa a punto e l'utilizzo di metodologie volte a caratterizzare le attività di queste due proteine virali e i meccanismi associati

#### **Risultati attesi nel triennio**

Parte del lavoro sarà: i) dedicata all'allestimento e la validazione di nuovi saggi immunologici ivi incluse le attività ADCC e ADCVI, i saggi di neutralizzazione dell'infezione, saggi di neutralizzazione della trans-infezione in sistemi includenti Tat per l'identificazione di risposte umorali e cellulo-umorali dirette contro il complesso Tat/Env in scimmie e soggetti vaccinati e/o infettati; ii) studiare i fattori rilasciati dopo stimolazione su diversi tipi cellulari (PBMC, DC) per la loro possibile attività antivirale o immunoadiuvante; iii) procedere a un'analisi del trascrittoma mediante l'impiego di *microarray* che aiuteranno a definire le modalità e gli effetti della adjuvanzza a livello di immunità naturale (citochine infiammatorie e soppressore, chemochine, fattori anti- e pro-apoptotici, IFN e proteine del ciclo cellulare, ecc.) e adattativa; iv) continuare lo studio del fenotipo T *helper* indotto, l'identificazione di cellule T regolatorie, lo studio dell'induzione e del mantenimento della memoria di cellule citotossiche, le modificazioni del repertorio epitopico T di antigeni virali e vaccinali.

### **Trasferibilità dei risultati**

Uno studio approfondito della risposta immune in corso di infezione naturale acuta e cronica e in animali vaccinati sia protetti che non protetti fornirà importanti elementi per comprensione della patogenesi virale e fornirà uno strumento importante per il disegno di nuove strategie vaccinali. Queste metodiche immunologiche, standardizzate e validate, potranno essere utilizzate in altri ambiti di ricerca basati su modelli di primati non umani e sull'uomo e per la valutazione dell'immunogenicità e dell'efficacia dei vaccini in sperimentazione

### **Studio della risposta immune contro l'infezione da HIV-1 in individui sieronegativi ripetutamente esposti all'infezione (MEU) e in pazienti non progressori (LTNP) diretto ad identificare correlati di protezione immunologica**

Lo studio è volto all'identificazione di correlati di protezione immunologica in corso d'infezione e/o esposizione naturale all'HIV. Gli individui sieronegativi ripetutamente esposti all'infezione MEU rappresentano un modello naturale di resistenza all'infezione da HIV. D'altra parte, individui sieropositivi non progressori, LTNP, una piccola frazione (1-2%) d'individui infetti che mostrano un deterioramento contenuto delle funzioni immunologiche, bassi livelli di replicazione virale e buone condizioni cliniche in assenza di alcuna terapia antiretrovirale, rappresentano un esempio di controllo immunologico dell'infezione da HIV, che coinvolge differenti meccanismi (genetici, immunologici e virologici) di protezione.

Tali studi sono diretti ad identificare meccanismi e/o correlati di protezione immunologica naturale e antigene-specifica diretti contro prodotti di geni regolatori e strutturali di HIV.

Dagli studi sin qui condotti emerge una significativa correlazione tra la presenza di una risposta immune contro la proteina Tat di HIV e la non progressione della malattia. Questi studi potranno contribuire ad ottimizzare i nuovi "targets" vaccinali e indirizzare interventi immuno-terapeutici in soggetti già infettati. Tali studi proseguono in cooperazione con l'IFO, nell'ambito di una convenzione ISS/IFO per lo sviluppo di vaccini contro l'HIV/AIDS.

### **Risultati attesi nel triennio**

Oltre alla raccolta di tutte le fondamentali informazioni cliniche (sesso, età, categoria di rischio, malattie concomitanti etc) e dei parametri laboratoristici di routine (sierologia HIV-1, ematologia, biochimica, valutazione delle sottopopolazioni linfocitarie, viremia plasmatica), lo studio include una analisi prospettica della risposta immune anti-virale specifica (umorale e cellulare).

In particolare, la valutazione della risposta immune adattativa contro proteine regolatorie (Tat, Nef) e/o strutturali (Gag, Env) dell'HIV-1 viene attualmente condotta come segue:

- Immunità umorale (determinazione e titolazione di IgG, IgA and IgM specifiche, mappatura degli epitopi B-cellulari, valutazione della attività neutralizzante degli anticorpi identificate)
- Immunità cellulo-mediata (risposta linfoproliferativa, determinazione della risposta CTL, mappatura degli epitopi T cellulari; analisi sottopopolazioni regolatorie-Treg)
- Campioni di plasma, siero e cellule mononucleate del sangue periferico sono sottoposte a conservazione criogenica.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati di questo studio offrono nuove e originali informazioni utili non solo all'identificazione di correlati di protezione immunologica utili ad indirizzare più

miratamente gli interventi di tipo immuno-terapeutico in soggetti già infettati, ma anche alla determinazione di possibili marcatori di progressione clinica della malattia e costituire quindi una piattaforma clinica e laboratoristica per lo sviluppo di interventi immunologici specifici e la valutazione di strategie vaccinali basate sull'impiego sia di proteine strutturali che regolatorie di HIV-1.

### **Sviluppo e standardizzazione di tecniche e saggi diagnostici e preparazione di Procedure Operative Standardizzate (*Standard Operating Procedures* - SOP) per la sperimentazione di candidati vaccinali per la sperimentazione clinica in Europa e nei Paesi in via di sviluppo**

Lo sviluppo e standardizzazione di tecniche e saggi diagnostici specifici mirati alla preparazione di SOP per la sperimentazione di candidati vaccinali sia in modelli animali che nell'uomo, rappresenta una iniziativa strategica mirata a permettere la definizione di protocolli sperimentali e a facilitare la comparazione di dati generati in centri diversi. Su queste premesse, si intende realizzare una serie di attività dirette allo sviluppo, validazione e standardizzazione di nuove tecnologie di indagine immunologica, quali: i) elaborazione di SOP per campionamento di materiale biologico, criopreservazione e trasporto; ii) standardizzazione e validazione di test in citofluorimetria per determinazioni immunofenotipiche di base e avanzate; iii) standardizzazione e validazione di test per la valutazione di risposte immuni T Helper; iv) standardizzazione e validazione di test per la determinazione di specifiche funzioni effettrici antigene-specifiche (tetrameri-HLA; colorazioni intracellulari per enzimi litici; attività citotossica specifica).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Al fine di implementare la valutazione di risposte immuni specifici in corso di vaccinazione, si intende standardizzare e validare le seguenti metodiche, basate su tecniche di analisi citofluorimetrica:

- Valutazione della proliferazione antigene-specifica delle differenti sottopopolazioni linfocitarie dopo colorazione con CFSE (*Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*).
- Valutazione della risposta citotossica tramite rilevazione della produzione intracellulare di citochine.
- Valutazione della risposta citotossica non-MHC ristretta (ADCC, NK).
- Studio delle cellule CD4+ e CD8+ effettrici e di memoria.
- Caratterizzazione e analisi di cellule B.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Lo sviluppo e standardizzazione di tecniche mirate alla valutazione della risposta immuni a candidati vaccinali rappresenta un aspetto chiave nella conduzione di sperimentazioni cliniche, sia per quanto riguarda la definizione dei protocolli clinico-sperimentali, ma soprattutto per la realizzazione di un processo di armonizzazione fondamentale per la valutazione e comparazione di differenti candidati vaccinali nel corso di sperimentazioni cliniche multicentriche.

### **Tat, Nef, Env di HIV-1 bersagli di studi patogenetici e vaccinali nel modello del primate non umano**

La trasmissione di HIV-1 avviene preferenzialmente per vie mucosali nonostante che le cellule mucosali non rappresentino il bersaglio ideale per HIV. Gli eventi precoci nelle interazioni virus-cellula ospite alla porta di infezione sono critici e di fondamentale importanza per ampliare le conoscenze patogenetiche necessarie allo sviluppo di nuovi

approcci contro HIV/AIDS. Tat e Nef sono proteine di HIV espresse in tempi precoci dopo l'infezione, vengono rilasciate nel mezzo extracellulare e oltre al loro ruolo nel ciclo virale, inducono numerosi effetti biologici su cellule bersaglio, nel microambiente mucosale. Ipotizziamo che esse esercitino un ruolo fondamentale favorente la trasmissione dell'infezione. Per questo motivo essi rappresentano bersagli ideali per approcci vaccinali contro HIV/AIDS.

D'altro canto, a fronte di una popolazione virale eterogenea presente al momento della trasmissione, solo poche varianti virali superano la barriera mucosale. E' stato descritto che varianti con modificazioni in Env (es in V1/V2) sono particolarmente suscettibili alla neutralizzazione. Nella infezione naturale, le risposte immuni generate in tempi tardivi non sono sufficienti a controllare significativamente l'infezione. Nei vaccinati, la presenza di anticorpi neutralizzanti presenti al momento dell'esposizione al virus potrebbero non essere sufficienti a neutralizzare gli "escape mutant".

#### **Risultati attesi nel triennio**

Sulla base di queste considerazioni ci proponiamo di:

- Valutare in modelli mucosali *in vitro* il ruolo di Tat e di Nef di HIV-1
  - nell'aumentare l'efficienza dell' infezione;
  - nel modulare il tropismo virale.
- Studiare nel modello animale del primate non umano, le interazioni virus-ospite, dopo esposizione mucosale di virus chimerico SIV/HIV esprimente proteine Tat (HIV) e Nef (SIV). Valutazione dello stato del genoma virale (presenza ed espressione) nei tessuti genitali di scimmie cronicamente infettate al fine di identificare la popolazione prevalente e studio delle caratteristiche biologiche del virus isolato da questi tessuti come pure da altri tessuti mucosali o linfoidi;
- Costruzione di virus chimerici SIV/HIV contenenti delezioni/modificazioni nella regione V1/V2 di Env. 4. La variante virale selezionata per capacità infettante e suscettibilità alla neutralizzazione sarà inoculata per via mucosale in scimmie cynomolgus. L'evoluzione virale sarà valutata sia nelle fasi precoci dell'infezione che nella fase cronica.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La conoscenza dei meccanismi patogenetici della trasmissione dell'infezione, il ruolo esercitato da geni regolatori di HIV (Tat e Nef) saranno di fondamentale importanza per il disegno di interventi preventivi o terapeutici contro HIV/AIDS. Inoltre un valido contributo alla definizione di un vaccino efficace contro HIV/AIDS sarà dato dallo studio di varianti virali altamente suscettibili alla neutralizzazione. Il risultato di questi studi e il fatto che si utilizzi il modello del primate non umano filogeneticamente vicino all'uomo, assicurano la piena e veloce trasferibilità di applicazione in trial clinici.

**Centro nazionale  
AIDS per la patogenesi e vaccini contro HIV/AIDS**

---

**Attività di controllo, valutazione, parere**



### **Controllo dei presidi medico-diagnostici per la diagnosi di laboratorio dell'infezione da HIV**

I dispositivi medico-diagnostici *in vitro* e gli eventuali relativi accessori, utilizzati per la diagnosi di infezione da HIV, devono essere per legge controllati da organismi notificati, autorizzati ad espletare le procedure di valutazione di conformità, di cui all'art. 9 del DL.vo 8/9/2000, n. 332. L'ISS è un organismo notificato e, come tale, esamina la domanda della ditta produttrice e, espletati i controlli previsti nel suddetto decreto, se conformi con le disposizioni in esso presenti, rilascia al richiedente un certificato di esame CE del dispositivo, che contiene le conclusioni dei controlli, le condizioni di validità, i dati necessari per identificare il dispositivo medico-diagnostico ed eventualmente la descrizione e la destinazione del prodotto. L'ISS deve rilasciare inoltre un'approvazione addizionale in caso di modifiche al dispositivo medico-diagnostico, che possano influire sulla conformità ai requisiti essenziali previsti nel decreto legislativo.

In base allo stesso decreto, l'ISS, in quanto organismo notificato presso l'UE, per la certificazione di DM ai fini della loro commercializzazione in tutti i Paesi della Comunità, deve procedere anche alle prove e agli esami per la valutazione dei prodotti successivi (lotti) ed eventualmente deve richiedere le misure correttive da apportare per poter autorizzare la commercializzazione del lotto.

Il Reparto "Infezioni da Retrovirus nei Paesi in via di sviluppo" del CNAIDS esercita, per l'ISS, la funzione di controllo dei presidi diagnostici di laboratorio dell'infezione da HIV. Pertanto, il Reparto effettua le prove e gli esami previsti nel decreto legislativo e, eventualmente, le valutazioni sperimentali addizionali. Tale attività si deve avvalere di un continuo aggiornamento delle metodiche. In particolare, in ottemperanza alla Circolare Ministeriale n. 17 del 30/10/2000 e al DM del 25/1/2001, vengono effettuate le valutazioni sperimentali e tecniche per l'autorizzazione alla commercializzazione per i kit diagnostici.



**Centro nazionale  
Epidemiologia, sorveglianza e promozione della salute**

**Attività di ricerca**



## **Alimentazione, stato di salute e malattie croniche**

Sulla coorte dell'Osservatorio epidemiologico cardiovascolare/*Health Examination Survey* attualmente in corso vengono raccolte una serie di informazioni relative alla alimentazione attraverso il questionario alimentare *food-frequency European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* (EPIC) dell'Istituto Tumori di Milano. Tale questionario a lettura ottica, attraverso un software creato *ad hoc*, viene trasformato in nutrienti. Le informazioni ottenute possono essere messe in relazione con i fattori di rischio cardiovascolare misurati nel corso dell'indagine (assetto lipidico, pressione arteriosa, glicemia), aggiustati per gli stili di vita dichiarati dai partecipanti per età, genere e livello socio-economico. È possibile il follow-up degli eventi cardiocerebrovascolari e di altre patologie cronicodegenerative, nonché la valutazione del livello di attenzione e conoscenza dei rischi derivati per la salute, attraverso una indagine telefonica realizzata in collaborazione con i ricercatori del progetto MOLI-SANI.

Il progetto rappresenta una fase successiva del Progetto CUORE. È pensato per acquisire informazioni sulle abitudini alimentari, sui fattori che influenzano la scelta dei cibi e sulla consapevolezza relativa al rapporto tra alimentazione e salute nella popolazione italiana. Tali conoscenze sono particolarmente importanti per definire nuove strategie di prevenzione basate sul rapporto tra ciò che mangiamo e il nostro stato di salute.

### **Risultati attesi nel triennio**

Nel 2012 verrà conclusa l'indagine Osservatorio epidemiologico cardiovascolare/HES e saranno disponibili le informazioni sulle abitudini alimentari di circa 9.000 uomini e donne adulti, residenti nelle 20 Regioni italiane. I questionari alimentari raccolti verranno codificati e letti e trasformati in nutrienti. Contemporaneamente verrà avviata la ricerca dello stato in vita e iniziata l'indagine telefonica per la raccolta delle informazioni su eventuali patologie, in particolare malattie cardio-cerebrovascolari e tumori, occorse dopo la HES.

Gli eventi così identificati verranno validati dagli esperti del progetto CUORE e utilizzati per le analisi statistiche.

### **Trasferibilità dei risultati**

I dati raccolti verranno elaborati per età, genere e livello socio-economico, resi disponibili sul sito del progetto CUORE ([www.cuore.iss.it](http://www.cuore.iss.it)) e pubblicati su riviste scientifiche.

## **Alcol. Attività di elaborazione e realizzazione di attività di ricerca, prevenzione, promozione della salute e di formazione collegate alla programmazione e alle politiche socio-sanitarie a livello nazionale, regionale, europeo e internazionale**

L'Osservatorio Nazionale Alcol (ONA) dal 1999 è l'articolazione nazionale del Centro WHO per la Ricerca e la promozione della salute su alcol e problematiche alcolcorrelate e l'organismo ufficiale ISS che si occupa di alcol. Contribuisce alle Relazioni annuali al Parlamento (L. 125/2001), elabora e pubblica aggiornamenti periodici originali su dati epidemiologici e sui risultati dei progetti attuati con il Ministero della Salute. Condivide azioni e obiettivi con quelli del Reparto Salute della popolazione, del WHO CC e con quelli europei. Le attività istituzionalmente orientate alla produzione di dati epidemiologici, evidenze scientifiche e strumenti per l'identificazione precoce dell'alcol dipendenza e ad interventi di prevenzione dei problemi alcol-correlati si ispirano al piano di lavoro concordato 2011-2014, che il Centro WHO svolge su mandato governativo. L'ONA organizza annualmente l'*Alcohol Prevention Day* e fornisce consulenza tecnico-scientifica al Ministero della Salute, alle Regioni, alle ASL, collaborando con la Consulta Nazionale

Tossicodipendenze e la Presidenza del Consiglio (DPA) per la Relazione Annuale sulle Tossicodipendenze.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- pubblicazioni scientifiche e report epidemiologici;
- creazione strumenti di rilevazione epidemiologica di valenza europea (*Health Monitoring*, ECHIM e Siveas);
- creazione e implementazione di reti dedicate alla valutazione dell’impatto dell’alcol sulla salute;
- attuazione di sistemi di monitoraggio sull’alcol per indicatori e definizione degli standard di *health reporting* (WHO *Alcohol Control Database*);
- formazione degli operatori sanitari, sociali e scolastici sull’epidemiologia e sull’identificazione precoce e sul monitoraggio del consumo/abuso alcolico;
- definizione di strategie di comunicazione, informazione, prevenzione e promozione della salute;
- ridefinizione delle conoscenze riguardo i problemi alcol correlati tra gli operatori socio-sanitari, popolazione generale, amministratori locali, organizzazioni;
- formazione e qualificazione degli operatori coinvolti sulla metodologia e sui materiali utilizzati per diffondere l’approccio sperimentale;
- riduzione della quota di bevitori a rischio che si avvalgono del *counselling* indicato dai medici di medicina generale (MMG) e dagli operatori socio-sanitari formati attraverso lo standard IPIB.PHEPA;
- riduzione, nella comunità, dei problemi alcol-correlati;
- riduzione indotta dei costi sociali e sanitari alcol-correlati;
- attuazione di servizi al cittadino (Telefono Verde Alcol) e ai decisori politici (Ministeri, Regioni, Aziende Sanitarie, Province e Comuni).

### **Trasferibilità dei risultati**

La trasferibilità è garantita dalla implementazione pratica dei risultati prodotti attraverso la produzione di iniziative specifiche di prevenzione e promozione della salute in collaborazione con i Ministeri e la Presidenza del Consiglio. La definizione a livello europeo di linee guida cliniche per la prevenzione del bere problematico e delle modalità standardizzate di intervento breve hanno già attivato la disseminazione e il trasferimento a livello nazionale dell’approccio specifico ai vari utilizzatori finali: i decisori politici, i professionisti della salute, gli utenti. A partire dalla formazione dei medici e del personale sanitario alle iniziative di promozione della salute il processo seguito dalle progettualità si estrinseca nella sollecitazione di azioni nazionali, regionali e locali che coinvolgono la società e ne rinforzano il tessuto contribuendo a diffondere stili di vita più sani e a promuovere la tutela delle popolazioni più vulnerabili.

### **Alzheimer’s Cooperative Valuation in Europe (ALCOVE)**

Il progetto si propone quattro obiettivi principali: i) miglioramento dei dati epidemiologici; ii) migliorare la prevenzione del rischio e la diagnosi di demenza di Alzheimer e altre demenze; iii) migliorare le pratiche esistenti e i modelli assistenziali per i soggetti affetti da demenza e i loro familiari; iv) autonomia e dignità dei pazienti affetti da demenza da un punto di vista etico, volta al miglioramento della qualità della vita.

### **Risultati attesi nel triennio**

Migliorare le modalità di raccolta dei dati epidemiologici nell’ambito delle demenze. Ottenere informazioni sulla prevalenza d’uso dei farmaci antidemenza e antipsicotici nelle

demenze. Ottenere informazioni sulla disponibilità di accesso alle cure per i pazienti con demenza.

**Trasferibilità dei risultati**

Diffondere nella popolazione strategie di prevenzione del rischio e di promozione della diagnosi precoce.

**Analisi della prescrizione farmaceutica nella Regione Lazio**

Analizzare e descrivere nelle sue diverse componenti l'uso dei farmaci nella Regione Lazio predisponendo un rapporto annuale complessivo e rapporti periodici trimestrali rivolti a gruppi di medici (équipe) mirati a migliorare l'appropriatezza prescrittiva e un uso razionale dei farmaci. Conduzione di studi di farmacoepidemiologia.

**Risultati attesi nel triennio**

Sviluppo di modelli per l'analisi dell'appropriatezza. Pubblicazione su riviste scientifiche dei risultati di studi di popolazione sul profilo beneficio/rischio dei farmaci.

**Analisi della prescrizione farmaceutica nella Regione Umbria**

Da oltre 15 anni è attiva una collaborazione fra Regione Umbria e ISS finalizzata all'analisi della prescrizione farmaceutica. Il monitoraggio delle prescrizioni e le analisi condotte a livello nazionale, regionale, di ASL e di gruppi di medici, forniscono spunti di riflessioni per gli operatori sanitari che si occupano di farmaci. A partire dall'analisi della variabilità, e dalle discrepanze fra caratteristiche della prescrizione osservata e livelli attesi in base alla frequenza delle patologie, possono essere individuate le aree prioritarie per avviare interventi di audit. La promozione dell'uso appropriato dei farmaci, così come un utilizzo più razionale di tutti gli interventi sanitari, oltre a evitare sprechi consente di ridurre i rischi inutili ai quali sono sottoposti i cittadini. Vi è poi la necessità di chiarire in modo sempre più approfondito il profilo beneficio-rischio dei farmaci dopo l'approvazione all'immissione in commercio. I risultati del progetto possono contribuire a creare una migliore conoscenza della prescrizione nella regione, ad assumere decisioni regolatorie, e a valutare gli effetti di modifiche della prescrivibilità dei farmaci a livello nazionale e dell'Umbria.

**Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi consistono in:

- Analisi della prescrizione di farmaci e predisposizione di rapporti periodici della prescrizione farmaceutica territoriale (a livello di ASL, distretto e medico) e ospedaliera da utilizzare nell'ambito di interventi di audit. In particolare, si prevede di: approfondire l'analisi sull'uso dei farmaci in alcune sottopopolazioni (es. bambini, anziani, pazienti con diabete o altre patologie); analizzare l'appropriatezza della prescrizione per specifiche categorie terapeutiche di maggiore interesse nella popolazione; e valutare la variabilità dei comportamenti prescrittivi.
- Conduzione di studi di farmacoepidemiologia tesi a verificare i segnali di possibili associazioni fra uso dei farmaci e esiti clinici, anche attraverso record-linkage tra gli archivi della prescrizione farmaceutica e specialistica e quelli dei ricoveri ospedalieri.
- Analisi della prescrizione di prestazioni specialistiche ambulatoriali.
- Collaborazione con le strutture dell'SSR alla realizzazione di interventi di audit sull'uso appropriato dei farmaci.
- Descrizione dell'uso dei farmaci nella popolazione immigrata e confronto con quella italiana.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati della collaborazione fra ISS e Regione Umbria consentiranno di promuovere, in coerenza con le altre iniziative avviate dall'SSR Umbria, l'appropriatezza della prescrizione farmaceutica sia in ambito territoriale che ospedaliero, e di migliorare le conoscenze relative al profilo di beneficio-rischio dei farmaci.

### **Anziani: aterosclerosi e disturbi cognitivi**

L'invecchiamento della popolazione è attualmente uno degli eventi demografici più rilevanti in Italia così come in altri paesi industrializzati. L'età media della popolazione italiana è aumentata negli ultimi anni in modo straordinario, al punto che ormai un Italiano su cinque è ultrassessantacinquenne e numerosi studi internazionali per i prossimi decenni confermano questa tendenza.

L'inarrestabile aumento delle fasce più anziane di popolazione si ripercuote con forza sull'incremento di patologie quali l'aterosclerosi e i disturbi cognitivi tipici di queste età. Nell'ambito del progetto "Un approccio integrato per la individuazione di marcatori funzionali, biochimici e genetici di valore diagnostico e prognostico in persone anziane, molto anziane (centenari) e con deficit neurologico (demenza, demenza di Alzheimer, *Mild Cognitive Impairment*)" vengono valutati gli aspetti cognitivi di una coorte di gemelli anziani arruolati nella provincia di Latina tra il 2002 e il 2004.

Nell'ambito di una collaborazione internazionale con la *Semmelweis University of Budapest* sono stati studiati alcuni aspetti legati ai processi aterosclerotici (spessore dell'intima-media delle arterie carotidi e valutazione della rigidità della parete arteriosa) in tre campioni di gemelli reclutati in Italia, Ungheria e Nord America. L'arruolamento è terminato e complessivamente hanno aderito allo studio 760 gemelli (150 coppie di dizigoti e 230 coppie di monoigoti).

### **Risultati attesi nel triennio**

La coorte dei gemelli di Latina consentirà di definire il contributo relativo delle componenti genetiche e non-genetiche alla variabilità totale dei fenotipi inerenti le capacità cognitive (*Mini Mental State Evaluation* – MMSE, *Center for Epidemiologic Studies Depression Scale* – Cesd, Memoria prospettica, Stroop, *Activity of Daily Living* – ADL, *Established Population for the Epidemiologic Study of the Elderly* – Epese). I risultati preliminari hanno evidenziato per alcuni di questi parametri una componente genetica compresa tra il 45 e il 64%. Parallelamente, per gli stessi soggetti, verranno analizzati i risultati emersi dalla determinazione su siero di alcuni marcatori biologici quali la P-Selectina, capacità antiossidante totale e acido urico. Il dosaggio dei livelli plasmatici di questi parametri è stato possibile grazie alla disponibilità nella banca biologica del CNESPS di campioni di siero raccolti al momento del reclutamento. Si stimerà la componente ereditaria dei suddetti marcatori che sembrano essere associati con il rischio di sviluppare disturbi cognitivi in età avanzata. Analisi successive valuteranno inoltre la relazione tra questi parametri e quelli scaturiti dalla valutazione neurocognitiva.

Lo studio internazionale ha stimato le componenti genetiche (A) e ambientali (condivise, C e non condivise, E) dello spessore dell'intima (C=30%, E=60%), della rigidità della parete arteriosa (C=45%, E=55%) e della velocità del flusso dell'aorta (A=55%, E=45%) per il campione italiano. Sono state inoltre raccolte informazioni sul benessere psicologico quale fattore protettivo dell'aterosclerosi e i risultati saranno analizzati nei prossimi mesi.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati ottenuti dallo studio dei gemelli e soprattutto la loro generalizzabilità a tutti gli individui rappresentano un elemento di conoscenza molto importante per la diagnosi precoce

dell'aterosclerosi e dei disturbi cognitivi e, ancor di più, per la prevenzione dei fattori di rischio connessi con l'insorgenza di queste patologie.

### **Arruolamento e sorveglianza epidemiologica di una coorte nazionale di nati**

Lo studio vuole indagare, attraverso uno studio di coorte di nuovi nati, le cause e l'andamento di numerose malattie e condizioni tra cui i disturbi respiratori, l'asma e le allergie del bambino, l'obesità, i disturbi del sonno, dello sviluppo cognitivo e del comportamento, gli incidenti e i traumi nell'infanzia. Lo studio vuole inoltre raccogliere informazioni cliniche ed epidemiologiche e costituire una Banca di campioni biologici dei nati arruolati e delle loro mamme sui quali misurare parametri biochimici e fattori genetici che si ritiene possano avere un ruolo nello sviluppo delle patologie e/o condizioni di salute indagate dallo studio.

L'attività sarà concentrata prevalentemente sulla costituzione della banca dei campioni biologici e consisterà in:

- ricerca e confronto delle fonti per l'identificazione della tipologia di materiale biologico appropriato al tipo di studio (ipotesi da testare, marcatori biologici di interesse, disponibilità di saggi analitici);
- ricerca e confronto delle fonti sulle procedure di raccolta, processamento, trasporto e conservazione del materiale biologico;
- ricerca, confronto e valutazione delle procedure e strumenti per la codifica, registrazione, localizzazione e tracciatura dei campioni biologici;
- valutazione della qualità del materiale raccolto e conservato.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Identificazione dei tipo di materiali biologici da raccogliere, pianificazione del protocollo di raccolta, processamento, separazione, suddivisione in aliquote, codificazione, registrazione e conservazione dei campioni biologici da almeno 4.000 individui (2.000 mamme e 2.000 bambini).

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il patrimonio di campioni biologici che sarà raccolto e conservato sarà a disposizione del Consorzio Piccolipiù, anche oltre la scadenza del finanziamento dello specifico progetto, per studi eziologici sul ruolo delle esposizioni ambientali in gravidanza e nella primissima infanzia e dei fattori genetici sulla salute in età pediatrica e nell'adolescenza.

### **Arruolamento e sorveglianza epidemiologica di una coorte nazionale di nati**

Lo studio vuole indagare, attraverso uno studio di coorte di nuovi nati, gli avvenimenti del periodo prenatale e dei primi mesi di vita del bambino che influenzano la crescita e possono avere un effetto sull'incidenza di episodi morbosi della prima infanzia e dell'età adulta. Nell'ambito di tali attività, particolare attenzione è dedicata all'arruolamento nelle aree di quattro Regioni italiane (Piemonte, Friuli Venezia Giulia, Toscana e Lazio) una coorte di nati da seguire prospettivamente fino ad un anno di età (totale di 2.000 nati) costituendo una banca dei campioni biologici dei nati arruolati e delle loro mamme e il conseguente mantenimento della coorte nei primi 12 mesi con l'utilizzo di strumenti di raccolta dati effettuando e presentando le analisi preliminari per le stime della frequenze di fattori predittivi delle patologie infantili.

Tra gli obiettivi di questa convenzione vi è la messa a punto di una serie di strategie comunicative attraverso l'utilizzo di strumenti quali:

- attività di formazione residenziale rivolta a professionisti sanitari e sociosanitari;

- implementazione di una piattaforma web istituzionale per realizzare una CoP su piattaforma web <https://scms.iss.it/moodle19/login/index.php> e una raccolta dati delle unità operative partecipanti al progetto;
- revisione di letteratura scientifica inerente il progetto e selezione degli articoli da pubblicare e archiviare sulla piattaforma web.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- individuazione e condivisione sulla piattaforma delle risorse comuni, potenzialmente utili alla pianificazione di studi futuri (es. traduzioni di documenti WHO, linee guida pertinenti, banche dati, link, ecc.);
- conoscenza delle procedure per la gestione di documenti tramite archivi cartacei e archivi digitali attraverso l'uso di applicativi web dedicati per favorire la possibilità di acquisire dati attraverso l'inserimento di dati all'interno di data base online (registro arruolamento e registro di laboratorio), forum per lo scambio di pareri, possibilità di realizzare servizi web in caso di studi multicentrici.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- progettazione di una banca dati di informazioni aggiornata sulla rete dei servizi socio-sanitari e predisposizione del sistema di trasmissione e distribuzione delle informazioni al fine di costruire la rete dei flussi informativi;
- diffusione dell'utilizzo di un software con specifiche caratteristiche sulla base delle esigenze di futuri studi condotti sul web che implicano contesti web più ampi uniti ad altre attività quali sistemi di raccolta dati, condivisione di materiali e informazioni in maniera categorizzata che abbia un livello di sicurezza garantita, accuratezza e precisione nella raccolta dati.

### **Aspetti psicosociali di patologie somatiche**

Questa linea di ricerca include studi epidemiologici con disegno sia trasversale che longitudinale su popolazioni di pazienti affetti da varie patologie somatiche.

Le principali variabili psicosociali oggetto di studio sono i sintomi psicopatologici con particolare riguardo al livello di depressione e di ansia, la personalità, le capacità di regolazione emozionale.

Vengono esaminate le reciproche correlazioni tra gli aspetti psicosociali e numerose variabili clinicamente importanti come l'adesione al trattamento, l'esito del trattamento, la qualità della vita, la soddisfazione per l'assistenza ricevuta.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Questa linea di ricerca fornisce dati, attualmente scarsamente disponibili, sui rapporti tra la qualità della vita, lo stato e l'andamento clinico di alcune importanti patologie somatiche e una serie di variabili di interesse in salute mentale. In generale, essa consente di esaminare i molteplici e reciproci rapporti tra la salute mentale e la salute fisica.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le conoscenze rese disponibili da questa linea di ricerca hanno diverse importanti potenziali ricadute sull'assistenza, in quanto consentono di individuare gruppi di pazienti che in base al profilo psicosociale risultano a maggior rischio di una serie di esiti clinici indesiderabili (es. cattiva adesione al trattamento, minore soddisfazione per l'assistenza, peggiore qualità della vita, peggiore esito della patologia) e che dunque possono essere

oggetto di particolare attenzione clinica o specifiche strategie di intervento mirate a migliorare gli esiti.

### **Assunzione di acido folico e gravidanze gemellari: interazioni gene-ambiente**

Obiettivo dello studio è la stima del rischio relativo di gravidanza gemellare data l'assunzione di acido folico prima del concepimento usando uno studio caso controllo. In particolare, si vuole verificare se alcuni geni noti, ed eventuali altri geni che mostrino possibili funzioni nel metabolismo di questa vitamina, possano interagire con l'acido folico nell'instaurarsi della gravidanza gemellare.

Lo studio ha arruolato circa 400 mamme di gemelli, e circa 300 mamme di non gemelli e sono stati raccolti circa 500 campioni di saliva. Tutte le mamme arruolate hanno compilato un questionario riguardante l'eventuale assunzione di acido folico e le abitudini alimentari nel periodo precedente e durante la gravidanza. Nei primi mesi del 2012 si procederà all'estrazione di DNA e alla genotipizzazione per geni coinvolti nel metabolismo dell'acido folico. Sarà quindi effettuata l'analisi dei dati per verificare eventuali interazioni gene-ambiente.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- stima dell'*odds ratio* (OR) di avere una gravidanza gemellare data (o no) l'assunzione di acido folico;
- stima dell'OR di avere una gravidanza gemellare data (o no) l'assunzione di acido folico escludendo le gravidanze da procreazione medicalmente assistita;
- stima della frequenza di esposizione (assunzione di acido folico) nei controlli: tempi, modi e dosi;
- stima della variazione dell'assunzione di acido folico per alcune variabili materne quali: età, livello socioculturale, parità, ecc.;
- stima dell'interazione gene-ambiente.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Se sarà dimostrato che l'uso di acido folico aumenta la probabilità di gravidanza gemellare questo risultato avrà un impatto soprattutto sulle decisioni che molti Paesi europei stanno prendendo in termini di fortificazione di farine con acido folico dato che una gravidanza gemellare ha sempre maggiori rischi di una gravidanza singola. In particolare non esistono dati a riguardo che tengono conto delle gravidanze da procreazione medicalmente assistita.

### **Azioni relative alla riduzione del consumo di sale in Italia: verifica delle ricadute dell'accordo con i panificatori e programma "Meno sale più salute"**

Secondo il *World Health Report* del 2002 della WHO, il 62% degli incidenti cerebrovascolari e il 49% dei casi di cardiopatia ischemica sono attribuibili ai livelli elevati della pressione arteriosa (PA). La relazione fra pressione arteriosa e malattie cardiovascolari (MCV) è lineare e continua, a partire da valori di 115/75mmHg, il che significa che nella maggior parte dei Paesi oltre l'80% degli adulti sono a rischio di MCV. Il ruolo di un eccessivo introito di sale è stato ampiamente studiato. Studi ecologici hanno messo in evidenza, in diverse popolazioni, la stretta relazione esistente tra l'assunzione abituale di sodio, la prevalenza di ipertensione arteriosa e l'aumento dei valori di PA con l'avanzare dell'età. Metanalisi degli studi clinici controllati, sia in pazienti ipertesi che in soggetti

normotesi, hanno dimostrato che una moderata riduzione del consumo di sale, è in grado di ridurre significativamente la PA.

Obiettivo del progetto è quello di monitorare il consumo medio di sodio, potassio e iodio e il contenuto di sale del pane su base regionale a distanza di tre anni dalla firma del protocollo d'intesa tra il Ministero della Salute e le associazioni dei panificatori allo scopo di valutarne gli effetti sullo stato di salute della popolazione generale adulta prendendo come riferimento l'indagine condotta nel 2008 nell'ambito del Ministero della Salute-GIRCI e OEC/HES.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Evoluzione del consumo medio giornaliero di sodio, potassio (indicativo dell'utilizzo di frutta e verdura nella comune alimentazione) e iodio pro-capite attraverso la raccolta delle urine delle 24 ore in campioni (n.=220) di popolazione adulta di età 35-79 anni in sei regioni del Nord, Centro e Sud del Paese, nelle quali è già stata eseguita la determinazione alla linea-base, a distanza di tre anni dall'accordo di collaborazione siglato con le associazioni dei panificatori; valutare lo stato di salute delle stesse persone attraverso un esame diretto con misurazione della pressione arteriosa e di indici antropometrici (peso, altezza, circonferenza della vita e dei fianchi) in modo da confrontarli con gli indicatori raccolti tre anni prima durante la HES; valutare nelle stesse regioni il contenuto medio di sale in campioni di pane e prodotti da forno e determinarne le differenze con i valori registrati precedentemente all'accordo con i panificatori; valutare nelle stesse regioni il livello di attenzione e di conoscenza del contenuto di sale negli alimenti e i relativi rischi per la salute.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Dare seguito alle raccomandazioni degli organismi internazionali (WHO, FAO, UE) in favore di ulteriori iniziative finalizzate alla riduzione del consumo di sale e al suo monitoraggio a livello di popolazione per la prevenzione delle malattie cardiovascolari e di altre malattie cronico-degenerative e creare le basi per una strategia nazionale per la riduzione del consumo di sale in Italia

### **Banca di campioni biologici**

La banca di campioni biologici è un sistema che conserva differenti tipi di campioni raccolti durante indagini epidemiologiche da sottoporre ad analisi successive alla raccolta in condizioni di recupero efficiente e di accettabile stabilità.

La banca di campioni biologici del CNESPS è costituita da freezer a -30°C e a -80°C contenenti campioni di siero, sangue intero, DNA estratto, urine e contenitori di azoto liquido in cui sono conservati siero, plasma, *buffy coat* ed emazie impacchettate. Il materiale biologico è conservato in paillette, contenute in *visotube*, disposti in *gobelette*, contenute dentro a *canister*, immersi in azoto liquido o in *criotube* nei vapori di azoto. Attualmente nella banca sono conservati campioni appartenenti a circa 30.000 persone esaminate una o più volte a partire dal 1987 e facenti parte di studi longitudinali prospettici. Ogni progetto ha una differente modalità di archiviazione per conoscere disponibilità e localizzazione dei campioni.

Obiettivo di questo progetto è quello di ampliare la banca attraverso la conservazione di materiale biologico raccolto nelle indagini su popolazione e la produzione di un software per l'archiviazione e localizzazione dei campioni biologici nonché dell'appaiamento con il database relativo agli studi longitudinali.

La banca fa parte del network BBMRI dell'UE e dello Hub italiano delle biobanche di popolazione (HIBP).

### **Risultati attesi nel triennio**

La banca verrà ampliata con l'acquisto di contenitori di azoto liquido e freezer a -80°C. Dal punto di vista tecnico verranno mantenute le condizioni migliori per il buon funzionamento. Sarà disponibile il software per l'archiviazione, la localizzazione dei campioni biologici e l'appaiamento con il database relativo agli studi longitudinali di tutti gli studi che afferiscono alla banca biologica del CNESPS (il progetto CUORE, GENOMEUTWIN, IPREA, il Registro delle demenze, l'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare/*Health Examination Survey*).

### **Trasferibilità dei risultati**

Disponibilità di campioni biologici per studi caso-controllo annidati nella coorte (*nested case-control study*). Questi studi presentano vantaggi sia rispetto agli studi di coorte che rispetto agli studi caso-controllo: sono protetti dai bias di selezione e di informazione, hanno bassi costi di analisi in quanto vengono condotti solo su un sottogruppo di soggetti anziché su tutta la coorte, e sono particolarmente adatti a studi eziologici poiché in essi è possibile discriminare le condizioni antecedenti alla malattia. Disporre di campioni biologici rappresenta un grande vantaggio, perché permette di rispondere a quesiti scientifici in tempi relativamente rapidi e in condizioni di massima efficienza.

## **Benessere psico-fisico, attitudine alla ricerca scientifica e alla donazione di campioni biologici**

La ricerca genetica e le banche biologiche come strumenti necessari per la conduzione di molti studi nell'ambito dell'epidemiologia eziologica sono in veloce sviluppo. Esiste un vasto dibattito internazionale sulla partecipazione dei soggetti alla ricerca, sulle motivazioni, sulle preoccupazioni che possono sorgere in relazione ai risultati individuali, alla loro comunicazione, alla privacy, e all'uso di campioni biologici, in particolare del DNA. Per contribuire al dibattito internazionale, è necessario approfondire queste tematiche nel contesto della ricerca italiana. Il progetto realizzerà indagini di tipo KAP (*Knowledge, Attitude and Practice*) su diversi campioni di popolazione (studio pilota pubblicato dalla proponente: *BMC Medical Ethics*, 2009) per indagare l'attitudine e le motivazioni che spingono gli individui a partecipare e a donare materiale biologici per la ricerca. In particolare, si intende indagare i fattori di interesse e di concern dei donatori in relazione a consenso informato, privacy e confidenzialità dei dati, obiettivi dello studio, delega ai Comitati Etici per uso e ri-uso dei campioni. Disponendo di un Registro di popolazione gemellare a ampia copertura nazionale (Registro nazionale Gemelli) si intende, inoltre, investigare con metodo gemellare le possibili correlazioni genetiche per i tratti di interesse, in particolare la "attitudine positiva" nei confronti della partecipazione e della donazione e il benessere psico-fisico e l'empatia.

### **Risultati attesi nel triennio**

Sviluppare una comprensione basata su evidenze empiriche dell'attitudine di vari gruppi di popolazione (per età, sesso, livello di istruzione ecc.) alla partecipazione alla ricerca epidemiologica di tipo eziologico, delle motivazioni che realizzano di fatto la compliance agli studi e alla richiesta delle banche biologiche.

Definizione di un quadro di riferimento che possa orientare nelle scelte comunicative per realizzare gli obiettivi di arruolamento e di tutela della privacy e dei *concern* specifici dei vari partecipanti/donatori in relazione ai diversi tipi, soggetti sani, affetti da patologia, genitori per partecipanti minori ecc.

Acquisire conoscenze su possibile correlazione tra benessere psico-fisico, e il tratto dell'empatia e "attitudine positiva" alla partecipazione.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati delle varie indagini potranno essere strutturate per fornire informazioni utili in ambito di *policy making*, per la definizione di specifiche politiche nazionali per la ricerca genetica e per le linee guida (*in itinere*) di gestione e *governance* delle banche biologiche per fini di ricerca.

I risultati ottenuti potranno essere comparati con quelli di altri Paesi e renderanno possibile un quadro di riferimento più completo per uso della CE impegnata nella definizione e nell'aggiornamento delle raccomandazioni e delle linee guida per la ricerca che fa uso di materiale biologico e per il legislatore nazionale.

### **Buone pratiche sull'alimentazione: valutazione del contenuto di sodio, potassio e iodio nella dieta degli italiani (MINISAL-GIRCSI)**

L'eccesso di sodio alimentare e l'insufficiente apporto di potassio attraverso il consumo di frutta e verdura risultano, in base ad un'ampia e riconosciuta evidenza epidemiologica, tra i fattori responsabili dell'altissima prevalenza di ipertensione arteriosa in Italia. La misurazione dello iodio fornisce un'attendibile informazione sul contenuto di iodio della dieta e quindi di eventuali carenze superabili attraverso l'uso di sale iodato.

La dieta abituale degli Italiani contiene un largo eccesso di sodio. Indagini condotte in alcune regioni negli anni '90 suggerirono livelli di assunzione intorno ai 10 g negli adulti e ai 7,5 g nei bambini. Secondo altri dati, il sodio discrezionale rappresenterebbe circa 1/3 e quello aggiunto nei prodotti trasformati, artigianali, industriali o della ristorazione collettiva sarebbe pari ad oltre la metà del totale. Il programma Guadagnare Salute annovera tra i suoi obiettivi la riduzione del consumo di sale in Italia. Analogo obiettivo è perseguito dal Gruppo di Lavoro Intersocietario per la Riduzione del Consumo di Sale in Italia (GIRCSI) al quale aderiscono numerose società scientifiche nazionali.

L'obiettivo del progetto è ottenere informazioni attendibili sul consumo medio di sodio, di potassio e di iodio pro capite nella popolazione italiana su base regionale, per classi di età, nell'ambito dell'azione di intervento sul consumo di sale prevista dal programma Guadagnare Salute.

### **Risultati attesi nel triennio**

Valutare attraverso metodologie standardizzate il consumo medio giornaliero di sodio, potassio e iodio nella popolazione italiana adulta e correlarlo con abitudini alimentari e stili di vita attraverso la selezione di un campione di individui sufficientemente rappresentativo della popolazione italiana di età compresa tra i 35 e i 79 anni, su base regionale, per sesso e per fasce di età; esame della popolazione con raccolta dei seguenti indicatori: pressione arteriosa, indice di massa corporea, frequenza cardiaca, attività fisica, abitudine al fumo, alimentazione con particolare riguardo al consumo giornaliero di pane, insaccati e formaggi, trattamenti farmacologici (indagine complementare a quella dell'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare); raccolta standardizzata delle urine delle 24 ore; misurazione della quantità delle urine nelle 24 ore; invio dei campioni all'Università Federico II di Napoli per la determinazione del contenuto di sodio, potassio e iodio dei campioni raccolti; appaiamento delle determinazioni sul campione di urine con i dati dell'esame della popolazione; analisi statistiche sulla relazione fra fattori di rischio e contenuto di sodio, potassio e iodio determinato nelle urine.

### **Trasferibilità dei risultati**

Attraverso le informazioni raccolte ed elaborate nell'ambito di questo progetto sarà possibile elaborare un programma che si prefigga di attuare politiche di intervento a sostegno di una graduale correzione dell'eccesso alimentare di sodio che veda tra i propri obiettivi la

valutazione basale del consumo di sale nelle diverse aree del Paese e del contenuto medio di sale dei prodotti alimentari che ne condizionano l'apporto. Tale valutazione è propedeutica al monitoraggio e alla valutazione dell'efficacia dell'intervento negli anni a seguire. Le attività proposte infatti, o almeno una parte di esse, dovranno essere ripetute a scadenza regolare, possibilmente biennale, allo scopo di valutare l'efficacia delle azioni messe in atto per la riduzione del contenuto di sale negli alimenti e per la riduzione dell'apporto sodico discrezionale in Italia.

### **Campi elettromagnetici e tumori**

Nell'ambito di questo studio è previsto:

- Conclusione dello studio di fattibilità di TransExpo in Italia (finanziamento Italia-USA 2011-12).
- Prosecuzione dell'attività di documentazione relativa agli studi su esposizione a campi elettromagnetici (CEM) e tumori e sintesi delle evidenze epidemiologiche.
- Collaborazione all'aggiornamento del sito web "Salute e campi elettromagnetici".
- Approfondimento delle strategie di comunicazione delle conoscenze scientifiche.
- Pianificazione di un'indagine di misura dei CEM a radiofrequenza a distanza crescente dal centro di radiotrasmissioni di Santa Maria di Galeria, mediante esposimetri in grado di registrare contemporaneamente segnali radio, TV, GSM (*Global System Mobile* o Sistema globale di comunicazione mobile), UMTS (*Universal Mobile Telecommunications System*) e LTE (*Long Term Evolution*) finalizzata a validare l'indicatore "distanza" da sorgenti fisse come *proxy* di esposizione ad uso epidemiologico e relativa ricerca di finanziamenti.
- Verifica della fattibilità di un'analisi dei trend temporali di incidenza dei gliomi in Italia (la fattibilità dipende dalle dimensioni della popolazione servita da registri tumori con serie storiche di dati).
- Verifica della fattibilità di uno studio dei trend temporali d'incidenza del morbo di Parkinson e della malattia di Alzheimer in Italia (la fattibilità dipende dalla possibilità di ottenere stime affidabili dei tassi dai registri delle prescrizioni farmaceutiche o da altre basi di dati).
- Valutazione di fattibilità di un'indagine sulla percezione del rischio da campi elettromagnetici e dei suoi determinanti psicologici e sociali.

### **Risultati attesi nel triennio**

Pubblicazione di rassegne e meta-analisi; attività di formazione e divulgazione.

Eventuale produzione di dati utili a valutare se l'andamento osservato nei tassi d'incidenza dei gliomi (specifici per classi d'età) sia compatibile con gli incrementi e decrementi di rischio osservati negli studi epidemiologici sinora condotti su uso del cellulare e rischio di tumori cerebrali maligni, ipotizzando diverse durate del periodo d'induzione-latenza.

Verifica della possibilità di realizzare in Italia studi su altri temi (4-8) considerati prioritari dalla Agenda WHO della Ricerca sui Campi a Radiofrequenza 2010 (<http://www.who.int/peh-emf/research/agenda/en/index.html>).

### **Trasferibilità dei risultati**

Le ricerche svolte nel triennio alimenteranno le conoscenze su un argomento attuale, rilevante e di grande impatto sociale. Le esperienze sviluppate, funzionali alla missione del CNESPS come centro di ricerca epidemiologica applicata ai problemi di sanità pubblica, potranno tradursi in attività di consulenza scientifica agli organi di governo deputati alla valutazione e gestione dei rischi da CEM. Si noti tuttavia che, in mancanza di un supporto

istituzionale adeguato, sarà difficile garantire la partecipazione dell'ISS ad altri studi internazionali, quali Interphone e TransExpo, che ci hanno reso parte della comunità scientifica di esperti del settore. Si potranno pubblicare e presentare sintesi delle evidenze scientifiche esaustive e ben documentate, ma si tratterà di competenze legate alla persona e, pertanto, estremamente vulnerabili alle pressioni sociali. Il problema ineludibile è che questa fragilità si estenderà inevitabilmente all'ISS.

### **Confronto tra Italia e Stati Uniti dei profili diagnostico-terapeutici relativi ai pazienti con tumore del colon e del retto attraverso l'utilizzo combinato dei dati dei registri e di dati amministrativi**

Il progetto è finalizzato al confronto dei percorsi terapeutici ospedalieri per tumori al colon-retto nel primo anno dalla diagnosi per pazienti di età superiore ai 66 anni in Italia e USA, nel periodo 2000-2001. L'interesse al confronto dei percorsi terapeutici tra Paesi che hanno simili sistemi di registrazione ma differenti sistemi sanitari è emersa nel corso del workshop internazionale "Combining Epidemiology and Economics for Measurement of Cancer Costs" promosso da: *National Cancer Institute* (USA), ISS, CNR e Università di Roma Tor Vergata, svolto a Frascati nel 2010.

Sono stati utilizzati dati provenienti da SEER-Medicare per gli USA e da Registri Tumori di Veneto e Toscana e SDO per l'Italia. Sono state individuate due coorti con caratteristiche comuni (primo tumore, sopravvivenza >1 mese, non DCO, certificato di morte o *Death Certificate Only*), sono stati armonizzati i codici di diagnosi, di intervento e procedura, sono state estratte informazioni relative alla stadiazione del tumore, è stato effettuato il linkage tra i dati del registro e quelli di ricovero ospedaliero. Si sono confrontate caratteristiche demografiche (età, sesso), cliniche (sede ICDO, stadio, comorbidità), terapeutiche (ricoveri, interventi, trattamenti), sopravvivenza. Particolare attenzione è rivolta al confronto della tempestività di interventi chirurgici e di trattamenti adiuvanti e neo-adiuvanti.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Obiettivi del lavoro sono: i) investigare la fattibilità di un confronto dei percorsi terapeutici dei pazienti oncologici, in particolare nel primo anno dalla diagnosi, tra USA e Italia; ii) evidenziare la possibilità di integrazione delle informazioni cliniche e diagnostiche provenienti dai registri di popolazione con dati di natura amministrativa che permettono di caratterizzare l'accesso e l'utilizzo del servizio sanitario da parte dei pazienti; iii) valutare se e in quale misura la differenza tra i sistemi sanitari nei due Paesi, USA e Italia, influisca nella determinazione del percorso terapeutico dei pazienti.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La revisione sistematica dei codici di intervento e procedura relativi ai pazienti con tumore del colon e del retto nel primo anno dalla diagnosi ha permesso di confrontare i percorsi diagnostico terapeutici nelle aree dei registri italiani e nelle aree dei registri SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Result*). L'esperienza fatta e la documentazione prodotta (lista dei codici di intervento/procedura appropriati e confrontabili) possono rappresentare il punto di partenza di altre applicazioni, a sedi tumorali diverse e/o relativamente ad altri Paesi. I confronti internazionali dei profili di cura possono contribuire utilmente sia all'individuazione delle pratiche di intervento più appropriate, sia all'organizzazione più efficiente del sistema sanitario.

## **Componente genetica e ambientale dei disturbi respiratori e allergici**

Questa linea di ricerca si propone di studiare coorti di gemelli monozigoti (MZ) e dizigoti (DZ), arruolati nel Registro Nazionale Gemelli, con l'obiettivo principale di valutare il contributo dei fattori genetici (cioè dell'ereditabilità) e dei fattori ambientali (sia di tipo familiare che individuo-specifici) nell'eziologia dei disturbi respiratori e allergici, con particolare riferimento all'asma e alla rinite allergica, e ai relativi fenotipi intermedi. Obiettivo secondario è quello di costituire una banca biologica di campioni di saliva dei gemelli presso i locali, già adibiti a questa funzione, del CNESPS dell'ISS; questi campioni costituiranno una preziosa risorsa per futuri studi: i) su biomarcatori di esposizione ambientale, ii) di associazione genica oppure iii) di epigenetica in coppie di gemelli MZ discordanti per patologia.

La linea di ricerca può beneficiare della recente esperienza maturata nell'ambito del Programma Strategico Nazionale "Ambiente e Salute" (2008-2010), afferente alla ricerca finalizzata 2006 del Ministero della Salute. Per gli scopi del Programma Strategico, sono state reclutate più di 1.500 coppie di gemelli MZ e DZ residenti nelle aree di Milano, Roma e Palermo, che hanno fornito dati sulla presenza di patologie respiratorie e allergiche, e stanno attualmente inviando campioni di saliva per la bio-banca.

### **Risultati attesi nel triennio**

In riferimento a diverse patologie respiratorie e allergiche, e in particolare all'asma e alla rinite, ci attendiamo di raggiungere i seguenti obiettivi:

- stimare la prevalenza cumulativa nella popolazione di gemelli e confrontare questi dati con quelli della popolazione generale;
- confermare i classici fattori di rischio ambientali, documentati in letteratura;
- stimare la concordanza nelle coppie di gemelli MZ e DZ;
- quantificare il contributo dei fattori genetici (cioè dell'ereditabilità) e ambientali (sia di tipo familiare che individuo-specifici) nella suscettibilità a queste patologie;
- chiarire l'origine della comorbidità tra diverse patologie, specialmente tra asma e rinite allergica, ovvero stabilire se e in quale misura la frequente concomitanza di alcune di queste patologie nell'individuo sia il risultato dell'influenza di fattori genetici o ambientali condivisi (correlazione genetica e ambientale tra le patologie);
- testare eventuali differenze per età, sesso e area geografica nei parametri stimati ai punti precedenti;
- implementare una banca di campioni di saliva per studi futuri finalizzati all'identificazione: i) di biomarcatori di esposizione ambientale; ii) di varianti genetiche associate ai disturbi in studio; iii) di fattori epigenetici implicati nell'espressione di tali disturbi.

### **Trasferibilità dei risultati**

Le patologie respiratorie e allergiche come l'asma e la rinite sono condizioni ad elevato impatto sociale per l'alta prevalenza, le ricadute sulla qualità della vita e sul rendimento scolastico e lavorativo, e i costi economici legati all'assistenza.

Lo studio della componente genetica e ambientale di queste patologie e dei loro endofenotipi può avere importanti implicazioni. I risultati ottenuti potranno favorire sviluppi nella comprensione del meccanismo patogenetico alla base delle allergie respiratorie, indirizzare indagini successive volte a chiarire l'interazione tra i classici fattori di rischio ambientali e specifici geni implicati, fornire elementi utili ad identificare gruppi di popolazione a maggiore rischio da assumere come target per interventi di tipo preventivo o terapeutico.

### **Consumo di farmaci in gravidanza e appropriatezza prescrittiva nella Regione Lazio**

L'eccesso di medicalizzazione dell'assistenza all'intero percorso nascita in Italia e la indisponibilità di dati recenti rendono urgente la realizzazione di un nuovo studio che permetta di rilevare il consumo di farmaci e di valutarne l'appropriatezza prescrittiva.

Gli obiettivi del progetto consistono nel stimare la prevalenza d'uso di farmaci in gravidanza e valutare l'appropriatezza delle prescrizioni nella Regione Lazio.

La rilevazione delle prescrizioni e del consumo di farmaci in gravidanza verrà effettuata attraverso uno studio di popolazione generale su donne che hanno partorito attraverso un *record linkage* tra i dati di prescrizione farmaceutica, i certificati di assistenza al parto (Cedap) e le SDO e attraverso un'indagine Conoscenza Attitudine e Pratica (CAP) rivolta a campioni di donne che partoriscono in alcuni centri nascita di Roma.

#### **Risultati attesi nel triennio**

La stima della prevalenza d'uso di farmaci in gravidanza nella Regione Lazio per trimestre di gravidanza e per posizione socioeconomica delle donne e la valutazione dell'appropriatezza clinica delle prescrizioni farmaceutiche.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La validazione degli strumenti adottati (*record-linkage* e indagine campionaria) per la rilevazione del consumo di farmaci e la validazione dell'appropriatezza prescrittiva permetterà di replicare lo studio nelle altre Regioni italiane.

### **Valutazione della situazione ambientale *ante operam* nell'area circostante l'impianto di incenerimento di Ca' del Bue nel Comune di Verona e definizione di procedure di sorveglianza ambientale da porre in atto; valutazione di un programma di sorveglianza ambientale da porre in atto *ante e post operam* con particolare riguardo ai parametri che possono influire sulla salute umana**

Nell'ambito della convenzione si procederà alla definizione di un modello per la valutazione *ante e post operam* di un set di indicatori di salute che si prestino ad essere utilizzati come indicatori di possibili effetti nocivi associabili alle emissioni dell'impianto di incenerimento. Gli eventi riproduttivi legati alla gravidanza quali basso peso alla nascita, nati pretermine, piccoli per epoca gestazionale, rapporto dei sessi, parti gemellari, hanno il vantaggio di essere abbastanza frequenti e di avere tempi di latenza brevi in relazione a potenziali esposizioni e possono quindi essere utilizzati a tale scopo.

Si dovrà operare un *linkage* tra tutti i nuovi nati residenti registrati nelle anagrafi dei comuni interessati e i CeDAP. La residenza della madre sarà quindi georeferenziata. Per la definizione dello stato di esposizione si farà riferimento a quanto risulterà dall'applicazione di modelli matematici di dispersione degli inquinanti. Verrà effettuata una valutazione degli indicatori prima dell'entrata in esercizio dell'inceneritore finalizzata alla messa a punto di un modello che ne consenta la valutazione nel tempo in funzione dell'esposizione materna. Si utilizzeranno modelli di regressione logistica per le variabili dicotomiche e modelli di regressione lineare multipla per le variabili quantitative. Si terrà conto di potenziali confondenti legate alle caratteristiche materne.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- definizione dell'algoritmo per il *linkage* dei dati da utilizzare per la sorveglianza;
- stima dell'incidenza di nati con basso peso, di nati pretermine, di piccoli per epoca gestazionale (*Small for Gestational Age*, SGA), di parti gemellari e misura del

rapporto maschi/femmine alla nascita prima dell'inizio attività dell'inceneritore per area di esposizione come descritta dai modelli;

- identificazione e predisposizione di un modello per il monitoraggio degli effetti sulla salute riproduttiva basato sulla regressione logistica e sulla regressione lineare.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il modello sarà uno strumento a disposizione delle competenti autorità sanitarie locali per la valutazione di eventuali effetti avversi attribuibili all'impianto di incenerimento dei rifiuti solidi urbani.

### **Cooperazione internazionale nel sistema di vigilanza e allerta verso malattie infettive e infezioni emergenti o riemergenti sporadiche o epidemiche**

Una delle missioni principali del CCM è la vigilanza e il coordinamento della risposta verso emergenze per la salute. Le infezioni e le malattie infettive nuove o riemergenti, purtroppo, sono quotidianamente presenti nel nostro mondo: ogni anno numerose specie microbiche appaiono nella comunità umana spesso con dannose conseguenze dirette, ma sempre con gravi allarmi per la pubblica salute. La globalizzazione dei movimenti di merci e persone ha distrutto barriere naturali etniche e geografiche che finora avevano contenuto il rischio di rapide trasmissioni globali di eventi epidemici.

Il Ministero/CCM si avvale della collaborazione del CNESPS dell'ISS, in considerazione della riconosciuta *expertise* sia nella gestione di eventi emergenziali (indagini di campo su focolai epidemici, raccomandazioni, informazioni al pubblico, ecc.), così come nella gestione dei sistemi di sorveglianza in network con i sistemi di allerta internazionali (EWGLI, ENTERNET, EWRS, ecc.).

In questo settore il CNESPS agisce da facilitatore del miglioramento della cooperazione internazionale in ambito europeo anche promuovendo la formazione e la collaborazione di operatori italiani in ambito internazionale su temi prioritari per il contrasto alle patologie infettive.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Conoscenza delle procedure operative della sala situazione dell'ECDC.
- Conoscenza di sistemi di risposta a livello regionale. Verrà effettuata una indagine conoscitiva e effettuata una disamina dei punti rilevanti in comune e di quelli differenti.
- Formazione di operatori dedicati alla sorveglianza e alla risposta alle emergenze in un contesto internazionale, con previsione di periodi di training presso l'ECDC o altri organismi di sorveglianza esteri o internazionali. Verranno organizzate visite internazionali e periodi di addestramento all'estero per operatori dell'SSN. In particolare per la formazione sarà facilitata la partecipazione ai moduli di apprendimento organizzati nell'ambito del Programma Europeo di Epidemiologia Applicata EPIET.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Proposta di procedure operative standard per la sorveglianza e la risposta rapida in un contesto internazionale. Verrà proposta al Ministero della Salute e al Coordinamento Interregionale della Prevenzione.

## **Definizione e diffusione di un programma ad elevato standard metodologico e sviluppo di strumenti omogenei per la rilevazione della qualità percepita nei Servizi di Salute Mentale**

Partendo dal *National Health Service (NHS) Mental Health Questionnaire 2008* e dall'*NHS Mental Health Inpatient Questionnaire 2009* del sistema sanitario nazionale inglese, sono stati sviluppati due questionari di valutazione, destinati a utenti di Centri di Salute Mentale (CSM) e Servizi Psichiatrici di Diagnosi e Cura (SPDC) per la valutazione delle diverse dimensioni dell'assistenza. La versione definitiva dei questionari comprende 40 (CSM) e 35 (SPDC) domande, con un tempo di compilazione inferiore a 30 minuti.

Gli strumenti sono stati poi applicati nella pratica dei servizi di quattro Dipartimenti di Salute Mentale del nord, centro e sud Italia, somministrandoli con due distinte modalità di rilevazione: una postale (analogamente al sistema sanitario inglese) e una diretta (*vis à vis*). Nella rilevazione postale il questionario è stato inviato a 2.359 pazienti; i pazienti che hanno rispedito il questionario compilato sono stati 1.195 (51%). Nella rilevazione diretta sono stati compilati 1.485 questionari con un tasso di rispondenza di oltre il 90%. Le risposte fornite dai pazienti nella rilevazione postale (il cui tasso è risultato essere superiore a quello mediamente ottenuto nel Regno Unito) hanno mostrato perlopiù una maggiore variabilità rispetto alla rilevazione diretta in cui la frequenza più elevata registrata corrispondeva a giudizi di soddisfazione intermedia (né francamente positivi né francamente negativi).

### **Risultati attesi nel triennio**

In particolare, il programma può fornire alle istituzioni dell'SSN:

- tecniche e procedure per l'implementazione di un programma prototipale esportabile in altri servizi dell'SSN, utile a valutare la capacità dei servizi di rispondere ai bisogni degli utenti;
- strumenti per la definizione e rilevazione della dimensione "soddisfazione degli utenti" e delle sue componenti;
- criteri per l'uso di data-base/sistemi informativi per la registrazione/analisi della soddisfazione degli utenti;
- criteri per il controllo di qualità e l'interpretazione dei risultati delle rilevazioni;
- criteri per la diffusione dei risultati a tutti gli stakeholder dei servizi;
- criteri e procedure per la progettazione di iniziative di miglioramento interno ed esterno collegate ai risultati;
- raccomandazioni su aspetti organizzativo/manageriali relativi all'inclusione di rilevazioni sistematiche della qualità percepita negli obiettivi dei dipartimenti di salute mentale/aziende sanitarie;
- criteri e procedure per la messa a punto di schede tecniche e/o guide per i servizi che contengano buoni e semplici esempi di pratica clinica e organizzativa, e schemi di piani d'intervento migliorativo con scadenario delle azioni.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati del programma sono trasferibili ad altri servizi destinati ad altre tipologie di assistenza. Sono inoltre trasferibili, a livello nazionale, per le funzioni di valutazione comparativa tra SSR e ASL e, a livello regionale e locale, per le funzioni di accreditamento e valutazione dei risultati.

## **Efficacia a lungo termine della vaccinazione anti-epatite B**

Conoscere la durata dell'immunità indotta da vaccino anti epatite B è cruciale per potere stabilire la necessità di somministrare dosi *booster* per mantenere la protezione nel tempo.

La persistenza dell'immunità umorale e cellulare a distanza di oltre 18 anni dalla vaccinazione non è nota nei Paesi a bassa endemia.

Nel 2003 fu arruolata una coorte di bambini nati nel 1992 e vaccinati contro l'epatite B per valutare l'immunogenicità del vaccino a dieci anni di distanza dalla somministrazione. Lo studio concludeva che a distanza di dieci anni dal ciclo vaccinale primario, i bambini esaminati mantenevano una memoria immunologica e pertanto non erano necessarie dosi *booster*. L'obiettivo del progetto è di indagare la persistenza a lungo termine della immunità umorale e cellulo-mediata indotta dalla vaccinazione anti-epatite B. Una coorte costituita da 550 giovani adulti vaccinati da neonati oltre 18 anni fa, verrà valutata per la persistenza della memoria immunologica *in vivo* (risposta anamnesticca alla somministrazione di una dose *booster*) e *in vitro* (risposta cellulo-mediata), la frequenza di *breakthroughs* causati da infezioni HBV occulte o da mutanti virali (*escape mutants*) Studio è uno studio di coorte multicentrico retrospettivo-prospettico condotto presso 11 ASL dislocate sul territorio nazionale.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati forniranno informazioni essenziali sulla persistenza a lungo termine dell'immunità umorale e cellulo-mediata vaccino-indotta. Il nostro Paese dispone di coorti di soggetti vaccinati da più lungo tempo rispetto agli altri Paesi europei e agli USA. Da qui l'interesse non solo nazionale ma anche internazionale verso i dati di questo studio che si propone di esaminare una coorte di soggetti vaccinati da neonati 18 anni fa. L'importanza dello studio deriva anche dal fatto che le conoscenze sulla persistenza dell'immunità vaccino-indotta dopo 10-15 anni dalla vaccinazione sono estremamente scarse o assenti nei Paesi a bassa endemia, mentre alquanto controverse sono quelle relative ai Paesi ad elevata endemia. Recenti studi condotti in Asia suggeriscono che una notevole quota di soggetti vaccinati perdono la memoria immunologica a distanza di 15-18 anni dalla vaccinazione, sollevando il problema sulla necessità o meno di somministrare dosi booster di vaccino per mantenere la protezione nel tempo. Pertanto i risultati che verranno acquisiti con il presente studio potranno fornire importanti conoscenze per la comunità scientifica nazionale e internazionale con rilevante impatto in termini di sanità pubblica. In aggiunta, i risultati di questo studio forniranno utili informazioni riguardo la prevalenza di *breakthrough* da HBV in soggetti vaccinati, causati da mutanti virali (*escape mutants*) o da infezioni occulte.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati sulla persistenza a lungo termine della memoria immunologica indotta dalla vaccinazione anti-epatite B, potranno fornire rilevanti indicazioni ai responsabili delle politiche sanitarie sulla necessità o meno di raccomandare la somministrazione di dosi booster di vaccino al fine di mantenere la protezione nel corso della vita.

### **Elaborazione di un modello per l'istituzione del Registro Nazionale degli Interventi Artroprotesi (RIAP)**

In Italia si effettuano ogni anno circa 160.000 ricoveri per sostituzione protesica articolare.

Il numero di impianti che circolano in Italia è notevole: il Repertorio dei dispositivi medici annovera per le solo protesi di anca 64 fabbricanti per un totale di 3.700 record pari a circa 30.000 differenti codici prodotto.

Nel 2005 tutte le regioni italiane hanno riconosciuto la necessità di istituire il Registro nazionale degli interventi di protesi di anca, le Società scientifiche del settore hanno fornito la loro disponibilità a divulgare e sostenere l'iniziativa nella comunità degli ortopedici, il Ministero della Salute, così come le Associazioni dei fabbricanti e dei pazienti, hanno

convenuto sulla validità del Registro come strumento per il controllo dei dispositivi impiantati. Il Registro nazionale ha il duplice obiettivo di monitorare l'efficacia dei dispositivi impiantati e rintracciare rapidamente i pazienti in caso di segnalazione di evento avverso. Per fare ciò è indispensabile seguire il paziente nel tempo e nello spazio. *Endpoint* del Registro è la revisione dell'impianto.

Lo studio, che trarrà risorse da più linee di ricerca, si propone di organizzare il Registro nazionale come federazione di Registri regionali con il coordinamento dell'ISS e il coinvolgimento di CUD, società scientifiche e aziende, e di mettere a punto una metodologia per una valutazione sistematica dell'esito dell'intervento a breve e medio termine basata su misure della qualità della vita.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Sulla base del protocollo di raccolta dati basato sull'uso di dati correnti (SDO) integrate da alcune informazioni di tipo clinico e relative al dispositivo per implementare procedure di *risk adjustment* già definito per l'anca e per il ginocchio, implementazione della scheda elaborata per l'anca e per il ginocchio e sua integrazione nei flussi informativi correnti introducendo provvedimenti che istituiscano il registro a livello regionale e nazionale e sanciscano l'obbligatorietà della registrazione.

Elaborazione di un protocollo di valutazione dell'esito a breve e medio termine basata su misure della qualità della vita mediante utilizzo del questionario HOOS (*Hip disability and Osteoarthritis Outcome Score*) di cui è in corso la validazione in lingua italiana e sua implementazione in contesti regionali. Studio di validazione del questionario KOOS (*Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score*).

Consolidamento della rete esistente e estensione della raccolta dati alle Regioni non ancora coinvolte.

Collaborazione con il Ministero e i fabbricanti per le attività inerenti il repertorio dei DM.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La trasferibilità all'interno dell'SSN è immediata. Alla fine dello studio ciascuna regione disporrà di un registro regionale basato sull'utilizzo di uno strumento di raccolta dati condiviso e abbinabile ai flussi informativi correnti. I dati presenti in ciascun database regionale confluiranno, per quanto riguarda le variabili comuni, in una banca dati nazionale che costituirà il registro nazionale. Un protocollo validato per la valutazione dell'esito a breve termine basata non solo sulla revisione dell'impianto ma anche sulla somministrazione al paziente di questionari validati sulla misura della qualità della vita sarà disponibile per le regioni interessate. I risultati ottenuti potranno essere trasferiti alla registrazione di altri interventi di sostituzione protesica (ginocchio, spalla, altre articolazioni, altre sostituzioni protesiche (es. protesi mammarie, valvole cardiache).

### **Euromed – sorveglianza epidemiologica per il controllo delle malattie neoplastiche nei Paesi del Mediterraneo: dalla registrazione del cancro ai modelli statistici**

Il presente progetto si struttura in due componenti: un WP condurrà l'attività rivolta a potenziare la registrazione del cancro, con particolare attenzione alla qualità della completezza e accuratezza dei dati osservazionali raccolti nei paesi che si affacciano sul Mediterraneo. Un secondo WP sarà rivolto all'uso dei modelli statistici come importante strumento per validare e potenziare l'utilizzo dei dati raccolti.

Le modificazioni a livello globale dei fattori di rischio legati agli stili di vita, ai fattori ambientali e il costante incremento dell'attesa di vita, porteranno infatti ad una drammatica crescita della patologia oncologica nei paesi in via di sviluppo. I Paesi nord-africani e

mediorientali del Mediterraneo non fanno eccezione a questo quadro, che deve essere pertanto adeguatamente contrastato.

L'impatto a livello di popolazione dell'insieme delle attività rivolte al controllo del cancro (prevenzione, diagnosi precoce e cura) deve essere quindi appropriatamente sorvegliato attraverso i maggiori indicatori di frequenza (incidenza, prevalenza e mortalità) e outcome (sopravvivenza) che devono essere disponibili a livello nazionale.

I principali aspetti critici dei sistemi informativi sanitari in oncologia sono: la scarsa diffusione di flussi informativi automatizzati, la mancanza di una rilevazione di mortalità completa e affidabile e la difficoltà di conduzione di registri tumori, poco diffusi in tutti i paesi a sud del Mediterraneo.

### **Risultati attesi nel triennio**

Risultato generale atteso:

Contribuire a favorire il controllo della diffusione delle malattie neoplastiche nei Paesi a risorse limitate che si affacciano nel bacino del Mediterraneo.

Risultati specifici attesi:

- potenziare la qualità (completezza e accuratezza) dei dati dei registri tumori operanti nei Paesi Mediterranei e sui flussi informativi utilizzati;
- contribuire a formare il personale operante nei registri tumori di questi Paesi in termini di miglioramento delle procedure di raccolta dei dati, di standardizzazione delle codifiche e di tecniche archiviazione elettronica dei dati raccolti secondo gli standard della *International Association of Cancer Registries* (IACR);
- formare personale all'uso di software statistici standard destinati alle analisi descrittive tradizionali (es. tassi di incidenza standardizzati, calcolo delle probabilità di sopravvivenza) e ad analisi descrittive specifiche (es. andamento dei tumori infantili, impatto del cancro della mammella nelle giovani donne);
- formare personale all'uso di modelli statistici per la stima di indicatori epidemiologici di base (incidenza, prevalenza, sopravvivenza e mortalità) in situazioni di parziale disponibilità o completezza di dati osservazionali e applicazioni pilota dei modelli ad analisi specifiche (es. tumore del polmone in relazione alla diffusione dell'abitudine al fumo).

### **Trasferibilità dei risultati**

La creazione di una rete di registri tumori nei Paesi a risorse limitate che si affacciano nel bacino del Mediterraneo (attualmente hanno aderito i registri tumori di Algeria, Egitto, Turchia, Marocco, Territori Palestinesi e Malta) contribuirà a valutare l'uso di modelli statistici per la stima di incidenza, prevalenza, sopravvivenza e mortalità in epidemiologia descrittiva, e identificare le metodologie di maggiore potenziale utilità nelle specifiche realtà locali. Saranno quindi individuate, sulla base della rilevanza e della fattibilità, le aree di studio per l'applicazione di tali metodi nei paesi dell'area nord-africana e mediorientale.

Le conoscenze acquisite potranno essere applicate per proseguire e approfondire l'analisi dei tumori infantili o di specifici tumori (es. mammella nelle donne sotto i 50 anni).

I risultati del progetto verranno diffusi tramite i siti web degli enti partecipanti e tramite workshop.

## **European Hospital Benchmarking by Outcomes in Acute Coronary Syndrome Procedures**

Obiettivo generale del progetto EURHOBOP è di continuare l'attività avviata nel corso della fase pilota del progetto europeo EUPHORIC che è stato coordinato dall'ISS, validando un set di funzioni matematiche predittive definite in forma preliminare in EUPHORIC

(www.euphoric-project.eu). Tali funzioni considerano i determinanti della mortalità intraospedaliera per valutare la qualità delle cure nel trattamento di pazienti affetti da infarto o angina instabile e le seguenti procedure: angiografia coronarica, trombolisi, interventi percutanei. Gli indicatori saranno aggiustati tenendo in considerazione le caratteristiche dei pazienti, degli ospedali e dei paesi e permetteranno agli ospedali di confrontarsi con standard di riferimento.

Verranno arruolati ospedali in sette Paesi europei. In stretta connessione con DG SANCO verranno coinvolte associazioni di ospedali per testare le funzioni sviluppate e studiate le strategie di disseminazione dei risultati

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi consistono in un set di funzioni matematiche idonee per effettuare il benchmark di ospedali europei per determinare il rischio di mortalità intraospedaliera e valutare la qualità delle cure erogate nel trattamento di patologie cardiovascolari.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Una volta validate, le funzioni saranno disponibili sul sito web del progetto per tutte le strutture che vi vogliono accedere.

### **European Partnership for Action Against Cancer**

Molte attività sono in corso nei Paesi europei (registri tumori, progetti nazionali e internazionali) atte a fornire un'ampia e dettagliata informazione utile per le attività di controllo della patologia oncologica. La maggior parte di esse sono però scarsamente coordinate, presentano metodologie e finalità diverse, non soddisfano l'esigenza di consistenza e confrontabilità dei risultati prodotti. Il WP9 della *Joint Action EPAAC* ha come scopo coordinare le varie attività oggi esistenti nell'ambito dell'epidemiologia descrittiva dei tumori e di elaborare proposte per lo sviluppo di un sistema informativo sul cancro nell'ambito del prossimo programma europeo di sanità pubblica.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Revisione delle informazioni oggi disponibili per la stima degli indicatori ECHI (*European Community Health Indicators*) ed EUROCHIP (*European Cancer Health Indicator Project*) sul cancro. Unificare su un'unica piattaforma web i dati di incidenza, sopravvivenza, mortalità e prevalenza prodotti da diversi progetti europei. Studio pilota per la stima di indicatori relativi ai costi della patologia e dei bisogni dei pazienti sopravvissuti a lungo termine. Costituzione di una network europea sulla metodologia statistica in studi di popolazione.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Acquisizione e diffusione di conoscenze epidemiologiche rilevanti ai fini di sanità pubblica.

### **Fasting blood glucose and 10-year cardiovascular risk of the Italian population. Specimens of the CNESPS biobank**

Nel 2004, utilizzando la funzione di rischio cardiovascolare con le coorti del Progetto CUORE – Epidemiologia e prevenzione delle malattie cardiovascolari – sono state realizzate le carte e il punteggio individuale per la valutazione del rischio cardiovascolare attualmente adottate nella pratica clinica.

Questi strumenti utilizzano fattori di rischio categorici (sesso, abitudine al fumo, terapia antipertensiva, diabete) o continui (pressione arteriosa sistolica, colesterolemia totale e HDL, età) per predire gli eventi cardiovascolari. Obiettivo di questo progetto è quello di stimare se

introducendo nella funzione di rischio la glicemia a digiuno nelle due categorie, diabetici e non diabetici, migliora la predizione del rischio cardiovascolare a dieci anni nella popolazione italiana adulta. A questo scopo viene misurata la glicemia a digiuno con metodo standardizzato sulle coorti longitudinali del progetto CUORE utilizzando i campioni biologici di siero conservati nella banca biologica del CNESPS. Realizzata la nuova funzione di rischio per la popolazione italiana, essa verrà validata su coorti di popolazione statunitensi che utilizzano gli stessi fattori di rischio per la predizione.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Gli studi longitudinali del progetto CUORE hanno la linea base fra il 1983 e il 2002; è disponibile il follow-up fino al dicembre 2004 della mortalità e morbosità per malattie cardio e cerebrovascolari (infarto del miocardio, ictus, interventi di rivascolarizzazione e morte improvvisa, validati attraverso i criteri diagnostici MONICA). Campioni biologici raccolti alla linea base sono disponibili nella banca biologica del CNESPS e vengono analizzati all'Università Cattolica di Campobasso, che è sotto il controllo di qualità dell'*US Centre for Disease Control and Prevention* Atlanta. Diecimila campioni di siero vengono analizzati per la determinazione della glicemia a digiuno. L'analisi statistica prevede la realizzazione di funzioni di rischio specifiche per genere e per fasce di età (35-54 e 55-74), che utilizzeranno, in aggiunta ai classici fattori di rischio (età, pressione sistolica, abitudine al fumo, colesterolemia totale e HDL, trattamento antipertensivo) anche la glicemia. L'equazione ottenuta sarà valutata per accuratezza e generalizzabilità in una coorte di popolazione statunitense.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La funzione di rischio cardiovascolare, che verrà realizzata attraverso l'introduzione di un nuovo fattore di rischio in aggiunta ai classici fattori, validata attraverso studi di popolazione statunitensi, potrà migliorare la predizione a dieci anni delle malattie cardio e cerebrovascolari nella popolazione italiana e permetterà l'aggiornamento di nuove carte e punteggio individuale applicabili nella pratica clinica. Questi strumenti sono essenziali per la pianificazione di azioni di prevenzione a livello individuale, per lo sviluppo di strategie preventive contro il diabete e le sue complicanze, per ridurre il rischio cardiovascolare a livello di popolazione e rimuovere le disuguaglianze sanitarie regionali.

### **Fattori ambientali e genetici nei disordini dello spettro autistico**

All'interno del progetto "An epidemiological approach to autism spectrum disorders", parte del programma strategico sulla salute mentale nell'infanzia e nell'adolescenza promosso dal Ministero della Salute.

Partecipano circa 1.300 gemelli di età 18-65 anni afferenti al Registro Nazionale Gemelli. Per valutare i tratti dello spettro autistico è stato utilizzato l'*Autism Spectrum Quotient* (AQ) proposto da Baron-Cohen, che consente di ottenere i punteggi individuali su cinque diverse dimensioni (abilità sociali, cambiamenti di attenzione, attenzione ai dettagli, comunicazione, immaginazione), oltre a un punteggio totale. I tratti della personalità sono stati misurati tramite il *Temperament and Character Inventory* (TCI-125) messo a punto da Cloninger, che comprende quattro dimensioni di temperamento (ricerca della novità, evitamento del danno, dipendenza dalla ricompensa, persistenza) e tre dimensioni di carattere (es. capacità di auto-direzionarsi, cooperatività, auto-trascendenza).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Verrà stimato il contributo dei fattori ambientali e genetici per gli endofenotipi dell'autismo. Verrà stimata l'associazione a livello individuale tra endofenotipi afferenti a diverse aree di alterazione comportamentale e stabilito se l'associazione individuale è il

risultato di fattori genetici o ambientali comuni alle diverse aree (correlazione genetica e ambientale tra endofenotipi nelle diverse aree).

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questo è il primo studio gemellare nella popolazione italiana finalizzato a stimare la componente genetica e ambientale delle dimensioni dello spettro autistico e della personalità, e a investigare la loro correlazione. I risultati preliminari dello studio mostrano moderati effetti genetici e un forte contributo delle esposizioni ambientali individuali sia per le dimensioni dello spettro autistico che per quelle di temperamento e carattere. Inoltre, emerge una moderata sovrapposizione tra spettro autistico e personalità. Se consolidati, questi risultati incoraggerebbero interventi di promozione della salute mentale basati su fattori modificabili, e giustificherebbero la conduzione di studi specificamente rivolti ai tratti di tipo autistico, che sono solo parzialmente riconducibili alle grandi dimensioni della personalità.

### **Fattori di rischio, malattie e diseguaglianze sociali. The EURO-GBD-SE Project**

Nei Paesi economicamente sviluppati le malattie cardiovascolari si presentano più comunemente nelle classi sociali più povere; la situazione appare contraddittoria nelle nazioni in via di sviluppo, mentre in quelle a basso sviluppo economico è evidente un andamento opposto. Nei Paesi economicamente sviluppati l'andamento non è uniforme: nel Nord Europa la differenza fra classi sociali identificate sulla base della scolarità appare più chiara rispetto al Sud Europa, mentre le differenze di andamento tra i due generi appaiono più evidenti nei Paesi dell'area mediterranea.

Il Progetto di collaborazione con altri Paesi europei ha l'obiettivo di valutare la potenzialità della riduzione delle diseguaglianze rispetto alle malattie e ai fattori di rischio; il programma prevede la condivisione di dati di popolazione provenienti da diversi paesi europei che abbiano condotto indagini di popolazione collezionando informazioni sullo stato di salute e misurato fattori di rischio, ed effettuato la raccolta di informazioni di follow up di mortalità totale e specifica per causa.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Stima delle dimensioni in ambito sanitario delle diseguaglianze socio-economiche tra Paesi europei.
- Stima del contributo dei fattori di rischio nell'occorrenza di queste disuguaglianze.
- Valutazione di quanto in ambito sanitario le disuguaglianze socio-economiche tra Paesi europei possano realisticamente essere ridotte attraverso interventi e strategie sui determinanti delle condizioni socio-economiche e sui fattori di rischio.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Collaborazione con il progetto europeo che mira a costruire un database con i dati di diversi paesi europei attraverso il quale valutare la potenzialità della riduzione delle diseguaglianze rispetto alle malattie e ai fattori di rischio

### **Formazione per l'investigazione epidemiologica rivolta agli Osservatori Epidemiologici Regionali e alle ASL**

Percorsi di formazione accademica e pratica in Epidemiologia applicata alla sanità pubblica vengono realizzati su richiesta delle Regioni. Un intervento simile (Master di II livello biennale) si sta completando in Sardegna per l'addestramento del personale dei Centri epidemiologici aziendali, mentre è in corso di preparazione un Master analogo nella Regione

Calabria. Di rinforzo all'attività formativa classica all'interno del progetto si mantiene la pubblicazione del bollettino epidemiologico nazionale, all'interno del quale si promuove la qualità e la pubblicazione delle esperienze nazionali nel campo dell'epidemiologia applicata.

#### **Risultati attesi nel triennio**

La formazione strutturata dal progetto ha come obiettivo di creare a livello regionale/aziendale la disponibilità di personale formato con competenze sui diversi aspetti dell'epidemiologia applicata. Al fine di estendere tale competenza ad altri operatori delle regioni e delle aziende il percorso formativo ha incluso anche un modulo sulla pianificazione e realizzazione della formazione degli adulti. A ciò si aggiunge la realizzazione delle formazioni a cascata che accompagnano mole delle attività di formazione, in particolare quelle sulla sorveglianza di popolazione, dove gli operatori regionali, formati dal progetto ai fini dell'attivazione della sorveglianza devono realizzare a cascata la formazione degli operatori delle aziende sanitarie.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La formazione strutturata dal progetto ha come obiettivo di creare a livello regionale/aziendale la disponibilità di personale formato con competenze sui diversi aspetti dell'epidemiologia applicata. Al fine di estendere tale competenza ad altri operatori delle regioni e delle aziende il percorso formativo ha incluso anche un modulo sulla pianificazione e realizzazione della formazione degli adulti. A ciò si aggiunge la realizzazione delle formazioni a cascata che accompagnano mole delle attività di formazione, in particolare quelle sulla sorveglianza di popolazione, dove gli operatori regionali, formati dal progetto ai fini dell'attivazione della sorveglianza devono realizzare a cascata la formazione degli operatori delle aziende sanitarie.

### **Genomica per la sanità pubblica: costituzione di una rete nazionale di banche genetiche di popolazione**

Questo progetto, presentato già nel 2009, è stato approvato nel 2011 e sarà operativo a partire dal 2012.

Obiettivo generale è quello di costituire un network di banche genetiche di popolazione presenti sul territorio nazionale. Obiettivo specifico è l'implementazione di un software applicativo comune per la gestione dei dati e dei campioni conservati in ciascuna delle biobanche afferenti alla rete.

All'interno del network verranno costituiti dei gruppi di lavoro dedicati alle varie aree (management, sicurezza, aspetti etico legali) che, previa ricognizione generale delle procedure standard esistenti all'interno delle banche da mettere in rete, individuino i punti di forza e le carenze, al fine di realizzare procedure standardizzate e condivise per:

- la gestione dei campioni (raccolta, catalogazione, trasporto, processamento, stoccaggio, tracciabilità, controllo di qualità, distribuzione);
- la gestione dei dati (raccolta, standardizzazione delle informazioni, set minimo per la condivisione);
- l'implementazione delle misure di sicurezza (di laboratorio e dei sistemi informatici) secondo la normativa vigente;
- il trattamento degli aspetti etico- legali (note e consensi informati, ricontatto dei donatori/pazienti; comunicazioni dei risultati di eventuali studi; ruolo dei comitati etici; diritti dei donatori, procedure di anonimizzazione);
- l'accessibilità dei campioni all'interno di progetti condivisi e/o attraverso la rete Italiana di biobanche.

### **Risultati attesi nel triennio**

Verrà individuata una piattaforma informatica tra quelle disponibili open source che meglio rispondano alle esigenze operative delle banche partecipanti al network. Il software applicativo si interfacerà con un sistema comunicativo di pagine web. Queste potranno trovare adeguata disponibilità nel portale del CNESPS, oppure verrà valutata la possibilità di costruire un sito specifico relativo al progetto in questione. Consultando le pagine web sarà possibile accedere ai dati in forma aggregata per quello che riguarda l'intero network, e ai dati individuali per le banche singole che ne gestiscono i database. Verranno revisionate le procedure che riguardano il trattamento degli aspetti etico-legali delle biobanche partecipanti al network. Verranno analizzati le note informative dei singoli studi afferenti al progetto e i relativi consensi, verificata la possibilità di ricontattare i donatori/pazienti, nonché valutate le procedure di anonimizzazione all'interno dei vari database, al fine di uniformare questi aspetti e renderli fruibili in funzione di progetti internazionali quali il BBMRI dell'UE. Verranno inoltre affrontati gli aspetti relativi alla proprietà dei dati all'interno del consorzio e definite le procedure operative per l'accessibilità ai campioni, tenendo naturalmente in considerazione gli esempi forniti dallo sviluppo di progetti nazionali e internazionali in questo settore.

### **Trasferibilità dei risultati**

La rete creerà i presupposti per una comunicazione e un funzionamento standardizzato nei vari step procedurali: dalla raccolta e immagazzinamento di campioni e dati, alla ricerca e alla condivisione di campioni rispondenti a determinate caratteristiche cliniche e/o epidemiologiche e/o demografiche per specifici progetti di ricerca, alle misure di sicurezza e di controllo di qualità.

La rete, inoltre, consentirà una omogeneizzazione anche nel settore della comunicazione e dell'informazione ai pazienti/donatori, e di seguito una maggiore rispondenza ai requisiti etico-legali per la tenuta e per l'uso reiterato dei campioni e relativi dati che le biobanche debbono osservare, sia nel contesto della ricerca nazionale sia in quello internazionale sempre più esigente in questo settore.

## **Genomica per la sanità pubblica: costituzione di una rete nazionale di banche genetiche di popolazione**

Il progetto vuole costituire una rete di biobanche che raccolgano campioni e dati relativi a coorti di popolazione (prospettiche, gemellari, isolati genetici), come strumento per la individuazione delle varianti genetiche e delle interazioni gene-ambiente che concorrono all'instaurarsi di patologie multifattoriali. All'interno della rete saranno affrontati i seguenti aspetti:

- gestione dei campioni;
- gestione dei dati;
- implementazione delle misure di sicurezza;
- trattamento degli aspetti etico-legali;
- accessibilità dei campioni all'interno di progetti condivisi e/o attraverso la rete italiane di biobanche.

L'attività sarà concentrata prevalentemente sul primo punto e consisterà in:

- ricerca e confronto delle fonti per l'identificazione della tipologia di materiale biologico appropriato al tipo di studio (ipotesi da testare, marcatori biologici di interesse, disponibilità di saggi analitici);
- ricerca e confronto delle fonti sulle procedure di raccolta, processamento, trasporto e conservazione del materiale biologico;

- ricerca, confronto e valutazione delle procedure e strumenti per la codifica, registrazione, localizzazione e tracciatura dei campioni biologici;
- valutazione della qualità del materiale raccolto e conservato.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Relativamente alla gestione dei campioni biologici saranno identificate le fonti, i materiali, le procedure e i sistemi per la messa in rete delle biobanche di popolazione italiane

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati saranno trasferiti agli altri componenti della rete e a partner esterni. La condivisione di procedure permetterà la condivisione e il confronto dei campioni conservati e in definitiva, il loro utilizzo per specifiche ipotesi scientifiche con una potenza statistica superiore a quella ottenibile con le collezioni delle singole biobanche.

### **Health Examination Survey (HES)**

Le HES si basano su campioni di popolazione generale estratti in modo casuale per fornire indicazione sui comportamenti e sui determinanti della salute: attraverso esami diretti della popolazione vengono raccolti dati su misure antropometriche, fisiologiche, cliniche, informazioni per valutare la prevalenza delle malattie croniche, la necessità e l'accesso ai servizi socio-sanitari, la capacità funzionale e lo stato nutrizionale.

Con questo obiettivo, alle determinazioni sui fattori di rischio cardiovascolare realizzate attraverso l'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare sono stati aggiunti una serie di esami quali la spirometria per valutare la funzionalità respiratoria, la densitometria ossea per valutare la capacità del calcio di legarsi alle ossa, la determinazione del monossido di carbonio per valutare la sua concentrazione nel sangue dovuta sia al fumo che all'inquinamento ambientale, alcune misure antropometriche quali la circonferenza della vita e dei fianchi e del braccio destro e alcune indagini ematochimiche come l'emocromo. In un sottocampione di età 55-79 anni è prevista la valutazione della capacità cognitiva e della performance fisica. Tutte queste determinazioni seguono un protocollo internazionale, devono essere realizzate con procedure e metodologie standardizzate e sono soggette a controllo di qualità. Con questo progetto l'Italia partecipa alla *Joint Action* per la realizzazione di un sistema di sorveglianza, la *European Health Examination Survey*.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Nel 2008 si è svolta la fase pilota con l'arruolamento di 220 persone di età 35-79 anni. Tra il 2008 e il 2011 sono state esaminate 6.000 persone in 16 Regioni, con un tasso di partecipazione medio del 60%. Oltre alle misure sopra descritte, realizzate con metodologia standardizzata, sono state raccolte informazioni su abitudini alimentari; dalla raccolta delle urine delle 24 ore, è stato identificato il consumo medio giornaliero di sodio, potassio e iodio nelle diverse regioni; è stata descritta la distribuzione dei fattori di rischio e valutato il trend in dieci anni di osservazione. Sono stati conservati campioni biologici nella banca biologica del CNESPS. Al termine dell'esame della popolazione previsto per la fine del 2012 sarà possibile avere un quadro obiettivo della distribuzione dei fattori di rischio, della frequenza delle condizioni a rischio e della prevalenza delle principali patologie cronico-degenerative nella popolazione adulta italiana.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I dati grezzi, al termine della raccolta nella singola regione, sono disponibili sul sito web [www.cuore.iss.it](http://www.cuore.iss.it); al completamento delle regioni che costituiscono la macroarea geografica, i dati vengono standardizzati per età (in modo da permettere il confronto geografico e temporale) e resi disponibili per macroarea; al termine dello screening saranno disponibili i

dati standardizzati per l'Italia nel suo complesso. I risultati saranno utilizzati per valutare lo stato di salute della popolazione italiana e integrati con quelli raccolti dall'ISTAT nell'ambito della *Health Interview Survey*, nonché quelli derivati dallo studio PASSI (Progressi delle Aziende Sanitarie per la Salute in Italia) sulla percezione dello stato di salute.

**Il monitoraggio della qualità dell'assistenza in RSA:  
validazione di un set integrato e multidimensionale di indicatori *quality*  
ed *equity oriented* ad elevata fattibilità di rilevazione e trasferibilità di sistema**

Il progetto si propone la:

- revisione della letteratura e delle esperienze relative a: i) sistemi di monitoraggio di processo ed esito della qualità dell'assistenza agli anziani accolti in residenze sanitarie, anche in collegamento con sistemi regolatori in uso, con particolare attenzione all'ambito europeo e nazionale; ii) pratiche mediche e infermieristiche *evidence based* per l'assistenza a soggetti anziani, soprattutto non autosufficienti;
- costituzione di un gruppo interregionale multidisciplinare (con competenze di geriatria, farmacologia clinica, epidemiologia e salute pubblica, organizzazione dei servizi sociali) per la definizione di un modello concettuale di monitoraggio e valutazione di qualità dell'assistenza in RSA e di un sistema integrato di indicatori *quality* ed *equity oriented*, ad elevata fattibilità di rilevazione e integrazione con i sistemi informativi già in uso;
- validazione del/dei sistema/i di indicatori definito/i in un campione di RSA delle regioni partecipanti, condotta attraverso tappe consequenziali: i) formazione alla rilevazione di operatori e amministratori; ii) rilevazione in un periodo campione; iii) verifica di qualità e completezza dei dati raccolti e identificazione di criticità informative e organizzativo/assistenziali; iv) revisione del sistema di indicatori; v) valutazione fattibilità rilevazione sistematica da fonti correnti.

**Risultati attesi nel triennio**

Alla fine del progetto sarà possibile: i) descrivere la qualità dell'assistenza in RSA nelle unità partecipanti, con particolare riguardo a problemi di maggior rilievo quali: ulcere da pressione, dolore, infezioni, cadute, assunzione di farmaci, misure di contenzione, malnutrizione ecc.; ii) proporre un insieme di indicatori appropriati per il monitoraggio di aspetti traccianti per la qualità dell'assistenza in RSA e utilizzabili in affiancamento alle misure di valutazione dei bisogni già rilevabili dai sistemi informativi attualmente in uso; iii) descrivere le principali criticità per la qualità dell'assistenza ed esplorare il ruolo eventuale di fattori organizzativi quali: dimensioni e complessità della strutture, gestione e organizzazione del personale di assistenza, livello di integrazione con l'ospedale e altri servizi territoriali.

**Trasferibilità dei risultati**

Disponibilità di conoscenze e strumenti di lavoro *evidence-based* per il miglioramento della qualità assistenziale, con particolare riguardo all'adozione di pratiche efficaci e alla garanzia dei Livelli Essenziali di Assistenza (LEA). Possibilità di proporre un sistema integrato di misure e strumenti di valutazione della qualità dell'assistenza in RSA, concettualmente coerente e operativamente ancorato sia al sistema informativo Mattone 12 sia al processo di accreditamento istituzionale.

## **Il percorso assistenziale delle persone affette da demenza**

Questo progetto è inserito in una *joint action* dal titolo “Alzheimer’s disease and other dementias”, è una proposta per una gestione complessiva in termini di sanità pubblica della demenza in Europa. *Disease management* è il termine che meglio definisce una gestione efficace di queste patologie. Questo approccio è oggi considerato come più indicato per ridurre l’impatto dei sintomi sia sul malato sia sui *caregiver*.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto prevede l’identificazione dei pazienti, un intervento formativo per i *caregiver* e per gli operatori, l’adozione di tecniche per il miglioramento della comunicazione, un coordinamento delle cure e un accurato monitoraggio della storia naturale della malattia.

### **Trasferibilità dei risultati**

Adesioni a Raccomandazioni e Linee Guida sull’approccio farmacologico, non farmacologico, uso di test neuropsicologici riconosciuti e validati nella comunità scientifica, procedure psico-educazionali per i *caregiver*.

## **Il Progetto CUORE – Epidemiologia e prevenzione delle malattie cardiovascolari**

Il progetto si articola in differenti linee di ricerca:

- Sorveglianza con l’obiettivo di stimare incidenza, prevalenza, letalità, sopravvivenza, utilizzo di procedure diagnostiche e terapeutiche per le malattie cardiovascolari; descrivere la distribuzione dei fattori di rischio e le condizioni a rischio cardiovascolare; di spiegare attraverso l’incidenza degli eventi, consumo di farmaci, numero di ricoveri ospedalieri e fattori di rischio l’andamento in discesa della mortalità coronarica dal 1980 al 2000. A livello europeo ha l’obiettivo di stilare raccomandazioni e metodologie per implementare i sistemi di sorveglianza cardiovascolare.
- Rischio cardiovascolare: ha l’obiettivo di aggiornare le funzioni di rischio cardiovascolare della popolazione italiana adulta attraverso l’integrazione degli studi longitudinali e il follow-up per gli eventi cardiovascolari fatali e non fatali; di valutare il ruolo dei classici e dei nuovi fattori di rischio nella predizione delle malattie cardiovascolari (attività fisica, fattori socioeconomici, fattori infiammatori, frequenza cardiaca, glicemia, creatininemia). Si realizza attraverso il follow-up di 18 coorti, che hanno arruolato circa 50.000 persone di età compresa fra 20 e 84 anni alla linea base.
- Applicazione della carta del rischio e del punteggio individuale nella pratica clinica da parte degli MMG, dei centri di medicina preventiva, dei centri trasfusionali e valutazione del loro utilizzo e applicazione.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Sorveglianza: tassi di incidenza, prevalenza, letalità, sopravvivenza, e utilizzo di procedure diagnostiche e terapeutiche per le malattie cardiovascolari per fasce di età e sesso; distribuzione dei fattori di rischio e delle condizioni a rischio cardiovascolare; applicazione del modello IMPACT per spiegare l’andamento in discesa della mortalità coronarica dal 1980 al 2000; raccomandazioni e metodologie per implementare i sistemi di sorveglianza cardiovascolare a livello europeo.
- Rischio cardiovascolare: aggiornamento delle funzioni di rischio cardiovascolare della popolazione italiana attraverso l’integrazione degli studi longitudinali e il follow-up per gli eventi cardiovascolari fatali e non fatali e inclusione di nuovi fattori di rischio

nella predizione delle malattie cardiovascolari; costruzione della carta del rischio cardiovascolare; allargamento della predizione alla fascia di età 69-75 anni.

- Applicazione della carta del rischio e del punteggio individuale nella pratica clinica da parte dei medici di medicina generale, dei centri di medicina preventiva, di medicina del lavoro, dei centri trasfusionali e valutazione del loro utilizzo e applicabilità nella pratica clinica.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- Manuale delle operazioni per l'impianto di registri di popolazione per le malattie cardiovascolari basato sull'appaiamento di mortalità e dimissione ospedaliera e validazione degli eventi fatali e non fatali; permetterà la produzione di mappe territoriali confrontabili in tempi diversi.
- Aggiornamento degli strumenti di valutazione del rischio cardiovascolare da utilizzare nella pratica clinica: punteggi individuali e carte del rischio hanno una ricaduta favorevole sull'efficacia e l'efficienza della prevenzione, ottimizzando l'informazione scientifica disponibile sulla popolazione italiana, evitando sprechi di risorse e operazioni sanitarie non eque. La valutazione dei nuovi fattori di rischio permetterà inoltre di inserire nel punteggio individuale nuove variabili per migliorare la predizione e ottenere strumenti predittivi sempre più agili.
- Corsi di formazione per medici di medicina generale per l'uso e applicazione della carta del rischio cardiovascolare.

#### **Il Progetto *MONICA Risk, Genetics, Archiving and Monograph* (MORGAM)**

Il Progetto MORGAM è uno studio collaborativo multinazionale che esplora il ruolo della genetica nello sviluppo delle malattie cardiovascolari, dell'associazione tra i fattori genetici, quelli classici e i marcatori biologici, attraverso il follow-up di coorti arruolate nelle indagini MONICA e di altre coorti seguite longitudinalmente.

Le coorti incluse nel progetto hanno una linea-base comune nel centro dati MORGAM dove viene effettuato un controllo di qualità. Il follow-up per la mortalità totale e specifica per causa, e per gli eventi coronarici e cerebrovascolari fatali e non fatali viene fatto dai centri collaboranti. Altro obiettivo è quello di stimare funzioni di rischio per la predizione di cardiopatia coronarica e ictus futuri nella popolazione europea.

Per l'Italia, vengono forniti i dati delle seguenti coorti per un totale di 12.754 uomini e donne: coorte di MONICA Latina (Gaeta, Campodimele, Cori, Albano, Anzio, Nettuno e Lenola) con linea-base negli anni 1983-87 su campioni rappresentativi di età 25-64 anni; coorti di MATISS (Priverno, Sezze, Bassiano e Roccaporga) con linea-base tra il 1983 e il 1996 su campioni rappresentativi di uomini e donne di età 20-69 anni.

Per queste coorti il follow-up è stato realizzato per mortalità totale e specifica per causa, infarto del miocardio acuto non fatale, infarto del miocardio acuto silente, rivascolarizzazione cardiaca, ictus non-fatali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Le attività previste sono le seguenti:

- la descrizione delle coorti MORGAM che fornisce le esatte definizioni delle coorti dei Centri Collaboranti MORGAM e descrive le loro caratteristiche di base e le procedure di raccolta dati, come le procedure di follow-up, gli *end-point* della malattia registrati e le procedure diagnostiche; dettagli delle procedure di misurazione e regole di conversione dei dati, che raccoglie le domande e le procedure usate per ogni coorte durante l'esame alla linea-base;

- la valutazione del potere predittivo dei fattori di rischio per i singoli Paesi e in pool;
- l'identificazione di funzioni per la valutazione del rischio di malattie cardiovascolari secondo tre modalità gradualità: una basata solo sui dati anamnestici o abitudini di vita (età, sesso, abitudine al fumo, anamnesi diabete), una basata su misure (pressione arteriosa, indice di massa corporea) e una terza che assuma alle precedenti le determinazioni ematochimiche (colesterolemia totale e HDL, glicemia).

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le analisi sull'associazione tra i valori dei fattori di rischio e le malattie cardio-cerebrovascolari attraverso l'utilizzo di un ampio insieme di studi longitudinali e la possibilità di indagare le interazioni gene-ambiente in un ampio studio caso-coorte porteranno allo sviluppo di nuove conoscenze sull'eziologia multifattoriale delle malattie cardiovascolari e all'elaborazione di un punteggio europeo che legghi i valori dei fattori di rischio alla malattia coronarica e all'ictus.

#### **Implementazione di indagini del Registro Nazionale Gemelli attraverso l'utilizzo di questionari online**

L'acquisizione di informazioni per la realizzazione di indagini secondo il procedimento classico caratterizzato dall'invio dei questionari per posta è significativamente limitato laddove è applicabile l'introduzione della tecnologia web per queste finalità. La conoscenza delle procedure per la gestione di documenti tramite archivi cartacei e archivi digitali attraverso l'uso di applicativi web dedicati favorisce la possibilità di acquisire dati attraverso la compilazione di questionari on line, forum per lo scambio di pareri, possibilità di realizzare servizi web in caso di studi multicentrici.

Frequente risulta la necessità di realizzare indagini volte a raccogliere informazioni nell'ambito di progetti di ricerca attraverso l'adozione di un software *ad hoc* caratterizzato da un livello di sicurezza garantita, accuratezza e precisione nella raccolta dati. L'incremento dell'utilizzo di Internet ha spinto il Registro Nazionale Gemelli (RNG) ad adottare nuove strategie per la conduzione degli studi attraverso il cambiamento delle modalità di somministrazione dei questionari e della raccolta dei dati. L'RNG ha recentemente avviato una indagine che si propone di studiare il ruolo dei fattori genetici e ambientali nella qualità del ciclo sonno-veglia. I destinatari saranno contattati per e-mail dal Registro e invitati a compilare online il questionario, ciò determina una richiesta e una fruizione immediata (erogatore e utilizzatore) e risulta economicamente vantaggioso.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Nel corso di un anno verranno contattati e invitati a partecipare allo studio circa 3.500 gemelli, di questi 2.000 maggiorenni e 1.500 minorenni. I gemelli maggiorenni compileranno il questionario via web e i minorenni quello cartaceo arrivato per posta. Analisi del livello di rispondenza attraverso l'adozione di un software *ad hoc* per la conduzione di indagini, valutazione e acquisizione della pratica necessaria all'utilizzo del software per l'erogazione di questionari per fornire ipotesi di riutilizzo e riadattamento. Valutazione sulla facilità di accesso e fruizione da parte dell'utilizzatore.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questo studio costituisce la prima sperimentazione per il Registro Nazionale Gemelli di una ricerca svolta sul web. L'utilizzo di questo strumento consentirà di acquisire velocemente i dati e procedere alla loro analisi. Diffusione dell'utilizzo di un software con specifiche caratteristiche sulla base delle esigenze di futuri studi condotti sul web che implicano contesti web più ampi uniti ad altre attività quali sistemi di raccolta dati, condivisione di materiali e informazioni in maniera categorizzata.

### **Indagine KAP nell'ambito delle attività del Registro Italiano Fibrosi Cistica (RIFC)**

Nell'ambito dei lavori del RIFC (collaborazione tra Registro Malattie Rare, il CNESPS, Reparto Epidemiologia genetica e i Centri clinici di riferimento nazionali), la cui costituzione è recente (2011), si intende avviare una indagine KAP che valuti quali siano le preoccupazioni dei potenziali partecipanti (e delle loro famiglie) riguardo temi come la tutela dei dati personali, l'uso dei campioni biologici per la ricerca, le informazioni su scopi e procedure di un determinato studio (CT) che ai pazienti potrebbe essere proposto nell'ambito della collaborazione con il Registro Europeo Fibrosi Cistica. Si è già acquisita esperienza nella conduzione di questo tipo di indagini e accumulate alcune evidenze in questo settore per gli studi su popolazione sana. Si ritiene importante ripetere l'indagine su *diseased population* per le diverse implicazioni che il loro coinvolgimento comporta.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Dai risultati e le relative analisi su una *cross-sectional survey* con questionario sarà possibile verificare quali siano le opinioni, i *concern* e i rischi, anche di tipo psicologico, che la proposizione di RCT comporta nei pazienti e nelle loro famiglie.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Stesura di lavori scientifici su argomenti di tipo etico, legale e comunicativo riguardanti popolazioni di pazienti che mettano in evidenza aspetti della ricerca che richiedono maggiori tutele, maggior coinvolgimento dei partecipanti od anche che evidenzino come possibili "semplificazioni" nelle procedure di tutela della privacy. Produzione di un Rapporto tecnico per fornire feed-back agli operatori dell'SSN che sono a stretto contatto operativo con i pazienti, non solo per l'azione terapeutica, ma anche per quella propria del RIFC. Questa produzione rappresenta uno step importante per mantenere la compliance degli operatori nel settore delle sorveglianze e per fornire loro elementi conoscitivi che creino una più efficace e corretta comunicazione con i pazienti (tutela dei diritti, efficacia nelle spiegazioni, ecc.)

### **Indagini sulle coperture vaccinali e sugli ostacoli alla vaccinazione in gruppi di popolazione**

Le vaccinazioni sono tra gli interventi preventivi più efficaci a disposizione della sanità pubblica. Uno dei fattori che determina il successo delle strategie vaccinali è rappresentato dalla corretta informazione degli utenti. Per questo motivo, i due studi inclusi nel progetto hanno l'obiettivo di identificare i principali ostacoli alla vaccinazione e di mettere a punto strumenti per la promozione della vaccinazione: il primo è rivolto alle dodicenni, target della vaccinazione antiHPV, il secondo agli operatori sanitari.

#### **– Monitoraggio delle coperture vaccinali per HPV/Progetto VALORE**

Il CNESPS raccoglie semestralmente dati di copertura per HPV per monitorare l'andamento della campagna. Il progetto VALORE, si propone di descrivere gli aspetti organizzativi, comunicativi e sociali delle campagne di vaccinazione per HPV attraverso un questionario diretto ai referenti delle ASL; l'integrazione con i dati di copertura permetterà di identificare le strategie associate ad alte o basse coperture vaccinali.

#### **– HProImmune**

Il progetto intende promuovere fra il personale sanitario un corretto atteggiamento verso la vaccinazione, permettendo l'acquisizione di una maggiore consapevolezza del problema e conseguente miglioramento delle coperture vaccinali. Si propone inoltre di identificare eventuali barriere all'adesione alla vaccinazione attraverso la conduzione

di *focus group* e di produrre e somministrare agli operatori sanitari uno strumento efficace di promozione delle vaccinazioni.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Monitoraggio delle coperture vaccinali per HPV e Progetto VALORE:

- Descrizione delle campagne vaccinali per HPV nelle Regioni e ASL italiane e identificazione dei fattori associati a alte o basse coperture vaccinali.
- Indagine sui motivi di mancata vaccinazione per HPV in un campione di adolescenti che non hanno aderito al programma vaccinale.
- Messa a punto di un documento tecnico sulla conduzione di una campagna vaccinale e un pacchetto formativo, utilizzabile per una formazione a cascata degli operatori, che includano: aspetti tecnici ed epidemiologici, aspetti comunicativi e organizzativi della rete di servizi e operatori che pianifica, promuove e attua la campagna.

HProImmune:

- Revisione sistematica della letteratura scientifica sulle malattie prevenibili da vaccino rilevanti per gli operatori sanitari e identificazione di linee guida, raccomandazioni, documenti e dati di copertura emanati dai vari stati membri dell'UE. Preparazione di un database completo.
- Indagine sui comportamenti, gli atteggiamenti e gli ostacoli alla vaccinazione tra gli operatori sanitari.
- Messa a punto di uno strumento di promozione della vaccinazione, sua validazione e distribuzione per migliorare le pratiche di vaccinazione fra gli operatori sanitari.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La raccolta semestrale delle coperture vaccinali permette di monitorare tempestivamente la campagna di vaccinazione per l'HPV nelle Regioni italiane e lo studio VALORE potrà contribuire al miglioramento delle coperture vaccinali, attraverso l'identificazione delle strategie e azioni più efficaci. Il documento e il pacchetto formativo prodotti saranno messi a disposizione delle Regioni per le prossime campagne di vaccinazione.

Lo studio HPROIMMUNE può contribuire al miglioramento delle coperture vaccinali tra gli operatori sanitari. Lo strumento di comunicazione messo a punto per la promozione della vaccinazione tra gli operatori sanitari, oltre ad essere diffuso e utilizzato in Italia, sarà diffuso e reso disponibile anche a tutti gli Stati membri dell'UE.

### **Indicatori di salute: valutazione e implementazione dei sistemi di monitoraggio finalizzati alla programmazione sanitaria nazionale, regionale ed europea per il miglioramento dello stato di salute della popolazione**

Le attività sono rivolte all'identificazione, definizione e implementazione dei modelli, dei sistemi e degli indicatori utili al monitoraggio dello stato di salute nella popolazione. Attraverso la costituzione di un gruppo di lavoro e il coinvolgimento di ISTAT, Ministero della Salute, CCM, Università, Agenzia per i Servizi Sanitari Regionali sono stati rilevati e definiti i parametri funzionali alla definizione dello standard europeo di monitoraggio dello stato di salute dei cittadini europei a partire dagli indicatori ECHI ([www.healthindicators.org](http://www.healthindicators.org)). Le attività ECHIM sono rivolte all'implementazione dei modelli, dei sistemi e degli indicatori identificati nelle fasi precedenti. In collaborazione con Eurostat, WHO, OECD e CE i contributi forniti dal Reparto Salute della popolazione confrontano in maniera dinamica, anche attraverso le attività nazionali SIVEAS, il grado di integrazione della *core list* ECHIM negli standard nazionali di monitoraggio negli Stati membri (per la definizione dello standard europeo di monitoraggio). Tali attività potranno

consolidarsi nel triennio attraverso nuove *joint action* e progettualità formali di monitoraggio.

Alla luce della collaborazione con il CDC di Atlanta e dei risultati e dei prodotti delle attività dei due progetti attivati nel 2008 nell'ambito del SIVeAS si proseguirà nella definizione dei modelli di prioritizzazione in salute pubblica a supporto alle attività nazionali e regionali di programmazione sanitaria.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Risultati attesi nel triennio sono:

- Identificazione, definizione e implementazione dei modelli, dei sistemi e degli indicatori utili al monitoraggio dello stato di salute nella popolazione.
- Finalizzazione dello standard europeo di monitoraggio dello stato di salute dei cittadini europei definito dal Progetto ECHIM.
- Valutazione periodica della implementazione delle modalità standardizzate di rilevazione epidemiologica dello stato di salute.
- *Health Reporting* europeo periodico.
- Partecipazione al Portale europeo *Knowledge and Information System*.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le ricadute per l'ISS sono allo stato dell'arte risultate nel consolidamento della leadership europea nel settore del monitoraggio della salute per indicatori e del ruolo centrale dell'ISS, su mandato della CE, nell'*assessment* e nella valutazione di implementabilità del sistema e degli indicatori per tutti gli Stati membri e nel ruolo di primo piano nella definizione delle finalità, delle funzioni e delle procedure relative ad una futura struttura centrale europea (EU *Health Observatory*) dedicata all'*Health Monitoring*, ispirata al CDC ma dedicata agli aspetti di più ampio respiro di salute pubblica.

I risultati sono ampiamente trasferibili ai contesti europei, nazionali e regionali. La trasferibilità dei risultati è peraltro costante e continua attraverso il contributo già in corso all'aggiornamento dell'*European Portal of Knowledge and Information System* disponibile sul sito UE di *Public Health* e attraverso la implementazione nazionale dello *standard* europeo.

### **Indicatori epidemiologici per il controllo del cancro in Italia**

La disponibilità di indicatori epidemiologici aggiornati e affidabili di frequenza (incidenza, prevalenza e mortalità) e outcome (sopravvivenza) è un prerequisito essenziale per impostare e valutare le attività di controllo del cancro a livello di popolazione, dalla prevenzione, al trattamento, fino alla ricerca clinica e traslazionale.

In Italia i registri tumori, la principale fonte di dati per la sorveglianza epidemiologica, coprono circa il 30% della popolazione nazionale, con una diffusione sul territorio sbilanciata verso il nord e il centro.

Integrando i dati dei registri con le fonti di dati correnti (mortalità per causa e popolazione residente) è possibile, con la metodologia statistica MIAMOD, stimare e proiettare a breve e medio termine incidenza, prevalenza, sopravvivenza e mortalità per tumore, a livello nazionale e regionale. Le stime prodotte sono inserite nel Piano Statistico Nazionale (Statistiche Derivate o Rielaborazioni).

Attualmente è in lavorazione l'aggiornamento al 2015 delle stime regionali per sette sedi tumorali tra le più diffuse (colon-retto, polmone, mammella, prostata, stomaco, melanoma, cervice uterina) e per il complesso di tutti i tumori.

Nei prossimi anni si prevede di ampliare il panorama delle sedi tumorali e di aggiornare le stime per tenere conto dell'evoluzione temporale dei fenomeni in esame. È necessario

inoltre disseminare le stime, attraverso pubblicazioni e siti web, per arrivare a tutti i potenziali fruitori.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Produzione di stime di sopravvivenza in Italia e analisi comparativa con gli altri Paesi europei. Oltre all'analisi longitudinale per coorte di diagnosi, analisi dei dati dei pazienti seguiti nel periodo di follow up più recente, per ottenere stime più tempestive e aggiornate. Sviluppo di modelli di regressione per analizzare differenziali geografici e temporali della sopravvivenza, per individuare la quota di pazienti guariti, il tempo alla guarigione, il tempo alla morte dei casi con esito fatale.

Aggiornamento delle stime di mortalità, incidenza e prevalenza a livello nazionale e regionale già pubblicate nel 2007 per tutti i tumori e per i tumori di polmone, mammella, colon-retto, stomaco, prostata, cervice uterina, melanoma. Estensione delle stime a ulteriori sedi tumorali (utero, linfomi e leucemie). Analisi sistematica dei trend di incidenza, prevalenza e mortalità. L'attività include sia lo sviluppo metodologico, che gli aspetti applicativi con l'obiettivo di costruire un sistema di indicatori aggiornato, validato e disponibile su 'public domain' con una certa sistematicità di produzione.

Contribuire allo sviluppo e al mantenimento del sito web per la diffusione di dati essenziali agli operatori sanitari e al pubblico (www.tumori.net).

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'attività è svolta in collaborazione con l'associazione dei registri tumore italiani (AIRTUM) nell'ottica di creare una rete di esperti delle metodologie di stima, valorizzare risorse e competenze e di migliorare la qualità dei risultati prodotti.

Gli indicatori epidemiologici prodotti sono di interesse per la sorveglianza della diffusione dei tumori nella popolazione, per la valutazione delle politiche sanitarie di controllo del cancro implementate a livello regionale e nazionale, in particolare per la valutazione di impatto degli screening oncologici (mammella, cervice uterina e colon-retto). La trasferibilità dei risultati prodotti è immediata per le regioni e per gli organi del sistema sanitario nazionale.

### **Individuazione di indicatori e sperimentazione dello strumento di raccolta dati basato su misure della qualità della vita per la valutazione dell'esito a breve termine degli interventi di sostituzione protesica dell'anca**

La valutazione dell'esito di interventi di sostituzione protesica è materia complessa, non basandosi solo sulla valutazione di endpoint facilmente rilevabili come potrebbe essere la mortalità a 30 giorni. L'esito è infatti il risultato di più fattori dipendenti dallo stato di salute del paziente, dal servizio prestato nell'ospedale e dal dispositivo. Un dispositivo che ha fallito viene registrato dal sistema in quanto il paziente deve necessariamente subire un intervento di revisione. Ma la letteratura mostra che la vita media di un dispositivo *in vivo* è di circa dieci anni: risulta quindi indispensabile mettere a punto metodiche che permettano di valutare l'esito a breve considerando altri fattori quali la misura della qualità della vita. Lo studio si propone di:

- effettuare una revisione sistematica della letteratura per individuare i fattori di rischio e le comorbidità da utilizzare nei modelli di *risk adjustment* e definire indicatori;
- sperimentare, in alcune regioni e in altri Paesi europei, la misura della qualità della vita dei pazienti operati utilizzando questionari già validati (es. WOMAC, SF36);
- valutare se i modelli di *risk adjustment* basati sulle informazioni contenute nella SDO forniscano risultati significativamente diversi da quelli ottenuti con modelli che

includano i fattori di rischio individuati e i dati derivanti dalla misura della qualità della vita.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Individuazione dei fattori di rischio per pazienti sottoposti a intervento di sostituzione protesica dell'anca e degli indicatori utili per la misura dell'esito. Elaborazione di modelli di *risk adjustment*. Validazione della metodologia per la valutazione dell'esito a breve termine basata sull'acquisizione al ricovero di variabili identificate come fattori di rischio e somministrazione di questionari validati per la misura della qualità della vita. Confronto dei risultati derivanti dall'utilizzo di differenti modelli di *risk adjustment*. Definizione a livello europeo di un sistema di monitoraggio dell'esito negli interventi di sostituzione protesica.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La trasferibilità è immediata: i risultati conseguiti nello studio multicentrico poliregionale e nei paesi partecipanti per la sperimentazione del flusso informativo e della metodologia per la valutazione dell'esito nel breve-medio termine, saranno disponibili per tutte le regioni e i paesi europei interessati ad implementare questa attività.

### **Interazioni gene-ambiente nella probabilità di sviluppo di asma nei bambini conseguente all'esposizione ad acido folico nel terzo trimestre di gravidanza**

Lo studio si propone di utilizzare informazioni già raccolte sull'assunzione di acido folico per le mamme di gemelli, afferenti al registro, nel corso dello studio su gravidanze gemellari e acido folico. Alcuni studi recenti hanno evidenziato un aumentato rischio di asma nei bambini a seguito di assunzione di acido folico in un periodo della gravidanza, il terzo trimestre, che non è quello consigliato per la prevenzione dei difetti del tubo neurale, principale indicazione all'assunzione di acido folico. Il presente studio si propone di ricontattare le coppie di gemelli le cui mamme avevano partecipato allo studio sull'assunzione di acido folico, e di cui già si conosce il dettaglio dell'esposizione, per raccogliere informazioni su asma, sibili e allergie nei primi anni di vita per verificare quindi l'ipotesi sopra descritta. Inoltre sarà richiesta la donazione di DNA tramite raccolta della saliva per i gemelli. In questo modo sarà possibile indagare possibili interazione gene-ambiente. Per il progetto è stato richiesto un finanziamento nell'ambito del programma ricerca finalizzata 2010.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Stima dell'associazione fra assunzione di acido folico nel terzo trimestre di gravidanza e asma/sibili nei gemelli a tre anni (e a 6/7 anni quando possibile).
- Ereditabilità dell'asma in gemelli esposti e non esposti all'assunzione di acido folico nel terzo trimestre di gravidanza al fine di stimare eventuali interazioni gene-ambiente.
- Stima della *locus specific heritability* per l'asma, cioè la proporzione di varianza dovuta all'effetto di possedere in genotipo di rischio.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'identificazione di come geni a assunzione di acido folico nel terzo trimestre di gravidanza possano interagire e eventualmente aumentare il rischio di sviluppo di asma nei bambini può avere importanti implicazioni in sanità pubblica. La caratterizzazione dei bambini a rischio già in epoca prenatale può portare a misure che diminuiscano tale rischio o almeno diminuiscano il carico di malattia di questi bambini. Le implicazioni dipenderanno dai risultati stessi. Se l'associazione fra acido folico e asma venisse confermata allora si potrebbero implementare politiche per limitare l'uso di acido folico al periodo necessario per

la prevenzione dei difetti congeniti, se fosse confermata solo attraverso l'interazione gene-ambiente allora gli interventi di prevenzione potrebbero essere attuati solo sui bambini a rischio. Infine se l'associazione non venisse confermata allora le future mamme potranno essere tranquillizzate sull'utilizzo dell'acido folico in tutta la gravidanza.

### **Invecchiamento. Epidemiologia dell'invecchiamento, valutazione della qualità dei servizi e modelli di continuità assistenziale per l'anziano fragile**

L'area della ricerca sull'invecchiamento si articola attraverso consolidate attività istituzionali europee e nazionali:

- ERA-AGE 2 – European Research Area in Ageing extension. UE, 7<sup>th</sup> Framework Programme
- FUTURAGE – A Roadmap for ageing research. UE, 7<sup>th</sup> Framework Programme
- VINTAGE – Good health into older age. UE, 2<sup>nd</sup> Programme of Community Action in the field of Health
- RF 2009 – Impact of neurological aging and cognitive impairment on hospitalization and mortality in an Italian elderly general population cohort
- IPREA – Italian Project for Epidemiology of Alzheimer disease
- ILSA – Italian Longitudinal Study on Ageing

Le attività di stretta natura epidemiologica sono dedicate alla elaborazione dei dati utili all'identificazione dei determinanti di salute e dei fattori predittivi di malattia nella popolazione anziana con particolare riguardo alle problematiche riguardanti l'individuazione precoce del deficit cognitivo e lo studio della transizione verso fasi conclamate di demenza e Malattia di Alzheimer. Tali attività, che comprendono la valutazione delle variabili psicodiagnostiche, di *neuroimaging*, genetiche e biologiche delle coorti ILSA e IPREA rappresentano un punto di riferimento europeo e internazionale per lo studio dinamico dei fenomeni collegati all'invecchiamento alle disabilità nell'anziano fragile.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Pubblicazioni scientifiche.
- Creazione database nazionali.
- Mantenimento banca biologica.
- Produzione e disseminazione buone prassi.
- Sperimentazione e attuazione modelli gestionali assistenziali per gli anziani.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La trasferibilità dei risultati coerente con gli obiettivi proposti, è di valenza nazionale e transnazionale. La creazione di un database unico costantemente aggiornato di follow-up di coorti storiche ILSA, la disponibilità della banca biologica (nuova coorte IPREA) e la collaborazione tra gruppi di ricerca europei e degli Stati Uniti (NIA-NIH) hanno determinato la confluenza delle attività nel *Transatlantic Network on Ageing Issues*. L'ISS è l'unica istituzione di riferimento dell'*International Council*. I progetti ERA-AGE, EERA-AGE nell'ERA-NET, FUTURAGE sono da anni tra i più avanzati del Programma Quadro di Ricerca e verosimilmente si candideranno al *call* europeo sulla Malattie Neurodegenerative con la coorte IPREA per lo studio europeo sull'Alzheimer, consolidando il ruolo dell'ISS nella rete di eccellenza esistente che ha consentito linee strategiche comuni atte a garantire la trasferibilità costante dei risultati agli utilizzatori finali: *policy maker, health professional, utenti*.

### **Ipotiroidismo congenito: il registro e gli studi analitici**

Il Registro Nazionale degli Ipotiroidei congeniti dal 1987, grazie alla rete dei centri di screening e di follow-up, raccoglie informazioni demografiche e cliniche su tutti i nuovi casi di Ipotiroidismo Congenito (IC) diagnosticati. L'incidenza dell'ipotiroidismo congenito è di 1 caso su 2000 nati vivi e negli ultimi anni si è registrato un incremento dovuto, in parte, alla riduzione dei *cut-off* del TSH allo screening e alla conseguente inclusione di forme lievi di IC.

Il trattamento precoce dei nuovi casi di ipotiroidismo diagnosticati in Italia ha consentito di prevenire le gravi sequele neuropsichiche conseguenti al deficit tiroideo alla nascita ma, i meccanismi alla base di questa patologia non sono ancora ben noti. Appare opportuno quindi continuare l'attività del Registro e parallelamente avviare studi epidemiologici di tipo analitico.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Continuerà la collaborazione con il Dipartimento di BCN per l'analisi delle informazioni raccolte dal Registro e la descrizione del fenomeno a livello spaziale e temporale. Ad oggi sono arruolati nel Registro circa 4.200 bambini affetti da forme permanenti di IC. Per ciò che riguarda la diagnosi strumentale (scintigrafia e/o ecografia), questa viene eseguita prima dell'inizio della terapia in circa il 70% dei nati con IC e, considerando solo i casi con forme permanenti, la frequenza dei diversi tipi di diagnosi è la seguente: 40% ectopia, 26% agenesia, 34% ghiandola in sede (21% ghiandola normale, 5% ipoplasia, 8% iperplasia). I dati del Registro hanno inoltre evidenziato un rischio di IC maggiore nei neonati pretermine rispetto ai neonati a termine. Utilizzando i dati raccolti in tanti anni di sorveglianza verrà indagata più in dettaglio la relazione tra ipotiroidismo congenito e parto pretermine e/o prematurità del bambino. Nel corso dei prossimi anni, inoltre, verrà portato a termine (analisi dei dati e loro pubblicazione) lo studio multicentrico che prevedeva il richiamo e il follow-up ormonale, auxologico e neuropsichico dei bambini reclutati in un precedente studio caso-controllo population based realizzato dallo stesso gruppo di studio.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati di queste attività consentiranno di proseguire la sorveglianza dei casi di ipotiroidismo congenito nel nostro Paese e contribuiranno all'individuazione di possibili fattori di rischio modificabili la cui riduzione potrà contribuire alla prevenzione primaria di questa patologia.

### **L'Etica della ricerca scientifica negli studi clinici e di popolazione**

L'etica che si pone come obiettivo la giustificazione e la minimizzazione del rischio e degli oneri a carico dei soggetti in studio e inoltre la tutela dei loro diritti è sempre più oggetto di una normativa che spesso pone problemi interpretativi circa i modi di condurre lecitamente una giusta ricerca.

Inoltre il DM sulle Linee Guida di riferimento per l'istituzione e il funzionamento dei comitati etici (GU n. 122, 28/5/98) ha dato un forte impulso alla creazione di comitati etici locali e al decentramento delle responsabilità (anche legali) riguardo alla tutela dell'eticità e scientificità della ricerca sull'uomo. Questa rete di comitati etici pone il problema di costruire modalità di lavoro e una cultura condivisa.

Senza negare il ruolo decisivo dei comitati etici, resta comunque ai ricercatori chiarire ai garanti e agli specialisti di altri settori le specificità etiche e scientifiche dei propri studi e di giustificare i loro provvedimenti. A tale proposito nel triennio si proseguiranno attività di rilevazione e di descrizione anche tramite indagini empiriche delle questioni etiche connesse alla ricerca, in particolare quella epidemiologica, con l'obiettivo di sviluppare, da un lato, la

cultura etica della ricerca tra i ricercatori e dall'altro, di fornire un supporto ai comitati etici relativamente ai problemi connessi alla fattibilità della ricerca.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati riguarderanno sintesi del dibattito etico nazionale e internazionale sulle ricerche a partecipazione umana, soprattutto ricerche cliniche e studi epidemiologici osservazionali. In particolare saranno descritte e valutate novità relative al consenso informato, ai comitati etici, alla sperimentazione clinica, alla protezione dei dati personali e alle normative riguardanti il settore.

Gli studi avranno solitamente forma di saggi o rassegne. Sono inoltre previste indagini a carattere empirico i cui dati saranno ottenuti dalla letteratura o mediante indagini.

I dati saranno raccolti secondo modalità standardizzate tramite schede o questionari. Le analisi saranno prevalentemente di tipo frequentista. La precisione delle stime verrà valutata mediante il calcolo dei limiti di confidenza e le differenze di frequenza significative saranno stabilite mediante opportuni test statistici.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Poiché l'obiettivo di questo progetto è contribuire a diffondere la cultura dell'etica della ricerca nel nostro Paese, favorendo il dibattito e lo scambio di opinioni tra le parti in causa riguardo a ricerca, comitati etici e normative, i risultati degli studi saranno prevalentemente pubblicati su riviste italiane del settore.

I risultati delle ricerche avranno inoltre una ricaduta sul corso di Etica della ricerca scientifica istituito presso il CNESPS dal 2007.

Il CNESPS è uno dei principali motori dell'attività epidemiologica del Paese, è ben collegato col Ministero della Salute e società scientifiche nazionali per le necessarie collaborazioni, inoltre in esso sono presenti adeguate competenze per aspirare ad essere sede autorevole per tale attività.

### **Malattie cardiovascolari e tumori: quali i fattori di rischio comuni?**

In Italia le patologie cardiovascolari e tumori costituiscono insieme più del 70% della mortalità totale. Entrambe le patologie sono causate dalla interazione di fattori di rischio ambientali, genetici e comportamentali, documentati da una ricca ricerca epidemiologica: che l'ambiente e lo stile di vita siano cause importanti è documentato dal fatto che l'incidenza di tumori e di infarto del miocardio variano molto nelle diverse aree geografiche così come gli studi sugli immigrati hanno dimostrato che entro la prima e seconda generazione il rischio diventa simile alle popolazioni indigene. Utilizzare gli studi epidemiologici longitudinali per la ricerca delle cause e per la realizzazione di strategie preventive di entrambe le patologie sarebbe molto utile, ma fino ad oggi poco è stato rivolto verso questa direzione perché troppo dispendiosi per poter raccogliere e misurare la lunga lista dei sospetti fattori di rischio comuni e perché le due patologie hanno una modalità di manifestazione molto diversa richiedendo metodologie di validazione accurate e costose. Abbiamo pertanto iniziato ad esplorare la possibilità di unire i dati provenienti dalle coorti longitudinali del progetto MATISS e MONICA e il registro tumori della provincia di Latina per valutare quali siano i fattori di rischio che accomunano le due patologie; se le azioni di prevenzione possono essere comuni; se il rischio "favorevole" identificato per le malattie cardiovascolari, sia protettivo anche per i tumori.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il database raccoglie i seguenti fattori di rischio, misurati applicando le stesse metodologie e procedure: titolo di studio (suddiviso per l'analisi statistica in diploma superiore/università, licenza media inferiore, elementare), indice di massa corporea

(suddiviso per l'analisi in normale  $<25 \text{ kg/m}^2$ , sovrappeso  $25-29,9 \text{ kg/m}^2$ , obeso  $>30 \text{ kg/m}^2$ ), abitudine al fumo (fumatore, ex-fumatore e mai fumato), consumo di alcol (mai bevitore/astemio,  $<50 \text{ g}$ ,  $50-100 \text{ g}$ ,  $>100 \text{ g}$ ), presenza di diabete (si= glicemia  $<126 \text{ mg/dL}$  o in trattamento), sindrome metabolica (secondo la definizione ATPIII); per le donne le informazioni aggiuntive sono lo stato menopausale e aver avuto gravidanze. L'età alla linea base è 20-75 anni. È possibile appaiare i dati della linea base (9.752 persone, 5.153 donne e 4.599 uomini senza tumori e malattie cardiovascolari alla linea base) con i dati del registro tumori e identificare il numero di eventi cardiovascolari e di tumori fino al termine del follow-up disponibile. L'analisi statistica includerà la descrizione dei fattori di rischio alla linea base, l'analisi "univariata" (HR e significatività) sui fattori di rischio principali (abitudine al fumo, indice di massa corporea, consumo di alcol, presenza di diabete e sindrome metabolica), l'analisi "multivariata" (modello di Cox), considerando come *end-point* i tumori e le malattie cardiovascolari; tutte le analisi saranno condotte aggiustando per età, genere, periodo di arruolamento e titolo di studio.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'uso integrato di fonti informative validate con criteri diagnostici standardizzati (studi longitudinali e registri di popolazione) rappresenta un'opportunità di sviluppo per l'epidemiologia (indicatori di frequenza) e per la sanità pubblica (azioni di prevenzione).

Qualora venisse confermata l'ipotesi di fattori di rischio comuni fra malattie cardiovascolari e tumori sarebbe possibile intraprendere azioni di prevenzione utili per entrambe le patologie e pianificare interventi di prevenzione comunitaria.

### **Modelli matematici per la descrizione e il controllo delle epidemie**

Negli ultimi anni l'impiego dei modelli matematici sia deterministici che stocastici in epidemiologia si è sempre più diffuso. Infatti, attraverso l'impiego di modelli l'aspetto di una curva epidemica in un'epidemia a propagazione all'interno di una data popolazione può essere definito su base matematica. L'utilizzo dei modelli presuppone un'attenta valutazione dei parametri da utilizzare per simulare la malattia (proporzione di suscettibili, modalità di trasmissione, presenza di ospiti intermedi e di serbatoi ambientali o animali, patogenicità e virulenza del microrganismo, probabilità di infettarsi, ecc.). Grazie a questo nuovo approccio integrato è anche possibile valutare l'impatto delle diverse malattie in assenza o in presenza di misure specifiche per limitare la trasmissione della malattia stessa. Per tale motivo sono stati applicati sia a malattie emergenti come la pandemia influenzale che a malattie classiche come l'influenza stagionale, il morbillo e la varicella. Tra i parametri necessari per le simulazioni matematiche risultano di particolare rilevanza i tassi di contatto definiti dalla cosiddetta "matrice dei contatti" che descrive i pattern di contatto fra individui e quindi le possibilità di trasmissione da individui infetti a quelli suscettibili. In sanità pubblica, la rilevanza pratica delle risposte che i modelli matematici possono fornire dipende in grande misura dalla qualità delle stime di questi parametri chiave.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Stimare il numero riproduttivo di base ( $R_0$ ) e di altri parametri essenziali per meglio comprendere la trasmissibilità dei diversi virus influenzali durante le diverse stagioni e l'efficacia delle misure di sanità pubblica adottate.
- Applicazione della matrice dei contatti alla diffusione delle infezioni in ambito ospedaliero.
- Definizione piani lavoro e linee guida per misure di controllo e mitigazione costo-efficaci per l'influenza in UE.

- Stimare il numero riproduttivo di base (R0) e di altri parametri essenziali per meglio comprendere la trasmissibilità del morbillo e l'efficacia delle misure di sanità pubblica adottate nell'ambito del Piano nazionale per l'eliminazione del morbillo e della rosolia congenita 2010-2015.
- Modellizzare l'introduzione di nuovi vaccini per stimare l'efficacia vaccinale e le stime costo-efficacia.
- Sviluppo metodi per stimare l'impatto delle malattie infettive in UE.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le attività descritte sono coerenti con le raccomandazioni della CE, della WHO e dell'ECDC che prevedono che i modelli matematici rientrino tra le attività prioritarie da promuovere tra gli Stati membri per effettuare valutazioni del rischio e stime di impatto in sanità pubblica. I dati scaturiti dai modelli per le patologie sopra elencate saranno tradotti in documenti tecnici per il Ministero della Salute e in pubblicazioni scientifiche per la validazione dei modelli utilizzati.

#### **Monitoraggio della possibile associazione tra vaccinazione antinfluenzale e Sindrome di Guillain Barrè**

Valutare l'associazione tra vaccinazione e Sindrome di Guillain Barrè (GBS) durante la campagna di vaccinazione antinfluenzale 2011-2012. Proseguimento dello studio condotto in sette Regioni italiane nella campagna 2010-2011, con analisi "caso-controllo" e *Self Controlled Case Series* su casi incidenti di Guillain Barrè.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Valutazione dei possibili rischi tra vaccinazione e GBS.

#### **Multiple Births Cohort Study**

Il progetto è uno studio multicentrico con otto centri nascita afferenti alla Società Italiana di Neonatologia. Obiettivo dello studio è la stima dell'ereditabilità di alcune caratteristiche dei neonati, tra le quali, ad esempio, l'accrescimento, lo sviluppo neurologico e psicomotorio, i disturbi del sonno. Lo studio si propone di analizzare il ruolo e le relazioni che esistono tra fattori genetici e fattori ambientali nella determinazione delle caratteristiche sopra indicate e di indagare eventuali fattori legati alla salute materna e paterna che possono aver esercitato una influenza sul feto e sullo sviluppo successivo del neonato. A tale scopo si sta allestendo una collezione di campioni di DNA da saliva per i gemelli e i loro genitori che verranno conservati nella banca biologica del CNESPS. Per lo studio, in alcuni casi, sarà necessario stabilire con analisi genetica se i gemelli sono monozigoti o dizigoti (analisi della zigosità). I gemelli arruolati saranno ricontattati a 6, 12, 18 e 24 mesi di vita per avere informazioni di follow-up sulla loro crescita, la loro salute e sul loro sviluppo neurologico e psicomotorio.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Stima dell'ereditabilità di alcuni *outcome* pediatrici. Lo studio longitudinale prospettico permetterà anche lo studio dei fattori di rischio per i suddetti outcome. Inoltre, data la raccolta di DNA da saliva sarà possibile studiare le interazioni gene-ambiente.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati di questo studio serviranno a sviluppare politiche di prevenzione di alcuni tratti complessi studiati nel progetto. La stima dell'ereditabilità degli outcome neonatali e pediatrici guideranno la stesura e l'implementazione di politiche di prevenzione. Infatti, capire la percentuale di varianza, sul totale, spiegata dai geni e dall'ambiente orienterà in un

senso la ricerca di varianti geniche legate al tratto e a dall'altro l'implementazione di politiche di prevenzione sui fattori modificabili.

Per esempio, per quanto riguarda l'accrescimento, la comprensione di quali sono i fattori (genetici o ambientali) che su di esso influiscono in termini di predizione di rischio di obesità futura e di come la velocità di accrescimento interagisce con altri fattori di rischio per l'obesità sarà uno strumento utile per il pediatra.

### **Nuovi modelli organizzativi e integrazione delle cure nell'assistenza alle persone con patologie croniche, e in particolare con Scompenso Cardiaco (SC)**

La "continuità assistenziale" e la "gestione proattiva" (medicina d'iniziativa) sono ormai ampiamente riconosciute in letteratura quali strumenti fondamentali per una efficace ed efficiente gestione dello SC, che richiede un'assistenza continua con livelli di complessità differenziati. Risulta evidente l'importanza di implementare e confrontare modelli di continuità assistenziale e di percorso diagnostico-terapeutico, verificandone l'effettiva praticabilità e sostenibilità, nonché l'efficacia nel contrastare le principali cause di debolezza.

I capisaldi di sviluppo del progetto, che mira a ridurre il gap tra la forza delle evidenze scientifiche relative alla continuità assistenziale e la debolezza di quest'ultima nel mondo reale, sono la sperimentazione dell'applicazione di percorsi standardizzati ma adattabili ai fabbisogni dei diversi pazienti e monitorati attraverso indicatori di processo e di esito all'interno di un contesto organizzativo che sappia rivedere criticamente l'organizzazione strutturale e operativa dei propri servizi. Il progetto prevede la sperimentazione di un modello applicato e confrontato su realtà diverse (Liguria, Marche, Sicilia) che fornisca riflessioni e indicazioni sulle possibili soluzioni organizzative e operative di continuità assistenziale ospedale-territorio.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Definizione di un nuovo modello organizzativo e operativo di rete integrata ospedale-territorio, basato sui capisaldi evidence-based di gestione dei pazienti con patologia cronica (dimissione standardizzata, ambulatori dedicati, strutture intermedie, percorsi integrati H/T con gestione proattiva) e mirato a ridurre gli accessi impropri all'ospedale e a migliorare gli outcome dei pazienti.

#### **Trasferibilità dei risultati**

In ognuna delle Regioni partecipanti, oltre al "contesto attivo" nel quale sarà sviluppato il progetto, sarà individuata un'altra provincia nella quale, a tempi differiti, possa sperimentarsi la trasferibilità del modello, prima della sua disseminazione su tutto il livello regionale.

Sarà garantito un "ritorno di conoscenza" ad ogni Regione partecipante e al sistema nazionale anche attraverso l'organizzazione di convegni, workshop e corsi.

### **Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare (OEC)**

Obiettivi: descrivere la distribuzione dei fattori di rischio, la prevalenza di condizioni a rischio e delle malattie cardio-cerebrovascolari per le quali è necessario intervenire in termini preventivi, diagnostici, terapeutici e assistenziali, e studiare gli andamenti temporali su campioni rappresentativi della popolazione di età 35-79 anni. Entro il 2012 sarà arruolato un campione di 9.020 individui di età compresa fra 35 e 79 anni (un campione di 220 persone ogni milione e mezzo di abitanti, almeno un campione per regione). Vengono raccolte informazioni anagrafiche, abitudini e stili di vita (alimentazione, attività fisica, abitudine al fumo), anamnesi patologica remota, terapie in atto, ricorso ai servizi sanitari con particolare

riguardo ai ricoveri ospedalieri, familiarità per cardiopatia coronarica, accidenti cerebrovascolari, diabete, ipertensione e ipercolesterolemia. Vengono eseguiti gli esami ematochimici (colesterolemia totale e HDL, trigliceridemia e glicemia), le misure antropometriche (peso, altezza, circonferenza della vita e dei fianchi), la misurazione della pressione arteriosa, l'esecuzione di un elettrocardiogramma, e la raccolta delle urine delle 24 ore per la determinazione del consumo alimentare di sodio, potassio, iodio.

Vengono conservati campioni biologici delle persone arruolate (siero, plasma, *buffy coat*, emazie impacchettate e urine) presso la banca di campioni biologici del CNESPS.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Stima della distribuzione dei fattori di rischio cardiovascolare, della prevalenza delle condizioni a rischio e della prevalenza delle malattie cardio-cerebrovascolari nella popolazione italiana; studio delle differenze per macroaree geografiche; valutazione dell'andamento temporale della frequenza dei fattori di rischio cardiovascolare, della prevalenza delle condizioni a rischio e delle malattie cardio-cerebrovascolari acute e croniche.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La stessa indagine condotta nel 1998-2002 è stata in questi anni il punto di riferimento italiano per le malattie cardio-cerebrovascolari, per le metodologie e procedure standard adottate nella esecuzione delle misurazioni e nella raccolta dei dati. Utilizzando i dati raccolti nelle due indagini è possibile studiare l'andamento nel tempo della distribuzione dei fattori di rischio, la prevalenza delle condizioni a rischio e delle malattie cardio-cerebrovascolari nella popolazione adulta italiana. I dati raccolti nel 2008-2012 saranno pubblicati e disponibili nel sito web del progetto CUORE per età e sesso, per singole regioni, per macro-aree e per l'Italia nel suo complesso ([www.cuore.iss.it](http://www.cuore.iss.it)) e per sottogruppi, quali livelli socio-economici, anziani, donne in menopausa, migranti.

### **Osservatorio Nazionale sull'Impiego dei Medicinali (OsMed)**

L'Osservatorio Nazionale sull'impiego dei medicinali (OsMed) si propone come punto di riferimento per la raccolta e analisi dei dati relativi al consumo dei farmaci in Italia e in quanto tale anche come strumento per la programmazione sanitaria in questo ambito.

La conoscenza infatti dei volumi, dei contenuti e delle dinamiche della prescrizione farmaceutica è la condizione necessaria per inquadrare in un contesto razionale la politica del farmaco anche sotto il profilo della valutazione della spesa sanitaria pubblica.

Più in particolare le analisi riguardano:

- l'analisi sistematica dei consumi;
- la valutazione del corretto uso dei farmaci (appropriatezza);
- la valutazione dell'efficacia degli interventi regolatori;
- lo sviluppo di modelli previsionali sull'andamento dei consumi e della spesa.

L'attività è finalizzata alla produzione dei rapporti nazionali, annuali e periodici, che rendono disponibili in maniera continuativa i dati sull'uso dei farmaci in Italia nella popolazione generale, descritti in termini di spesa, volumi e tipologia. Le analisi di questi dati offrono anche spunti per correlare la prevalenza delle patologie nel territorio con il corrispondente utilizzo dei farmaci.

In questo ambito vi è anche l'attività di sviluppo di modelli econometrici previsionali sull'andamento della spesa farmaceutica in Italia.

#### **Risultati attesi nel triennio**

L'OsMed ha finora pubblicato otto Rapporti annuali sull'uso dei farmaci in Italia (2000-2007) che si aggiungono ai rapporti brevi che periodicamente aggiornano i dati di consumo e

di spesa farmaceutica (<http://www.ministerosalute.it/medicinali/osmed/osmed.jsp>), consolidando così il ruolo di servizio di informazione di riferimento nazionale sulla prescrizione dei farmaci in Italia.

La periodicità e la sistematicità di pubblicazione, le analisi condotte a livello nazionale e regionale, per categoria terapeutica e principio attivo, l'approfondimento della prescrizione farmaceutica a livello di popolazione rendono l'OsMed un punto di riferimento per tutti gli operatori sanitari, dai medici ai farmacisti, ai responsabili regionali. Tutto ciò è stato reso possibile grazie all'aggregazione di persone e strutture dotate di particolare competenza di farmacoepidemiologia e farmacoconomia, e alla razionalizzazione e l'armonizzazione dei diversi flussi informativi oggi esistenti in Italia. Questa attività si è concretizzata nella realizzazione, a cura dell'Osservatorio, di una risorsa integrata di dati (*datawarehouse*), che è stata utilizzata quale base di conoscenza per molte decisioni regolatorie adottate dall'AIFA, quali le revisioni del Prontuario Farmaceutico nazionali avvenute in questi ultimi anni.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le analisi fornite dai dati OsMed sono di supporto alle decisioni regolatorie e al governo dell'area farmaceutica in stretta connessione con l'attività dell'AIFA).

L'analisi per singole molecole e per gruppi terapeutici, che costituisce uno degli elementi caratterizzanti dei rapporti dell'OsMed, si presta inoltre a costituire una base di conoscenza importante per poter correlare la prevalenza delle patologie nel territorio con il corrispondente utilizzo dei farmaci e interpretare i fattori principali che possono influenzarne la variabilità.

### **Piano di formazione per gli operatori delle *stroke unit*, per la prevenzione e per la gestione integrata con gli MMG**

Nonostante le molte evidenze scientifiche a sostegno della prevenzione attraverso gli stili di vita, dell'efficacia di farmaci e modalità organizzative per la gestione e la cura dei pazienti ad elevato rischio e della prevenzione delle recidive in coloro che hanno già avuto un evento, vi è una evidente difficoltà da parte dell'SSN e regionale a trasferire nella pratica clinica tali evidenze. Tra le innumerevoli cause di tale fenomeno, un posto di rilievo è occupato dalla inadeguatezza culturale e dalla disinformazione degli operatori sanitari e dei cittadini. Obiettivo dello studio è quello di realizzare un piano di formazione per la prevenzione delle recidive coronariche e cerebrovascolari ad integrazione del piano di formazione degli MMG sull'uso della carta del rischio per la valutazione del rischio cardio-cerebrovascolare in modo che la prevenzione primaria e secondaria diventino parte integrante nella formazione degli MMG. La formazione degli operatori delle *stroke unit* è in una fase preliminare; esistono esperienze di formazione realizzate da alcuni gruppi di ricerca, ma ancora oggi non esistono definizioni standardizzate delle procedure e non esiste un modello di facile utilizzo e facilmente replicabile nelle varie regioni italiane; pertanto è estremamente importante coagulare le professionalità di questo settore per costruire insieme un modello e dei manuali per l'addestramento degli operatori delle *stroke unit*.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Pubblicazione di un manuale di integrazione della Guida formativa per la prevenzione secondaria dell'ictus (realizzato dalla regione Emilia Romagna) e del Manuale sull'uso e applicazione della carta del rischio cardiovascolare (realizzato dal Reparto di epidemiologia delle malattie cerebro e cardiovascolari del CNESPS) per la prevenzione primaria e secondaria delle malattie cardio-cerebrovascolari e per la gestione integrata dei pazienti con ictus e infarto del miocardio da offrire nei corsi di formazione agli MMG.

### **Trasferibilità dei risultati**

Manuali sulla prevenzione primaria e secondaria delle malattie cardio-cerebrovascolari e sulla gestione integrata dei pazienti con ictus e infarto del miocardio da offrire ai medici di medicina generale durante i corsi di formazione organizzati dalle Regioni e dalle Associazioni della Medicina Generale. Manuali di formazione per gli operatori sanitari che lavorano nelle *stroke unit*.

### **Piccoli+. Arruolamento e sorveglianza epidemiologica di una coorte nazionale di nati. Allestimento della banca biologica dello studio**

Il progetto si articola nell'arruolamento, nella raccolta di materiale biologico e nel follow-up per il primo anno di vita di una coorte di 2.000 nati. L'arruolamento e monitoraggio prospettico della coorte è funzionale a identificare aspetti critici su cui promuovere interventi di prevenzione di provata efficacia, mentre la creazione di una banca biologica è utile ad una successiva identificazione di markers di malattie ad occorrenza tardiva o a considerare ipotesi eziologiche/valutative che potranno essere valutate appieno sulla base di conoscenze disponibili in futuro.

Obiettivi generali dello studio:

- arruolare una coorte nazionale di nati residenti in quattro città italiane (Torino, Trieste, Firenze, Roma) da seguire prospetticamente fino ad un anno di età;
- creare una banca biologica di campioni dei nati arruolati e delle loro mamme;
- stimare, attraverso una sorveglianza prospettica, la frequenza di fattori personali e ambientali predittivi per la salute del bambino nonché l'incidenza nel primo anno di vita di condizioni morbose ad elevata frequenza;
- eseguire analisi preliminari per la stima della frequenza di fattori predittivi e dell'incidenza delle più frequenti patologie infantili.

Il Reparto di Epidemiologia genetica del CNESPS contribuirà al raggiungimento di tutti gli obiettivi del progetto, ma avrà un ruolo leader rispetto al secondo obiettivo.

### **Risultati attesi nel triennio**

Verranno raccolti, al momento dell'arruolamento subito dopo il parto in ospedale, un campione di sangue cordonale e un campione di sangue della madre. Lo stoccaggio dei campioni avverrà presso la banca biologica del CNESPS. Il CNESPS ha una consolidata esperienza nella gestione di studi e sistemi di sorveglianza che prevedano la raccolta, la conservazione e l'utilizzo di campioni biologici.

### **Trasferibilità dei risultati**

Lo sviluppo di una serie di biomarcatori standardizzati potrebbe aiutare il pediatra nell'attuazione di politiche di prevenzione, nella diagnosi e anche nella cura di alcune patologie e/o disabilità. In termini di trasferibilità dei risultati va detto che spesso per i genitori o per lo stesso pediatra è difficile accertare accuratamente l'esposizione del singolo bambino a sostanze ambientali nocive.

Un sistema standardizzato di reclutamento comprendente note e consensi specifici, e modalità di anonimizzazione dei dati/campioni potrà essere prototipo trasferibile come risultato e utilizzabile poi nei sistemi locali di biobanking, tenuto conto dell'ultimo documento della Presidenza del Consiglio (gruppi CBBSV e CNB) del 2009 sul consenso informato per le banche biologiche che propone una "rosa" di possibili consensi a seconda delle finalità da raggiungere e quindi di una certa variabilità di procedure attualmente esistente nella realtà italiana.

### **Prevenzione e intervento precoce per il rischio di depressione post partum (DPP)**

Il progetto intende applicare e valutare la fattibilità nella pratica dei servizi italiani di un intervento psicologico di gruppo di prevenzione e intervento precoce per la DPP di provata efficacia sperimentale e nella pratica dei servizi di altre nazioni, in termini di remissione dei sintomi depressivi delle puerpere, aumento del benessere, miglioramento del funzionamento sociale, miglioramento della relazione madre-bambino.

Obiettivi specifici:

- Mettere a punto modalità di sensibilizzazione e informazione delle donne a rischio e dei loro familiari sulla importanza del disturbo in questione e sull'opportunità di un intervento precoce.
- Mettere a punto modalità di individuazione delle donne affette da DPP mediante interventi di screening praticabili e accettabili nella realtà italiana.
- Verificare la fattibilità nella realtà italiana di un intervento per la DPP di provata efficacia sperimentale.
- Favorire la sinergia fra Dipartimento di Salute Mentale, Dipartimento Materno-Infantile, Pediatri di base e altri attori coinvolti nei distretti sanitari.
- Ottenere stime della prevalenza della DPP nei distretti coinvolti e studiare alcune associazioni, ad esempio con l'età, lo stato civile, lo stato socio-economico, con le condizioni di salute degli altri componenti della famiglia.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto si riferisce ad un intervento già condotto in contesti diversi con campioni molto numerosi, permetterà di valutare l'applicabilità dello screening e dell'intervento nella realtà italiana e già durante lo studio di trasferire una metodologia innovativa presso i servizi coinvolti.

Alla fine del progetto, tutte le Unità Operative potranno confrontarsi sulla base di uno stesso modello di screening e di intervento. In itinere, potranno essere reclutate altre unità collaborative interessate ad applicare l'intervento, anche se i loro risultati saranno disponibili in un secondo tempo.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'applicazione del metodo di *screening* e di intervento potrà essere diffusa anche ad altre Regioni d'Italia.

Si prevede la diffusione dei risultati online e la pubblicazione su riviste scientifiche.

Si prevede di organizzare un convegno finale per la presentazione dei risultati.

### **Prevenzione e intervento precoce per il rischio di DPP**

Valutazione della fattibilità nella pratica di un intervento psicologico di prevenzione delle complicanze e intervento precoce della DPP e valutazione della sua efficacia.

In una prima fase verrà realizzato un coordinamento tra operatori dei Dipartimenti di Salute Mentale coinvolti nel progetto.

La seconda fase è quella di screening. Tutte le donne verranno informate sull'intervento e verrà chiesta la loro disponibilità a compilare un breve questionario di screening, l'*Edinburgh Postpartum Depression Scale* (EPDS), più altri strumenti di valutazione, *Short Form Health Survey-12* F12- e Ryff's PWBS, durante le visite di controllo nell'ospedale dove hanno partorito.

La terza fase prevede l'invito a tutte le donne che risulteranno positive allo screening a un approfondimento diagnostico mediante l'intervista strutturata SCID (Intervista Clinica Strutturata per i Disturbi di Personalità). Alle donne, per le quali sia stata confermata la

diagnosi, verrà proposto l'intervento o l'invito a servirsi degli specialisti nei servizi nel caso la donna abbia disturbi psicotici in atto o dipendenza da sostanze o grave depressione con rischio di suicidio o pericoli imminenti di danni fisici.

La quarta fase è l'effettuazione dell'intervento.

La quinta e ultima fase prevede la valutazione mediante ri-somministrazione dello strumento di screening e degli altri strumenti, sia a conclusione dell'intervento che dopo sei mesi dalla sua conclusione.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Conoscere alcuni dati riguardanti l'efficacia nella pratica dei servizi dell'intervento psicologico di trattamento precoce della DPP, a partire da quello messo a punto da Milgrom (Milgrom *et al. Br J Clin Psychol* 2005;44:529-42) e sviluppare materiale informativo per l'adozione dell'intervento nella routine dei servizi italiani.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto permetterà di valutare l'applicabilità dello screening e dell'intervento nella realtà italiana e già durante lo studio di trasferire una metodologia innovativa presso i servizi coinvolti.

Alla fine del progetto, tutte le Unità Operative potranno confrontarsi sulla base di uno stesso modello di screening e di intervento. In itinere, potranno essere reclutate altre unità collaborative interessate ad applicare l'intervento, anche se i loro risultati saranno disponibili in un secondo tempo.

L'applicazione del metodo di screening e di intervento potrà essere diffusa anche ad altre Regioni d'Italia.

### **Prevenzione delle Interruzioni Volontarie di Gravidanza (IVG) effettuate da donne straniere**

Come conseguenza dell'aumento della popolazione immigrata negli ultimi 20 anni, si è osservato anche un incremento del numero di IVG effettuate da donne straniere (38.309 nel 2009 rispetto a 10.131 nel 1996). Questo valore corrisponde attualmente a un terzo di tutte le IVG effettuate in Italia.

Al fine di sostenere la procreazione cosciente e responsabile ed evitare il ricorso all'IVG, il CCM/Ministero della Salute ha promosso e finanziato un progetto, coordinato dalla regione Toscana a cui l'ISS partecipa come UO che si basa su:

- offerta attiva alle donne immigrate di *counselling* sulla fisiologia e sui metodi per la procreazione responsabile, attraverso specifici interventi di sanità pubblica che puntano sulla consapevolezza delle donne e sull'erogazione di prestazioni socio sanitarie integrate;
- riorganizzazione dei servizi attraverso la rimozione delle barriere d'accesso organizzative, burocratico-amministrative e culturali anche attraverso la formazione degli operatori sulle normative vigenti e sulle diversità culturali, al fine di aumentare l'accesso delle donne straniere ai servizi stessi;
- formazione degli operatori.

Le azioni saranno condotte in stretta collaborazione con le comunità dei migranti.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio:

- formazione degli operatori socio-sanitari finalizzata ad approcci interculturali per la tutela della salute sessuale e riproduttiva (in particolare contraccezione e prevenzione IVG);

- definizione e sperimentazione di percorsi organizzativi che favoriscano l'accessibilità e l'utilizzo dei servizi da parte delle donne immigrate e possano aiutare nella prevenzione all'IVG;
- promozione di una diffusa e capillare informazione per la popolazione immigrata finalizzata alla tutela della salute sessuale e riproduttiva, alla prevenzione dell'aborto e alla diffusione delle misure a sostegno della maternità e di prevenzione dell'abbandono dei neonati.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il pacchetto formativo prodotto potrà essere utilizzato per la formazione a cascata nelle regioni partecipanti al progetto e potrà essere utilizzato anche nelle altre regioni. Anche i percorsi organizzativi che avranno successo saranno presentati alle altre regioni e potranno da loro essere implementati. Il materiale informativo prodotto verrà valutato e reso disponibile a tutte le Regioni italiane

### **Progetto CA.ME.LI.A – Studio di popolazione sulle interazioni tra malattie cardiovascolari, sindrome metabolica, malattie di fegato e autoimmunità**

Il presente progetto si focalizza su tre patologie strettamente correlate, espressione di uno stato di infiammazione cronica: la sindrome metabolica, l'epatopatia steatosica e l'autoimmunità. Tale progetto oltre a proporsi una maggiore conoscenza eziopatologica delle singole condizioni è interessato a studiare come i diversi quadri clinici abbiano aspetti patogenetici comuni o coesistano nello stesso individuo. Alcuni tra i fattori di rischio proposti, inoltre, sono potenzialmente reversibili e costituiscono l'oggetto principale dell'intervento medico. È necessario sottolineare come nei soggetti obesi o insulino-resistenti lo spettro di presentazione dei fattori metabolici di rischio dipenda sia dal singolo individuo sia dall'etnia di appartenenza. Tale progetto intende pertanto confrontare una popolazione rappresentativa dell'Italia settentrionale con una rappresentativa dell'Italia meridionale. A tale proposito nell'ambito di uno studio a disegno trasversale sono stati reclutati campioni di soggetti tra i 18 e i 75 anni rappresentativi delle popolazioni di Abbiategrasso in Lombardia e Cittanova in Calabria. Il progetto si propone inoltre di studiare alcuni marcatori biochimici innovativi mediante la determinazione della prevalenza di frazioni di Gamma-GlutamilTransferasi sierica (GGT), Cromogranina A (CgA) e *High Mobility Group Box 1* (HMGB1) e la loro associazione con danno aterosclerotico precoce.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Determinazione della prevalenza dei fattori di rischio metabolici, infiammatori e autoimmunitari per il danno aterosclerotico e loro associazione con il danno aterosclerotico.

Determinazione della prevalenza dei fattori di rischio metabolici, infiammatori, autoimmunitari, virali e di consumo di alcool nel concorrere all'insorgenza di epatopatie croniche.

Determinazione della prevalenza di frazioni di GGT, CgA e HMGB1 e la loro associazione con danno aterosclerotico precoce.

Costituzione di una banca biologica comprendente campioni di siero e plasma dei soggetti partecipanti allo studio, che permetterà anche di determinare, nel corso o dopo la fine dello studio, la prevalenza di marcatori biochimici di rilevanza emergente.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Caratterizzazione a livello nazionale dello spettro clinico della sindrome metabolica e determinazione della prevalenza e modalità di aggregazione e di interazione dei diversi fattori metabolici con l'obiettivo finale di verificare a livello italiano la validità dei criteri utilizzati per la diagnosi di sindrome metabolica.

Chiarimento circa il modello più adatto da applicare alla sindrome metabolica così da poter intervenire sulla gravidanza, sulle abitudini di vita, o farmacologicamente nel modo più appropriato.

Inoltre, essendo questo progetto indirizzato ad una popolazione generale, i risultati saranno ampiamente rappresentativi.

### **Progetto CUORE – Studio longitudinale: aggiornamento della carta del rischio cardiovascolare**

Nell'ambito del Progetto CUORE, nel 1998 è stato costruito un database dei fattori di rischio cardiovascolare di studi longitudinali iniziati negli anni '80 e realizzato il follow-up della mortalità e morbosità cardiocerebrovascolare. Con questo database è stato possibile costruire la funzione di rischio per la predizione a dieci anni degli eventi cardiovascolari nella popolazione italiana adulta sulla base dei seguenti fattori di rischio: sesso, età, presenza di diabete, abitudine al fumo, pressione arteriosa sistolica, colesterolemia totale e HDL, terapia antipertensiva. Questa funzione è stata pubblicata dal Gruppo di Ricerca del Progetto CUORE nel 2004 e da allora il suo utilizzo è entrato a far parte della pratica clinica.

L'obiettivo di questo progetto è quello di svolgere analisi statistiche volte alla realizzazione di una nuova funzione per la stima del rischio cardio-cerebrovascolare nella popolazione adulta italiana includendo coorti esaminate più di recente e aggiornare gli strumenti da essa derivati.

Il database sul quale vengono effettuate le analisi statistiche di questo progetto ha come base di partenza quello del Progetto CUORE utilizzato per la pubblicazione della funzione del rischio nel 2004 (circa 20.000 uomini e donne di età compresa tra i 35 e i 69 anni arruolate dalla metà degli anni '80 alla metà degli anni '90) aggiornato attraverso l'inclusione di nuove coorti e l'aggiornamento del follow-up degli eventi fatali e non fatali cardio-cerebrovascolari.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Le attività del Progetto si realizzano attraverso:

- Inclusione di nuove coorti. In collaborazione con altri progetti di ricerca condotti nel reparto è possibile ampliare il database con le coorti dell'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare con linea base 1998-2002 (coorte di circa 10.000 uomini e donne di età compresa tra i 35-74 anni arruolate alla fine degli anni '90).
- Follow-up della popolazione. È previsto l'aggiornamento del follow-up delle coorti per la valutazione dello stato in vita e la raccolta degli eventi coronarici e cerebrovascolari fatali e non fatali e per la mortalità totale e specifica per causa. Tutte le persone esaminate hanno dato al momento dell'arruolamento il consenso per essere seguite nel tempo.
- Analisi statistica: valutazione del ruolo predittivo dei fattori di rischio cardio-cerebrovascolari in relazione al follow-up aggiornato degli eventi e all'allargamento della fascia di età considerata (35-74 anni anziché 35-69 anni). In particolare le analisi saranno volte alla realizzazione della funzione di rischio per la stima del rischio cardio-cerebrovascolare nella popolazione italiana adulta.
- Aggiornamento della carta del rischio e del punteggio individuale per la predizione del rischio cardiocerebrovascolare a dieci anni in uomini e donne, diabetici e non diabetici, esenti da un precedente evento cardiovascolare.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'obiettivo a breve termine del progetto è l'aggiornamento di carte e punteggio per la valutazione del rischio cardio-cerebrovascolare attraverso l'allungamento del follow-up,

l'introduzione di una coorte recente e l'introduzione di un quinquennio di età in più (69-74 anni). Tali strumenti sono introdotti nella pratica clinica dei medici di medicina generale, dei cardiologi e di altri operatori sanitari.

Gli obiettivi a lungo termine dell'introduzione nella pratica clinica di strumenti aggiornati per la valutazione del rischio sono: il cambiamento dello stile di vita tra gli individui ad alto rischio e nella popolazione generale, l'eliminazione delle disuguaglianze regionali e la riduzione dell'incidenza delle patologie cardiocerebrovascolari.

### **Progetto CUORE – Studi longitudinali: nuovi fattori di rischio**

Nell'ambito del Progetto CUORE, nel 1998 è stato costruito un database dei fattori di rischio cardiovascolare di alcuni studi longitudinali iniziati fra la metà degli anni '80 e la metà degli anni '90 e realizzato il follow-up della mortalità e morbosità cardio-cerebrovascolare. L'obiettivo di questo progetto è quello di svolgere analisi statistiche per la valutazione della predittività di nuovi fattori di rischio (creatininemia, trigliceridemia, indice di massa corporea, familiarità per malattie cardiovascolari, frequenza cardiaca).

Le analisi statistiche che hanno portato alla costruzione della funzione di rischio per la predizione del rischio cardiovascolare a dieci anni, pubblicata nel 2004 avevano evidenziato una significatività statistica per alcune di esse quando considerate come fattori singoli, ma non quando combinate con altri fattori di rischio. Tale perdita di significatività ha portato all'esclusione di queste variabili dalla funzione di rischio.

Il database sul quale vengono effettuate le analisi statistiche di questo progetto ha come base di partenza quello utilizzato dal Gruppo di Ricerca del Progetto CUORE per la pubblicazione della funzione del rischio nel 2004 (20.000 uomini e donne di età compresa tra i 35 e i 69 anni arruolate dalla metà degli anni '80 alla metà degli anni '90) aggiornato sia in termini di follow-up degli eventi fatali e non fatali cardio-cerebrovascolari che attraverso l'introduzione di coorti di popolazione esaminate più recentemente.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Le attività del Progetto si realizzano attraverso:

- Inclusione di nuove coorti: verranno incluse le coorti dell'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare e HES con linea base 1998-2002 e 2008-2012 (l'esame della popolazione è ancora in corso, coorte di circa 9000 uomini e donne di età compresa tra i 35-79 anni).
- Follow-up della popolazione. È previsto l'aggiornamento del follow-up delle coorti per la valutazione dello stato in vita e la raccolta degli eventi coronarici e cerebrovascolari fatali e non fatali e per la mortalità totale e specifica per causa. Tutte le persone esaminate hanno dato al momento dell'arruolamento il consenso per essere seguite nel tempo.
- Analisi statistica: valutazione del potere predittivo delle nuove variabili, del ruolo predittivo di quelle tradizionali in relazione al follow-up aggiornato degli eventi, nonché allargamento della fascia di età considerata (35-74 anni anziché 35-69 anni). In particolare le analisi saranno volte alla valutazione della introduzione dei nuovi fattori nelle funzioni di rischio per la stima del rischio cardio-cerebrovascolare nella popolazione italiana.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'obiettivo a breve termine del progetto è lo sviluppo di strumenti aggiornati per la valutazione del rischio cardio-cerebrovascolare attraverso l'introduzione di coorti recentemente esaminate, che rispecchiano quindi le caratteristiche attuali della popolazione italiana, l'introduzione di un quinquennio di età in più (69-74 anni) rispetto alle analisi

precedenti e l'introduzione di nuovi fattori di rischio. Tali strumenti potranno aggiornare quelli già introdotti nella pratica clinica dei medici di medicina generale, dei cardiologi ed di altri operatori sanitari.

Gli obiettivi a lungo termine dell'introduzione nella pratica clinica di strumenti aggiornati per la valutazione del rischio sono: il cambiamento dello stile di vita tra gli individui ad alto rischio e nella popolazione generale, l'eliminazione delle disuguaglianze regionali e la riduzione dell'incidenza delle patologie cardiovascolari.

### **Progetto IGEA – Integrazione, Gestione e Assistenza per la malattia diabetica**

L'emergenza della cronicità, diabete in particolare, pone il sistema-salute di fronte a nuove sfide che richiedono una revisione critica dei modelli assistenziali e agire professionale. Esigenze che richiedono risposte formative adeguate e innovative, che coinvolgano professionisti e cittadini nell'identificazione e realizzazione di nuove strategie d'intervento condivise. Verrà definito un modulo formativo per la promozione delle competenze delle persone con diabete e loro caregiver nell'autogestione della malattia rivolto in forma multidisciplinare agli operatori coinvolti nella gestione integrata con la partecipazione di rappresentanti delle associazioni di pazienti.

Necessaria la definizione di mappa concettuale degli scambi informativi per la realizzazione di percorsi assistenziali definiti sulla base di diversi possibili "strati" di rischio.

La valutazione economica è parte integrante della valutazione di efficacia ed efficienza del modello di gestione integrata del diabete. Verrà definito un set di indicatori per la valutazione dei costi relativi all'assistenza ai pazienti diabetici, quale presupposto a più complete valutazioni economiche.

A supporto di un coordinamento tra tutte le attività che possano essere ricondotte a progetti sulla gestione integrata del diabete, verrà predisposto un "toolkit informativo", cioè uno strumento per raccogliere, sistematizzare, mettere in comune e diffondere il know-how, confrontare esperienze e predisporre nuovi interventi.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Miglioramento dell'adesione alle linee guida e riduzione degli esiti sanitari a breve termine e a lungo termine valutati attraverso indicatori di processo e di esito.
- Promozione delle competenze delle persone con diabete nell'autogestione della malattia attraverso la progettazione e validazione di un percorso formativo rivolto agli operatori e ai diversi attori coinvolti nella gestione integrata.
- Definizione di un set di indicatori per la valutazione dei costi relativi all'assistenza quale presupposto di valutazioni economiche dell'attività di gestione integrata del diabete.
- Definizione di una mappa concettuale degli scambi informativi necessari alla realizzazione di percorsi assistenziali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- Pubblicazione di report sulle attività dello studio.
- Spazio web dedicato alla gestione integrata del diabete rivolto sia ai professionisti sia ai pazienti.
- Validazione di un percorso formativo per la promozione delle competenze delle persone con diabete e dei loro caregiver e pubblicazione di un manuale didattico.
- Pubblicazione di un documento di indirizzo per la realizzazione di percorsi assistenziali definiti sulla base di diversi possibili "strati" di rischio.

- Organizzazione di seminari di aggiornamento e di convegni annuali sulla gestione integrata della patologia diabetica.
- Relazioni a convegni e pubblicazioni scientifiche.

### **Programma aziendale di monitoraggio dei consumi e della spesa farmaceutica territoriale**

Il progetto è relativo a un'analisi della prescrizione nella ASL di Salerno. A partire dai dati raccolti dal sistema di monitoraggio delle prescrizioni è possibile condurre analisi a livello di ASL, di medico e di utilizzatori, fornendo spunti di riflessione agli operatori sanitari che si occupano di farmaci. L'analisi della variabilità e delle discrepanze fra caratteristiche della prescrizione osservata e livelli attesi in base alla frequenza delle patologie consentono di individuare le aree prioritarie per avviare interventi di modifica dei comportamenti prescrittivi. La promozione dell'uso appropriato dei farmaci, così come un utilizzo più razionale di tutti gli interventi sanitari, oltre al contenimento della spesa sanitaria sprechi consente di ridurre i rischi inutili ai quali sono sottoposti i cittadini. Vi è poi la necessità di chiarire in modo sempre più approfondito il profilo beneficio-rischio dei farmaci dopo l'approvazione all'immissione in commercio. L'obiettivo generale della collaborazione tra ISS e ASL di Salerno è quello di promuovere, in coerenza con le altre iniziative avviate dal servizio farmaceutico, l'appropriatezza della prescrizione farmaceutica e di migliorare le conoscenze relative al profilo di beneficio-rischio dei farmaci.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi consistono in:

- Analisi della prescrizione di farmaci e predisposizione di rapporti periodici della prescrizione farmaceutica territoriale (a livello di distretto e medico) e ospedaliera da utilizzare nell'ambito di interventi di audit. In particolare, si prevede di: approfondire l'analisi sull'uso dei farmaci in alcune sottopopolazioni (per es. bambini, anziani, pazienti con diabete o altre patologie); analizzare l'appropriatezza della prescrizione per specifiche categorie terapeutiche di maggiore interesse nella popolazione; e valutare la variabilità dei comportamenti prescrittivi.
- Conduzione di studi di farmacoepidemiologia tesi a verificare i segnali di possibili associazioni fra uso dei farmaci e esiti clinici, anche attraverso record-linkage tra gli archivi della prescrizione farmaceutica e specialistica e quelli dei ricoveri ospedalieri.
- Analisi della prescrizione di prestazioni specialistiche ambulatoriali.
- Collaborazione con le strutture aziendali alla realizzazione di interventi di audit sull'uso appropriato dei farmaci, quali ad esempio il trattamento dell'asma nella popolazione pediatrica.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati della collaborazione scientifica consentiranno di sviluppare dei modelli per l'analisi della variabilità geografica e temporale e la verifica dei segnali di possibili reazioni avverse associate all'uso dei farmaci e vaccini. Inoltre, l'approfondimento dell'uso dei farmaci nella popolazione potrà essere di supporto nel caso di adozione di provvedimenti regolatori e l'accesso a fonti dati essenziali per la conduzione di studi epidemiologici.

### **Programma d'informazione e comunicazione a sostegno degli obiettivi del programma Guadagnare Salute DPCM 4/5/2007**

Secondo la strategia del programma Guadagnare Salute i fattori di rischio vanno affrontati in modo globale, integrando le azioni che competono alla collettività con quelle

che competono alla responsabilità individuale (approccio intersettoriale). In tale prospettiva la comunicazione riveste un ruolo di primaria importanza, perché diventa componente integrante degli interventi di prevenzione e strumento per la promozione della salute. Il progetto “Programma di informazione e comunicazione a sostegno degli obiettivi del programma Guadagnare Salute” (PinC), che scade il 29/7/2012, sostiene Guadagnare Salute attraverso iniziative di formazione e comunicazione rivolte alla popolazione generale, a target specifici, agli operatori sanitari e a soggetti che, a diverso titolo, possono avere un ruolo nella promozione della salute. PinC valorizza le informazioni provenienti dai sistemi di sorveglianza della popolazione per l’elaborazione di messaggi efficaci finalizzati alla promozione di stili di vita salutari. L’obiettivo generale è attivare processi di consapevolezza e di empowerment per scelte di vita salutari sia a livello individuale che a livello di comunità. Coerentemente con l’approccio partecipativo la progettazione del piano di comunicazione si propone di raggiungere in modo capillare, a livello nazionale, regionale e locale, molteplici soggetti (target), con iniziative di comunicazione concordate e integrate.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il piano di comunicazione prevede una fase finalizzata ad aumentare la conoscenza nella popolazione di Guadagnare Salute e una fase orientata a fornire informazioni sui quattro principali fattori di rischio per la salute. Un’analisi delle caratteristiche della popolazione ha orientato le iniziative di comunicazione verso la popolazione generale e verso due target primari quali donne e adolescenti. Gli operatori sanitari e non sanitari (target secondario) sono stati raggiunti con specifici strumenti. Il piano formativo attraverso un approccio *blended* (didattica mista con attività svolte in presenza e a distanza) offre un aggiornamento sia sulle conoscenze disponibili sui 4 fattori di rischio sia sulle competenze comunicativo-relazionali funzionali alla promozione della salute.

È possibile realizzare a livello locale iniziative coerenti con l’approccio di PinC rafforzano la collaborazione tra le istituzioni coinvolte nella promozione della salute; sostenendo le iniziative di confronto e di formazione rivolte a specifici target; consolidando le competenze degli operatori che possono sostenere i cittadini a compiere scelte di vita salutari; pianificando le strategie di comunicazione da adottare a livello territoriale prestando attenzione ai differenti target; promuovendo iniziative sul territorio per sensibilizzare i cittadini sull’importanza di scegliere comportamenti salutari.

### **Trasferibilità dei risultati**

Tale progetto si inserisce in un contesto di attività già esistenti a livello nazionale e internazionale. Esso può costituire un’occasione per accrescere la consapevolezza tra la popolazione sull’importanza delle scelte individuali per favorire la promozione della propria salute e per prevenire patologie croniche legate a fattori di rischio modificabili. Può inoltre favorire la realizzazione di iniziative integrate e intersettoriali che possano facilitare i cittadini per scelte di vita salutari, in quanto i comportamenti ricadono in parte sotto la sfera della responsabilità individuale e in parte sono determinati dall’organizzazione politica e sociale. (salute in tutte le politiche)

## **Programma nazionale Esiti (PNE-2): valutazione degli esiti dell’assistenza ai tumori e delle cure primarie a patologie oncologiche**

La valutazione della performance dell’assistenza ai pazienti con diagnosi di tumore maligno si basa su indicatori sviluppati da società scientifiche o specifici panel che non vengono utilizzati routinariamente da agenzie o SSN. In tale ambito, l’uso dei sistemi informativi sanitari correnti è limitato dall’assenza dell’informazione sullo stadio del tumore, presente invece, almeno su base campionaria, in molti registri tumori. Esperienze

internazionali suggeriscono la possibilità di definire indicatori di esito dei pazienti oncologici sulla base dell'integrazione delle informazioni desumibili dai Sistemi Informativi Sanitari (SIS) correnti. Il progetto si propone la costruzione di un sistema di indicatori per la valutazione della performance dell'assistenza ai pazienti oncologici. Sarà effettuata una valutazione delle potenzialità di utilizzo dei sistemi informativi correnti ospedalieri e ambulatoriali per la caratterizzazione della diagnosi e del trattamento dei tumori. Gli indicatori ottenuti saranno validati con i dati disponibili dai registri tumori.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Elaborazione e validazione di algoritmi per l'identificazione dei pazienti affetti da tumori e per la stima dello stadio alla diagnosi, attraverso l'utilizzo dei SIS correnti, di panel locali e di registri tumori regionali. Definizione di indicatori di qualità dell'assistenza ai pazienti con diagnosi di tumore al fine di avere un quadro di riferimento per la valutazione sistematica degli esiti degli interventi sanitari dell'SSN in campo oncologico, attraverso l'uso di fonti correnti di dati (SDO nazionali). Misurazione della variabilità tra aree territoriali o gruppi di popolazione della qualità dell'assistenza ai pazienti oncologici, individuando aree critiche su cui implementare programmi di miglioramento della qualità dell'assistenza.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Progetto pilota, i cui risultati dovranno essere utilizzati per la valutazione sistematica delle attività dell'SSN.

### **Promozione della salute mentale nella scuola**

Sono proseguiti i lavori di promozione della salute mentale nelle scuole, nell'ambito del Progetto Guadagnare Salute. È stato condotto uno studio controllato dell'impatto del programma di promozione della salute mentale nelle scuole "Definizione di obiettivi e soluzione di problemi". Sono state selezionate 20 classi, fra quelle che si sono rese disponibili per lo studio, e sono state suddivise in modo casuale in due gruppi. Un gruppo di 11 classi ha svolto l'intero programma, mentre l'altro gruppo, di controllo, formato da nove classi, ha svolto solo le prime due sessioni sul riconoscimento e l'espressione delle emozioni, sia positive che negative. Sono stati somministrati a tutti gli studenti coinvolti strumenti per valutare l'efficacia del programma nel produrre cambiamenti migliorativi, all'inizio, alla fine del programma e dopo sei mesi.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Si ritiene, che l'efficacia del programma potrà consentire il miglioramento di quello che sembra essere una delle carenze principali degli adolescenti odierni, ossia la loro scarsa capacità a progettare il loro futuro e la loro tendenza a vivere solo nel presente, senza espliciti obiettivi di crescita personale e di arricchimento della vita sociale.

I risultati preliminari in forma aggregata verranno comunicati nel corso del II Convegno nazionale del programma Guadagnare Salute a Venezia (21-22 giugno 2012).

#### **Trasferibilità dei risultati**

Proprio per l'impostazione scelta (applicazione di un manuale rivolto direttamente agli studenti), l'approccio, se efficace, potrà essere facilmente esteso a tutte le scuole, anche in quelle in cui il corpo docente non sia particolarmente interessato e motivato.

### **Promozione della salute mentale nelle scuole, nell'ambito del programma Guadagnare Salute**

È stato condotto uno studio controllato dell'impatto del programma di promozione della salute mentale nelle scuole "Definizione di obiettivi e soluzione di problemi". Sono state

selezionate 20 classi, fra quelle che si sono rese disponibili per lo studio, e sono state suddivise in modo casuale in due gruppi. Un gruppo di 11 classi ha svolto l'intero programma, mentre l'altro gruppo, di controllo, formato da nove classi, ha svolto solo le prime due sessioni sul riconoscimento e l'espressione delle emozioni, sia positive che negative. Sono stati somministrati a tutti gli studenti coinvolti strumenti per valutare l'efficacia del programma nel produrre cambiamenti migliorativi, all'inizio, alla fine del programma e dopo sei mesi.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati dello studio in forma aggregata verranno comunicati nel corso del II Convegno nazionale del programma Guadagnare Salute a Venezia (21-22 giugno 2012).

Non dovrebbero esserci grosse difficoltà nella diffusione dell'approccio, se questo si sarà dimostrato, come crediamo, efficace. Le difficoltà prevedibili sono minori che con altri approcci, dato che questo approccio non richiede per la sua effettuazione l'intervento attivo di specialisti e soprattutto richiede agli insegnanti solo una attività di supervisione e di valutazione. Le difficoltà comunque ci potranno essere ed essere costituite principalmente da:

- conflitti o gelosie tra istituzioni;
- difficoltà di introduzione sistematica nel curriculum scolastico;
- resistenze da parte di psicologi e dirigenti scolastici con un diverso approccio teorico e poco interessati alla valutazione scientifica degli interventi.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Esiste già un manuale per studenti del programma che potrebbe essere adottato dalle scuole e dagli uffici scolastici nell'ambito di iniziative di diffusione a livello provinciale.

### **Registro nazionale degli Accidenti Cerebrovascolari (ACV)**

È un registro di popolazione, che, diversamente da un registro ospedaliero, include tutti gli eventi di una popolazione residente in un'area definita, fatali e non fatali, ospedalizzati o meno. La raccolta e la validazione degli eventi seguono una metodologia standardizzata, che recepisce le raccomandazioni proposte dal progetto europeo EUROCISS, per consentire il confronto nel tempo tra diverse aree o Paesi.

Dati routinari di mortalità (codici ICD-9 342, 430-434, 436-438 in causa principale; codici 250, 401-404, 427, 440 in causa principale solo se accompagnati da 342, 430-434, 436-438 in causa secondaria) e diagnosi di dimissione ospedaliera (codici ICD-9 342, 430-434, 436-438) vengono appaiati per selezionare gli ACV sospetti. Il numero di ACV occorsi nella popolazione sotto sorveglianza e quindi i tassi vengono stimati sulla base di un campione di 1.000 ACV validati selezionati in modo casuale per area nel biennio.

Il Registro attivato per il biennio 2004-05 utilizzerà i criteri diagnostici MONICA e raccoglierà informazioni relative alla anamnesi per ipertensione arteriosa, diabete, precedenti ACV, alle terapie al momento del ricovero, alla presenza di segni e sintomi all'attacco, all'esito della visita neurologica, ai reperti relativi a puntura lombare, angiografia cerebrale, TAC, RMN, EEG. Ciò servirà ad introdurre classificazioni più esaustive per i sottotipi e a valorizzare strumenti standardizzati per la valutazione della gravità e della disabilità.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto ha l'obiettivo di stimare l'occorrenza di ACV in aree geografiche definite, rappresentative del Paese, e in particolare di calcolare per genere e fascia di età 35-74 anni:

- tassi di incidenza e di attacco degli ACV maggiori;
- tassi di letalità per ACV maggiori;
- frequenza di utilizzo di procedure diagnostiche e terapeutiche in fase acuta.

I tassi di attacco e di letalità saranno stimati sia in base alla identificazione degli eventi secondo i criteri tradizionali MONICA, in modo da costruire un trend temporale con il Registro 1998-99.

Durante il triennio verrà sviluppato un sistema di controllo di qualità del registro estremamente importante per un valido monitoraggio e confronto degli eventi tra diverse Regioni o Paesi.

Verranno elaborati e prodotti due software, uno per l'appaiamento dei dati di mortalità e diagnosi di dimissione ospedaliera, l'altro per la validazione semiautomatica degli ACV sia secondo i criteri MONICA che secondo i nuovi livelli di severità definiti.

Per un valido monitoraggio e confronto degli eventi tra diverse regioni o paesi, viene valutata la qualità del registro che dipende da completezza dei casi e delle informazioni relative, validità interna e validità esterna.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il Registro fornisce un'immagine globale della malattia nella comunità, evidenzia le aree problematiche e suggerisce dove è maggiormente necessario migliorare i servizi per il trattamento, è rivolto ai professionisti della salute e agli amministratori e fornisce le basi per comprendere le caratteristiche e il peso della malattia e le conseguenze della malattia nella popolazione attraverso:

- monitoraggio dell'occorrenza della malattia;
- interpretazione delle differenze e dei cambiamenti nella dinamica naturale della malattia tra sessi, fasce di età, classi sociali, gruppi etnici;
- identificazione dei gruppi vulnerabili;
- monitoraggio della letalità intra ed extra ospedaliera;
- valutazione delle relazioni tra occorrenza, letalità e mortalità della malattia;
- monitoraggio delle conseguenze della malattia nella comunità in termini di prescrizioni mediche e riabilitazione;
- utilizzo e impatto di nuovi strumenti diagnostici e trattamenti.

#### **Registro nazionale degli Eventi Coronarici (EC)**

Il Registro Nazionale degli EC è un registro di popolazione; diversamente da un registro ospedaliero, include tutti gli eventi di una popolazione definita, fatali e non fatali, ospedalizzati o meno. La raccolta e la validazione degli eventi sospetti seguono una metodologia standardizzata, che recepisce le raccomandazioni proposte dal progetto europeo EUROCISS coordinato dal CNESPS, per consentire il confronto nel tempo tra diverse aree o Paesi.

Dati routinari di mortalità (codici ICD-9 410-414 e 798-799 in causa principale; i codici 250, 401-404, 420-429, 440-447 in causa principale solo se accompagnati da 410-414 in causa secondaria) e diagnosi di dimissione ospedaliera (codici ICD-9 410-414) vengono appaiati per selezionare gli eventi coronarici potenziali. Il numero di eventi occorsi nella popolazione sotto sorveglianza e quindi i tassi vengono stimati sulla base di un campione di 1.000 eventi validati selezionati in modo casuale per area nel biennio.

Il Registro attivato per il biennio 2004-05 utilizza i criteri diagnostici MONICA, per i quali la lettura di tutti gli elettrocardiogrammi secondo il Codice Minnesota viene effettuata presso il CNESPS che coordina il progetto, e i "nuovi" criteri diagnostici definiti per le Sindromi Coronariche Acute dallo *Statement* congiunto di *American Heart Association* (AHA), *World Heart Federation* (WHF), *European Society of Cardiology* (ESC), *CDC e National Heart, Lung, and Blood Institute* (NHBLI) che aggiungono la valutazione della troponina.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto ha l'obiettivo di stimare l'occorrenza di EC acuti in aree geografiche definite, rappresentative del Paese, e in particolare di calcolare per genere e fascia di età 35-74 anni:

- tassi di incidenza e di attacco degli EC maggiori;
- tassi di letalità per EC maggiori;
- frequenza di utilizzo di procedure diagnostiche e terapeutiche in fase acuta.

I tassi di attacco e di letalità sono stimati sia in base alla identificazione degli eventi secondo i criteri tradizionali MONICA, in modo da costruire un trend temporale con il Registro 1998-99, sia secondo i nuovi criteri. La validazione degli eventi con i doppi criteri permette una valutazione più precisa e soprattutto permette di capire se la variazione nel tempo della morbosità e mortalità coronarica sia dovuta ad una effettiva variazione oppure ad una modificazione dei criteri diagnostici.

Durante il triennio verrà sviluppato un sistema di controllo di qualità del registro estremamente importante per un valido monitoraggio e confronto degli eventi tra diverse Regioni o Paesi.

Verrà elaborato e prodotto il software per la validazione semiautomatica degli EC sia secondo i criteri MONICA che secondo i nuovi criteri diagnostici delle Sindromi Coronariche Acute.

Per un valido monitoraggio e confronto degli eventi tra diverse regioni o paesi, viene valutata la qualità del registro che dipende da completezza dei casi e delle informazioni relative, validità interna e validità esterna.

### **Trasferibilità dei risultati**

Il Registro nazionale degli Eventi Coronarici fornisce un'immagine globale della malattia nella comunità, evidenzia le aree problematiche e suggerisce dove è necessario migliorare i servizi e il trattamento.

Il Registro è rivolto ai professionisti della salute e agli amministratori e fornisce le basi per comprendere le caratteristiche e il peso della malattia e le conseguenze della malattia nella popolazione attraverso:

- monitoraggio dell'occorrenza della malattia;
- interpretazione delle differenze e cambiamenti nella dinamica naturale della malattia tra sessi, fasce di età, classi sociali;
- identificazione dei gruppi vulnerabili;
- monitoraggio della letalità intra ed extra ospedaliera;
- valutazione delle relazioni tra occorrenza, letalità e mortalità della malattia;
- monitoraggio delle conseguenze della malattia nella comunità in termini di prescrizioni mediche e riabilitazione;
- utilizzo e impatto di nuovi strumenti diagnostici e trattamenti.

### **Registro nazionale della Procreazione Medicalmente Assistita (PMA)**

Il Registro nazionale della PMA svolge diverse attività: censisce i centri di PMA presenti sul territorio nazionale; censisce gli embrioni prodotti e crioconservati presenti; raccoglie i dati relativi alle autorizzazioni regionali sui requisiti tecnici organizzativi dei centri; raccoglie in maniera centralizzata i dati relativi alle coppie che accedono alle tecniche di PMA e ai trattamenti effettuati per valutare l'efficacia la sicurezza e gli esiti delle tecniche medesime; esegue studi di follow-up a lungo termine sui nati da tali tecniche per valutarne lo stato di salute e il benessere, prepara entro il 28 febbraio della relazione al Ministro della Salute come previsto dalla Legge 40/2004. La raccolta dati avviene attraverso l'utilizzo del sito web del Registro situato all'interno del portale dell'ISS dove sono raccolti i dati in forma

aggregata. Sui dati raccolti vengono realizzate analisi a carattere epidemiologico, con continuità nel tempo, al fine di monitorare l'evoluzione del fenomeno e consentire il paragone con quanto avviene in altri Paesi. La gestione del Registro viene svolta in stretta collaborazione con le Regioni.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Valutare l'efficacia delle tecniche di PMA. Indagare e approfondire le problematiche sull'infertilità più sentite delle coppie; promuovere studi e ricerche sui temi legati all'infertilità e alla procreazione assistita sulle nuove metodiche di crioconservazione dei gameti, sulla preservazione della fertilità e sulla promozione della salute riproduttiva.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Si potranno valutare l'efficacia dei protocolli in uso nei centri di PMA, le complicanze indotte da terapie per stimolazioni ovariche e inerenti all'ambito della PMA. Diffusione dei dati del profilo dei centri di PMA.

### **Rete d'informazione e sistema di allerta rapido per malattie infettive e i focolai epidemici**

I sempre più numerosi e rapidi spostamenti internazionali di persone e cose hanno aumentato il rischio di diffusione di malattie infettive, e reso necessari sistemi di sorveglianza sempre più tempestivi e globali.

A tal fine è nato il concetto di "sistema di allerta rapido" (chiamato anche *Epidemic Intelligence*, EI) che comprende tutte le attività volte all'identificazione precoce di rischi in sanità pubblica, la loro validazione, valutazione e investigazione finalizzate alla raccomandazione di misure di controllo. Negli ultimi anni è stato sviluppato a livello internazionale un approccio innovativo che combina l'utilizzo di fonti non convenzionali (media, dati amministrativi, ecc.) (sistema basato su eventi) a dati raccolti da sistemi di sorveglianza epidemiologica esistenti (sistema basato su indicatori), per rilevare segnali precoci di eventi epidemiologici di interesse.

In Italia non esiste attualmente un sistema di allerta rapido per malattie infettive.

In tale contesto si inquadra anche la partecipazione al gruppo di lavoro internazionale denominato *Global Health Initiative Action Group on EARly warning and Response* (GHSAG-EAR) nel quadro della *Global Health Security Initiative* (GHSI) teso a rafforzare la preparazione e la risposta a minacce terroristiche (biologiche, chimiche e radio-nucleari, chemical, biological, radiological, and nuclear – CBRN) attraverso lo sviluppo di una piattaforma sovranazionale per l'allerta rapido.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono: i) Sistematizzazione del sistema di allerta rapido basato su eventi (già pilotato in Italia nel 2010-11), con la raccolta sistematica di dati e informazioni per le finalità di *epidemic intelligence* e la redazione di procedure operative per disciplinare le attività. ii) Miglioramento della componente basata su indicatori per l'allerta rapido utilizzando la sorveglianza sindromica degli accessi ai Pronto Soccorso. Tale sistema ha dimostrato la sua utilità già nel 2006 quando gli accessi ai Pronto Soccorsi sono stati utilizzati come sistema di sorveglianza sindromica e di allerta rapido in concomitanza delle Olimpiadi invernali e successivamente durante la pandemia del 2009 per ampliare il monitoraggio della situazione epidemiologica e garantire la disponibilità di dati tempestivi e rappresentativi sulla diffusione della pandemia influenzale in Italia. iii) Integrazione della sorveglianza dei laboratori (MICRONET) per la rilevazione e il monitoraggio di nuove allerte microbiologiche. iv) Produzione di allerte e comunicazioni rapide e bollettini periodici al fine di disseminare le informazioni raccolte agli operatori sanitari sul territorio

nazionale. v) Raccordo con sistemi e strutture analoghe esistenti in altri Paesi sia dell'UE che sovranazionali (ECDC, WHO, GHSI, ecc.). vi) La valutazione di aspetti nazionali che possano facilitare o interferire con il nuovo Regolamento Sanitario Internazionale-IHR-2005 è una ulteriore area di sviluppo.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le attività descritte sono coerenti con quanto indicato dal nuovo regolamento sanitario internazionale (IHR) della WHO e possono essere di valido supporto al CCM e al Ministero della Salute. Inoltre, la creazione di una rete di informazione rapida per le malattie infettive e i focolai epidemici garantirà la gestione e la risoluzione delle emergenze attraverso il contatto con le autorità sanitarie competenti al livello regionale.

### **Rete informativa sui tumori rari**

Il progetto RARECARE, concluso nel 2010, ha portato ad una definizione di tumore raro, ad una lista di entità che corrispondono a tale definizione, e alla stima e diffusione dei principali indicatori epidemiologici dell'impatto di queste patologie nella popolazione europea. Il nuovo progetto RARECARE-NET (2012-2014) mira a costituire, intorno alla base informativa derivante dai dati dei registri tumori, una rete collaborativa tra politici sanitari, ricercatori, medici e associazioni di pazienti per ottimizzare l'efficacia nell'identificazione e il trattamento di tali neoplasie.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Revisione della lista di tumori rari sulla base delle nuove conoscenze oncologiche. Aggiornamento degli indicatori epidemiologici e analisi degli andamenti temporali. Studio pilota dell'informazione sul luogo di trattamento dei casi incidenti rilevati dai registri tumori, allo scopo di identificare le strutture sanitarie con maggior volume di ricoveri e i centri di eccellenza.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Combattere l'isolamento dei pazienti con tumore raro e migliorare gli strumenti informativi a disposizione loro e dei loro medici per accedere alle cure ottimali.

### **Ricerca sull'epilessia nell'ambito della rete di collaborazione tra l'ISS e i sei IRCCS italiani di neurologia e psichiatria**

L'ISS e gli IRCCS Fatebenefratelli, Mondino, Neuromed, Oasi, Stella Maris e Besta hanno posto in essere una collaborazione scientifica finalizzata allo sviluppo di ricerche di comune interesse inerenti l'area della patogenesi, fisiopatologia, diagnosi, epidemiologia e trattamento dell'epilessia. Un primo studio epidemiologico osservazionale sarà finalizzato a raccogliere dati relativi a pazienti afferenti a centri per l'epilessia specializzati e a strutture organizzative con sede nei differenti IRCCS, e a gettare le basi metodologiche e conoscitive per uno studio più ampio. Lo studio include una raccolta standardizzata di dati anagrafici e inerenti la malattia e si propone di confrontare tali dati con i risultati numerici forniti da scale validate atte a misurare le condizioni di salute mentale, di salute fisica, di qualità della vita e carico familiare, allo scopo di individuare fattori di rischio psicosociale ed eventuali fattori protettivi in questa specifica popolazione.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio consentirà di migliorare la caratterizzazione dei pazienti con epilessia in termini sia di aspetti clinici epilettologici, sia di salute mentale, salute fisica, qualità della vita e carico familiare, allo scopo di fornire elementi utili a migliorare l'organizzazione dei servizi

sociosanitari e di individuare fattori di rischio psicosociale ed eventuali fattori protettivi a scopo di prevenzione, inclusa la prevenzione del suicidio.

Lo studio permetterà inoltre di acquisire informazioni sui trattamenti prescritti ai pazienti in precedenza in centri di I e II livello, allo scopo di valutare l'appropriatezza delle comuni prescrizioni e identificare aree critiche nella prescrizione che possano essere oggetto di interventi di disseminazione di percorsi assistenziali raccomandati o linee guida per migliorare la qualità professionale.

Infine, lo studio consentirà di acquisire informazioni sul fenomeno della farmacoresistenza totale o parziale e sui suoi correlati.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati dello studio, e in generale di questa linea di ricerca, permetteranno di caratterizzare la popolazione di pazienti con epilessia in termini non solo strettamente clinici epilettologici, ma anche di salute fisica generale, salute mentale, qualità della vita. Permetteranno inoltre di avere per la prima volta in Italia informazioni affidabili sul carico che grava sui pazienti e le famiglie. Tali dati saranno utili per individuare criticità nel funzionamento e nell'organizzazione dei servizi e per orientare la pianificare sanitaria agli specifici bisogni ed esigenze di pazienti e famiglie. Permetteranno inoltre di delineare il profilo dei pazienti e delle famiglie a maggiore rischio psicosociale. Consentiranno anche di pianificare razionalmente interventi di miglioramento della qualità professionale. Infine, le informazioni sul fenomeno della farmacoresistenza saranno utili per lo sviluppo e il dimensionamento di strategie terapeutiche innovative, anche non farmacologiche.

#### **Ricorrenza della gemellarità, attitudine alla nuzialità e fecondità nei gemelli**

Le nascite gemellari sono un fenomeno ricorrente nelle famiglie, in particolare per coppie di dizigoti. Questo fenomeno è stato studiato, in passato, mettendo a confronto il numero di nascite gemellari tra i parenti dei gemelli dizigoti con quelle tra i parenti di gemelli monozigoti o con prevalenze attese. Sono stati proposti diversi modelli di trasmissione per le nascite gemellari dizigotiche, e risulta tuttora controverso il ruolo di entrambe le linee parentali nelle nascite gemellari monozigotiche e dizigotiche.

Per consolidare ed estendere questi risultati, il Registro Nazionale Gemelli ha avviato due anni fa uno studio a cui hanno partecipato coppie di gemelli (monozigoti e dizigoti) e persone non gemelle. Nei prossimi anni il registro intende ampliare il campione in studio arruolando nuovi gemelli e singoli.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Sono state compilati complessivamente 538 questionari (315 da gemelli e 223 da amici/conoscenti dei gemelli; età media 60 anni). Si stima che, per concludere il lavoro sarà necessario arruolare almeno altri 500 individui. Ai nuovi arruolati verrà somministrato per via postale lo stesso questionario che indaga la presenza di gemelli tra i nonni, genitori, i fratelli e i loro figli, i propri figli e i nipoti. Nell'ambito della stessa indagine sono state inoltre raccolte informazioni su matrimonio/convivenza, anno del matrimonio/convivenza ed età alla nascita del primo figlio. Da una prima analisi dei dati raccolti non sono emerse grandi differenze tra singoli e gemelli per quel che riguarda l'attitudine alla nuzialità e alla fecondità. Sulla base di quanto emerso si valuta che per completare lo studio e verificare l'ipotesi che i gemelli abbiano una minore attitudine alla nuzialità e una ridotta fecondità come fenomeno compensatorio dell'ereditabilità delle nascite gemellari, sarà necessario ampliare il campione di almeno 500 unità.

### **Trasferibilità dei risultati**

Le informazioni derivate da questo studio permetteranno di ipotizzare un modello di trasmissione per le nascite gemellari dizigotiche.

## **Risposta al danno sul DNA e alterazioni metaboliche dell'obesità**

È una linea di ricerca che coinvolge un gruppo multidisciplinare di ricercatori di base del nostro e di altri reparti dell'ISS e di clinici universitari. Vuole testare l'ipotesi che l'accumulo di danno nel DNA, dovuto ad un cronico ed eccessivo introito calorico, giochi un ruolo centrale nella patogenesi di molte complicanze associate all'obesità (es. infiammazione, resistenza insulinica, ipertensione) che, a loro volta, sono fattori di rischio per il diabete di tipo 2, la malattia cardiovascolare e il cancro. L'obiettivo sarà perseguito attraverso lo studio di una popolazione di coppie di gemelli MZ discordanti per indice di massa corporea (*Body Mass Index*, BMI). Questi saranno caratterizzati dal punto di vista metabolico e dell'espressione genica, per identificare quei marcatori associati con la salute metabolica, e con il danno al DNA e ai meccanismi di riparo dello stesso. Il Reparto di Epidemiologia Genetica identificherà, arruolerà e, in parte, caratterizzerà la coorte di gemelli MZ discordanti per BMI; fornirà inoltre le competenze nella modellistica degli studi gemellari e si occuperà della conservazione dei campioni biologici nella Biobanca del CNESPS.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati di questo studio metteranno in luce le relazioni e i meccanismi che legano le alterazioni metaboliche associate all'obesità con il danno al DNA e i meccanismi di riparo del DNA. Il progetto prevede la collezione e la disponibilità di materiale biologico da coppie di gemelli MZ ben caratterizzati.

### **Trasferibilità dei risultati**

Potrebbero essere identificati meccanismi e fenomeni degli stadi precoci di malattia che sono suscettibili di correzione con interventi sullo stile di vita.

## **Ruolo dei fattori ereditari e delle esperienze ambientali nella salute mentale**

L'obiettivo è investigare il ruolo dei fattori ereditari, delle esperienze ambientali e delle loro reciproche interazioni nell'espressione di caratteristiche comportamentali e della personalità rilevanti per la salute mentale. Il disegno di studio adottato si basa sul confronto tra coppie di gemelli MZ e DZ, identificate tramite il Registro Nazionale Gemelli. Le caratteristiche esplorate sono valutate attraverso questionari auto-somministrati ampiamente validati, e comprendono: psicopatologie e disturbi d'ansia nell'età dello sviluppo (*Child Behavior Check List*, CBCL; *Screen for Child Anxiety-Related Emotional Disorders*, SCARED); tratti psicotici e ossessivi (*Symptom Check List*, SCL-90); tratti schizofrenici (*Magical Ideation Scale*, MIS); disturbi dello spettro autistico (*Autism Spectrum Quotient*, AQ); stili di attaccamento (*Experiences in Close Relationships*, ECR); benessere psicologico (*Ryff's Scales of Psychological Well-Being*, SPWB); temperamento e carattere (*Temperament and Character Inventory*, TCI).

Questo settore di ricerca si avvale della collaudata collaborazione del Registro Nazionale Gemelli con il Reparto di Salute mentale dell'ISS e le Facoltà di Psicologia dell'Università "Sapienza" di Roma e "Vita Salute S. Raffaele" di Milano. Nuove collaborazioni sono state recentemente stabilite con i Reparti di Tossicologia genetica e Malattie immuno-mediate dell'ISS, in vista di studi sui correlati biologici di caratteristiche psicologiche.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi di questo settore di ricerca sono:

- stima della componente genetica (ereditabilità) e ambientale di caratteristiche comportamentali e della personalità nella popolazione italiana;
- stima dell'interazione geni-ambiente e identificazione di esposizioni ambientali (es. stili di vita) in grado di modificare l'ereditabilità delle caratteristiche in studio;
- stima della correlazione/comorbidità tra diverse caratteristiche;
- stima del contributo dei fattori genetici e ambientali, condivisi da diverse caratteristiche, nel determinare la loro correlazione/comorbidità;
- identificazione di biomarcatori rilevanti per la salute (immunitari, neuroendocrini e cardiovascolari) associati alle diverse caratteristiche.

### **Trasferibilità dei risultati**

La stima della componente ambientale di caratteristiche comportamentali e della personalità nella popolazione italiana potrà fornire informazioni sulla fattibilità di strategie di promozione della salute mentale basate su fattori modificabili. La valutazione di interazioni di tipo geni-ambiente potrà essere di aiuto nell'identificazione di fattori ambientali in grado di modificare la componente genetica di diverse dimensioni della salute mentale; sulla base di questi fattori, sarà possibile una migliore pianificazione degli interventi di prevenzione dei disturbi mentali e di promozione della salute mentale. L'identificazione di biomarcatori associati alle diverse caratteristiche comportamentali e della personalità potrà gettare luce su nuovi meccanismi rilevanti per la salute.

## **Salute degli immigrati: malattie infettive e malattie prevenibili da vaccino**

Da Paese di emigrazione, l'Italia è ormai un Paese di prevalente immigrazione. La popolazione straniera regolarmente residente in Italia è andata aumentando progressivamente negli ultimi anni. Nel gennaio 2011, erano oltre 4,5 milioni gli stranieri residenti nel Paese (il 7,5% del totale dei residenti).

Questa linea generale di ricerca è articolata in tre progetti che prevedono studi epidemiologici relativi allo stato di salute della popolazione immigrata e il loro accesso ai servizi sanitari. In particolare, le attività sono focalizzate su:

- Rapida identificazione di possibili focolai epidemici e implementazione di eventuali misure di controllo tra gli immigrati nei centri di prima accoglienza a seguito della crisi socio-politica che ha coinvolto diversi Paesi del Mediterraneo nel 2011 attraverso la sorveglianza sindromica delle principali malattie infettive.
- Promozione dell'accesso alle vaccinazioni delle popolazioni migranti in Europa attraverso l'identificazione delle barriere di accesso ai programmi di immunizzazione, la formulazione di raccomandazioni per i *policy-maker*, e lo sviluppo di materiale educativo sia per il personale sanitario che per i migranti.
- Valutazione delle caratteristiche cliniche dell'infezione da HIV e stima dell'accesso, aderenza, efficacia e tollerabilità della terapia antiretrovirale (HAART) tra gli immigrati in Italia attraverso uno studio osservazionale multicentrico condotto in sei centri clinici italiani.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi dalle attività elencate sopra possono sintetizzarsi come segue:

- Stima della prevalenza e incidenza delle principali malattie infettive tra gli immigrati nei centri di prima accoglienza.
- Rapida identificazione e controllo di eventuali focolai epidemici nei centri di prima accoglienza.

- Identificazione delle principali barriere all'accesso ai servizi di prevenzione primaria nelle popolazioni immigrate in Italia e sviluppo e scambio di raccomandazioni, linee-guida e altro materiale educativo adottato a livello locale e regionale per la promozione della vaccinazione in questo gruppo di popolazione.
- Creazione di canali di comunicazione tra operatori sanitari e immigrati volti a favorire la fiducia di quest'ultimi nel servizio sanitario.
- Stima dell'accesso, tolleranza, efficacia e aderenza alla terapia antiretrovirale per l'HIV tra gli immigrati.
- Valutazione delle azioni necessarie a migliorare la cura dell'infezione da HIV tra gli immigrati e identificazione di messaggi preventivi da disseminare in questo gruppo di popolazione per favorirne l'accesso tempestivo alla terapia.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le attività descritte sono coerenti con l'impegno dell'ECDC a livello europeo e con le priorità identificate nella Relazione sullo Stato Sanitario del Paese, risultando così di valido supporto al CCM e al Ministero della Salute. Inoltre, la condivisione delle soluzioni adottate a livello regionale e locale per la promozione delle vaccinazioni tra gli immigrati, favorendo il contatto con le autorità sanitarie territoriali, è propedeutica a diffondere le iniziative di maggior successo e a proporre quindi modelli di intervento riproducibili. Infine, l'accesso tempestivo alla HAART per l'HIV tra gli immigrati porterebbe a una riduzione dell'impatto sul sistema sanitario. Infatti, oltre a una riduzione dei costi di ospedalizzazione dovuti a un ritardato accesso alla terapia, questo comporterebbe una riduzione della diffusione dell'infezione sia per la ridotta carica virale tra gli immigrati in cura che per l'adozione di misure preventive promosse nei centri clinici di riferimento.

#### **Salute e benessere dei giovani**

Il progetto si propone di intercettare i bisogni dei giovani sulla mancata osservanza di stili di vita salutari, sui comportamenti a rischio che possono essere causa di Malattie Sessualmente Trasmesse (MST) e di informare i giovani riguardo la loro capacità riproduttiva e come tutelarla nel tempo. Il progetto, sperimentale studia e integra varie modalità di prevenzione e di intercettazione dei bisogni dei giovani, tramite "sportelli salute" e il web. Il progetto si articola in differenti azioni. Azione Giovani e salute riproduttiva: verrà utilizzato il sito web realizzato ad hoc. Le scuole che parteciperanno al progetto avranno la possibilità di coinvolgere gli studenti in un progetto che li veda protagonisti attivi dell'informazione. Successivamente verrà svolta un'indagine conoscitiva con l'ausilio di un questionario che raccoglierà informazioni sulle conoscenze sul tema della salute riproduttiva, le loro principali modalità comunicative e relazionali e le loro difficoltà emotive riguardo tali argomenti. Attraverso il portale web, specialisti dell'ISS, renderanno disponibili informazioni medico-scientifiche riguardo argomenti fondamentali e nozioni di fisiologia di base. Sarà nuovamente proposto un questionario.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Creare "cultura riproduttiva" diffondendo l'informazione fra i giovani oggi, per trasmettere la conoscenza che consenta loro di fare scelte consapevoli domani. L'informazione corretta è lo strumento essenziale su cui basare le campagne di prevenzione, che non mirino solamente ad aumentare le conoscenze nel campo della fisiologia della riproduzione ma che cerchino tramite la condivisione delle tematiche, di far acquisire ai ragazzi la sicurezza nel poter parlare e condividere gli argomenti della vita riproduttiva per migliorare la comunicazione sia fra ragazzi dello stesso genere che fra ragazzo-ragazza, veicolando il messaggio che la salute riproduttiva va mantenuta, è destinata ad esaurirsi e va

tutelata nel tempo. Informare i giovani sulle tematiche trattate dal progetto tramite un sito web appositamente realizzato.

Proporre ai ragazzi uno spazio interattivo (sito web) al quale rivolgersi secondo le loro necessità per porre domande su tutti gli argomenti riguardanti la salute riproduttiva.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'individuazione dei bisogni dei giovani sulle tematiche trattate, permetterà di acquisire maggiori conoscenze utili per la realizzazione di futuri interventi informativi a loro mirati. Interventi informativi che rispondano ad una effettiva esigenza e vengano riproposti ciclicamente per soddisfare i bisogni informativi dei futuri "nuovi" adolescenti, perpetuando un progetto interattivo che andrà mantenuto e implementato nel tempo.

### **SEIEVA: Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta**

Il SEIEVA nasce ad opera del Reparto di Epidemiologia clinica dell'ISS nel 1984 come strumento per la sorveglianza e la prevenzione delle epatiti virali acute in Italia. Lo scopo principale del SEIEVA è quello di promuovere a livello locale e nazionale l'indagine e il controllo sull'Epatite Virale Acuta (EVA). Attraverso l'integrazione di informazioni ricavate dai questionari epidemiologici con i risultati di laboratorio, i dati provenienti dalla sorveglianza possono essere utilizzati infatti per la stima dell'incidenza delle EVA, per la valutazione del contributo relativo dei diversi fattori, per la definizione di misure preventive alle quali dare priorità e per il monitoraggio degli effetti dei diversi programmi di prevenzione. Attraverso l'aggregazione dei dati è possibile, inoltre, avere un quadro costantemente aggiornato dell'epidemiologia dell'EVA a livello nazionale. Il Sistema di Sorveglianza si basa sulla stretta e continua collaborazione tra l'ISS e le ASL che decidono volontariamente di aderire al SEIEVA. Attualmente, le ASL partecipanti coprono più del 73% della popolazione italiana.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Attraverso i dati provenienti dalla sorveglianza, è possibile stimare l'incidenza delle EVA per data di insorgenza, area geografica, età e sesso e tipo.

Inoltre, l'utilizzo di studi di tipo caso-controllo, all'interno della sorveglianza, permettono la stima dei rischi relativi e attribuibili associati alle diverse esposizioni.

Ove necessario, soprattutto in caso di epidemie, vengono condotti studi analitici per valutare il ruolo dei diversi fattori di rischio, utilizzando l'approccio caso-controllo e, quando possibile, l'approccio di coorte.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati provenienti dal SEIEVA possono essere utilizzati per definire appropriate strategie di controllo basate sull'importanza relativa, a livello locale, dei diversi fattori di rischio.

Tutte le attività finalizzate al raggiungimento degli obiettivi del SEIEVA potranno concretizzarsi in un'ulteriore riduzione della diffusione delle EVA in Italia, da attribuire a più efficaci e mirate misure di prevenzione e controllo.

### **Sistema di sorveglianza delle sospette reazioni avverse a prodotti di origine naturale**

Per contribuire alla conoscenza dei potenziali rischi associati all'uso dei prodotti "naturali" è attivo dal 2002 un sistema di raccolta delle segnalazioni spontanee di sospette reazioni avverse a tali prodotti.

L'esperienza sin qui condotta ha permesso di delineare le dimensioni del problema e di identificare possibili strategie per la strutturazione e ufficializzazione del sistema su scala nazionale e in ambiti diversi.

Il sistema di sorveglianza si basa sulla raccolta e valutazione di segnalazioni spontanee di sospette reazioni avverse insorte dopo l'assunzione/somministrazione di:

- integratori alimentari;
- preparazioni galeniche a base di erbe;
- altri preparati a base di erbe non inclusi nei punti precedenti e altri preparati di origine naturale non vegetale (es. propoli, estratti di lumaca, ecc.).

Le segnalazioni sono raccolte in un unico centro di raccolta presso l'ISS che funge anche da centro di coordinamento.

Tenendo conto della particolarità di questi prodotti, per la valutazione dei casi gravi e dei segnali raccolti, ci si avvale di un Comitato scientifico, composto da esperti in farmacologia, farmacognosia, fitoterapia, botanica, tossicologia, omeopatia.

Per il supporto alle attività del Comitato scientifico sarà anche creato un Comitato di coordinamento, composto da esperti di ISS, AIFA, Ministero della Salute.

Le segnalazioni possono essere effettuate, tramite una scheda *ad hoc* al CNESPS.

### **Risultati attesi nel triennio**

La gran parte delle conoscenze sugli effetti salutistici delle piante si basa soprattutto sull'esperienza maturata attraverso il loro uso tradizionale, tuttavia l'introduzione in commercio di preparati diversi da quelli tradizionali pone il problema della sicurezza d'impiego di tali preparati.

A fronte di una diffusa pubblicità, le informazioni sui rischi sono spesso poco conosciute.

Ne consegue l'esigenza di un attento monitoraggio delle reazioni avverse a tali prodotti finalizzata all'identificazione di possibili rischi attraverso sistemi di "segnalazione spontanea", sufficientemente sensibili per mettere precocemente in evidenza possibili segnali di allarme. Va considerato che in alcuni casi il livello o la direzione dell'attività di un prodotto a base di piante potrebbero non essere connessi con i suoi requisiti intrinseci di composizione per la presenza di contaminazioni di varia natura o di vere e proprie contraffazioni. E di conseguenza le reazioni avverse correlabili all'uso di questi prodotti possono derivare anche da problemi di qualità. In particolare, le cause principali di questi eventi possono essere la contraffazione dei prodotti con principi farmacologicamente attivi non dichiarati (per es: antinfiammatori, antiipertensivi, ecc.), contaminazione con sostanze potenzialmente tossiche. Eventi avversi possono anche insorgere per l'uso di specie medicinali non correttamente identificate e classificate.

### **Trasferibilità dei risultati**

Qualora ritenesse di ravvisare segnali di allarme (più segnalazioni relative alla stessa preparazione, uso di sostanze proibite, reazione seguita da decesso o che ha messo in pericolo la vita del paziente, più reazioni simili osservate in bambini o anziani o donne in gravidanza o allattamento), il Comitato scientifico ne darà tempestiva comunicazione al Comitato di coordinamento per eventuali decisioni regolatorie (di allerta, sequestro, richiesta di esami di laboratorio, ecc.).

Eventuali esami tossicologici di prodotti e preparazioni galeniche o "casalinghe" saranno predisposti dall'ISS. Tra le problematiche che ci si potrà trovare ad affrontare bisogna prevedere la ricerca di contaminanti come metalli pesanti, di aflatossine, componenti potenzialmente tossici come ad esempio gli alcaloidi pirrolizidinici, di farmaci (là dove non dichiarato/autorizzato); la esecuzione di analisi microbiologiche, il dosaggio di vitamine, ecc.

## **Sistema di sorveglianza di popolazione PASSI: assistenza per la messa a regime nelle ASL/Regioni**

Sostenere nelle Regioni/PA il funzionamento e le attività del sistema di sorveglianza PASSI a monitoraggio, continuo e sistematico, di alcuni aspetti della salute della popolazione italiana di età compresa fra i 18 e i 69 anni in rapporto a interventi di programmi specifici (in atto o in via di realizzazione) relativi ai principali fattori di rischio comportamentali e all'adozione di misure preventive. Si mira a fornire il supporto operativo necessario in funzione della qualità del dato di sorveglianza di popolazione in possesso delle ASL partecipanti al sistema, il quale si avvale specificamente della collaborazione degli operatori sanitari delle Aziende. Ciò costituisce un importante valore aggiunto perché, localmente, è favorita la mobilitazione di energie, risorse e interesse per la cultura della sorveglianza. La flessibilità del sistema può inoltre consentire alle singole ASL di monitorare specifiche esigenze conoscitive. I temi di indagine interessati sono priorità del Piano Nazionale della Prevenzione: Qualità di vita percepita; Stili di vita; Fattori di rischio cardiovascolare; Interventi di prevenzione (Screening oncologici, Vaccinazioni dell'adulto); Salute mentale; Sicurezza (stradale, domestica, lavoro); Aspetti socio-demografici. Passi dedica particolare attenzione a percezioni e conoscenze delle persone su stili di vita e attività preventive, nonché a informazioni e consigli ricevuti ed esplora anche aspetti non coperti da altre indagini sistematiche.

### ***Risultati attesi nel triennio***

In linea con l'utilità e la pertinenza ai programmi pubblici di prevenzione (Piano Nazionale della Prevenzione, programma Guadagnare Salute), il sistema di sorveglianza vuole restituire una rappresentazione dinamica di stili di vita, di bisogni di salute percepiti e dell'adesione dei cittadini ai programmi di prevenzione tramite un monitoraggio, continuo e confrontabile sul territorio nazionale, delle variazioni di fattori di rischio comportamentali e della diffusione delle misure preventive, per migliorare i programmi mirati al contrasto delle malattie croniche. Si vuole supportare il consolidamento della sorveglianza nelle Regioni/PA tramite assistenza continua e monitorare e valutare l'operatività locale. Al fine di un consolidamento infatti, il sistema richiede supporto in tutte le unità per gli aspetti metodologici, operativi, gestionali, nonché relativamente alla variabilità -tra Regioni e all'interno delle Regioni- nei requisiti strutturali e nelle performance. In merito al funzionamento, l'identificazione delle condizioni di solidità mira a concretizzarsi nei processi di: stabilizzazione e standardizzazione delle procedure di raccolta, analisi e interpretazione dei dati, assistenza alla formazione continua del personale e alle attività di comunicazione; sviluppo e manutenzione del sistema informativo e del sito web dedicati a metodi e risultati della sorveglianza.

### ***Trasferibilità dei risultati***

In continuità con il triennio precedente di attività, si proseguirà nella produzione scientifica evidence-based su temi di sanità pubblica (in particolare, individuazione trend fattori di rischio per la salute legati a comportamenti individuali e abitudini associate agli stili di vita) con dettaglio di stime regionali e aziendali, la cui validità, strettamente connessa a standard metodologici, è rilevante su entrambi i fronti dell'utilizzazione dei risultati: da una parte divulgativi, di conoscenza e dall'altra di indirizzo e supporto per la programmazione in ambito di prevenzione. La comunicazione dei risultati sarà veicolata tramite diversi prodotti a operatori di sanità pubblica, decisori e programmatori degli interventi preventivi fino a raggiungere la popolazione nazionale generica. A fini programmatori, si forniranno stime annuali sui principali problemi di salute e su alcuni

interventi in sanità pubblica, per una re-distribuzione delle risorse in base a dati reali e attendibili.

### **Sistema di sorveglianza nazionale dell'IVG**

Dal 1981 è operativo un Sistema di Sorveglianza attivo che vede impegnati l'ISS, il Ministero della Salute, l'ISTAT, le Regioni e le Province autonome. Il monitoraggio avviene a partire dalla compilazione per ciascuna IVG dei modelli D12/ISTAT con informazioni sulle caratteristiche socio-demografiche delle donne, sui servizi coinvolti nel rilascio della certificazione e nell'intervento e sulle modalità dell'intervento compilati nelle strutture dove avviene l'IVG.

Sulla base di questi dati le Regioni compilano il questionario trimestrale dell'ISS con le distribuzioni di tutte le variabili raccolte. L'ISS provvede al controllo di qualità dei dati con le Regioni, e, insieme all'ISTAT, all'elaborazione delle tabelle per ogni Regione e nazionali. Viene quindi redatta, con il Ministero della Salute, la bozza della relazione che il Ministro presenta annualmente al Parlamento.

Inoltre l'ISS conduce studi utili per l'interpretazione del fenomeno.

Periodicamente i referenti regionali del sistema di sorveglianza si incontrano per discutere delle implicazioni di sanità pubblica deducibili dall'analisi dei dati dell'evoluzione dell'IVG.

L'ISS garantisce alle Regioni anche consulenza per la programmazione, implementazione e valutazione a livello locale di interventi atti alla prevenzione e al miglioramento della qualità. È stato anche creato un software per l'immissione a livello locale dei modelli D12 che è stato offerto gratuitamente alle Regioni.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il proseguimento del progetto permetterà di seguire l'evoluzione dell'aborto volontario, fornire i dati per la relazione annuale del Ministro della Salute, dare risposte a quesiti specifici e permettere un approfondimento delle problematiche, ponendo così le basi per possibili soluzioni.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il sistema di sorveglianza nazionale dell'IVG rappresenta un modello esportabile a livello locale o su altre tematiche. Inoltre i dati prodotti sono utilizzabili a livello nazionale e locale per valutare il fenomeno e intraprendere attività di prevenzione. Il software prodotto può essere utilizzabile a livello locale.

### **Sistema di sorveglianza OKkio alla SALUTE**

Dal 2008 è attivo in Italia OKkio alla SALUTE, sistema di sorveglianza nazionale sullo stato ponderale dei bambini di età compresa tra i sei e i dieci anni, in quanto il sovrappeso e l'obesità rappresentano uno dei principali problemi di salute delle società moderne. OKkio alla SALUTE, coordinato dal CNESPS dell'ISS, è svolto in collaborazione con le Regioni e le ASL, ha una periodicità biennale e prevede l'acquisizione di informazioni su parametri antropometrici, abitudini alimentari, attività fisica ed eventuali iniziative scolastiche favorevoli la sana nutrizione nei bambini in età scolare.

La sorveglianza viene condotta in un campione di tutte le classi terze primarie (bambini di 8-9 anni). La raccolta delle informazioni è effettuata attraverso quattro questionari: uno destinato ai bambini, uno per i genitori, uno per il dirigente scolastico e uno per gli insegnanti, oltre a una scheda antropometrica in cui viene indicato il peso e l'altezza dei bambini misurati dagli operatori delle ASL appositamente formati e dotati di strumenti identici in tutto il territorio nazionale. Per stimare la prevalenza di sovrappeso e obesità è

calcolato l'indice di massa corporea e per la definizione di sovrappeso e obesità si utilizzano i valori soglia raccomandati dall'*International Obesity Task Force*.

### **Sistema di Sorveglianza PASSI d'Argento**

Il sistema di sorveglianza PASSI d'Argento (PDA), promosso dal CCM del Ministero della Salute e dalle Regioni con il supporto tecnico-scientifico del CNESPS (ISS), è stato disegnato con la finalità di mettere a disposizione dei decisori informazioni utili per le scelte di politiche socio-sanitarie volte a migliorare la qualità di vita della popolazione ultra64enne. Le informazioni raccolte da PDA sono strutturate sui tre pilastri dell'Active Ageing e articolano la descrizione della popolazione ultra64enne in quattro sottogruppi (in buona salute, a rischio di malattia, a rischio di disabilità, con disabilità), cui corrispondono target di interventi specifici di promozione della salute, prevenzione e assistenza socio-sanitaria. La sperimentazione PDA è stata condotta con due indagini trasversali in 16 Regioni, su un campione random stratificato per sesso ed età, statisticamente rappresentativo di persone con età >64 anni non istituzionalizzate. Il questionario standardizzato e validato è stato somministrato con intervista telefonica o faccia a faccia. Un Gruppo Tecnico Operativo, composto da tecnici sanitarie sociali del CNESPS e di diverse Regioni, hanno costituito una Comunità di Pratica (CoP) con riunioni periodiche, in presenza o a distanza su piattaforma web (Moodle), con la finalità di assicurare evidenza scientifica e di garantire gli aspetti scientifici, tecnici e organizzativi del sistema di sorveglianza.

#### **Risultati attesi nel triennio**

PDA ha raccolto 8900 interviste tra il 2009 e il 2010 (risultati presentati in altra sede) e ha formato 687 operatori. La valutazione effettuata dalla CoP ha evidenziato l'importanza e le criticità dell'integrazione operativa tra settore sociale e sanitario, la notevole adesione delle Regioni (80%), i dati importanti e di immediato utilizzo forniti da PDA, la limitatezza dei costi, il nuovo profilo di salute della popolazione ultra64enne, la creazione di una rete che permetta interventi integrati, la verifica della risposta del sistema socio-sanitario al bisogno espresso. Le criticità identificate si riferiscono ad aspetti tecnici (qualità dei dati raccolti), organizzativi (discontinuità nella collaborazione socio-sanitaria), comunicativi (alleanza con i media) e istituzionali (necessità di una forte leadership regionale per la stabilità del sistema di sorveglianza). Durante il 2012, è prevista la messa a regime della sorveglianza in 17 regioni o province autonome e l'utilizzazione delle informazioni prodotte per il monitoraggio dei piani di prevenzione regionali (2010-2012) e per la migliore efficacia delle azioni di prevenzione e assistenza degli ultra64enni messe in atto da regioni e aziende sanitarie.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Informazioni sistematiche e di qualità sui bisogni della popolazione ultra 64enne e sulle relative risposte del sistema socio-sanitario sono essenziali per valutare l'efficacia delle azioni intraprese e razionalizzare le risorse disponibili, in base a criteri di evidenza scientifica e uso efficiente delle risorse. Inoltre, l'utilizzo di strumenti e metodologie di lavoro standardizzate consente il confronto dei risultati ottenuti su tutto il territorio nazionale, evidenziando eventuali disuguaglianze sanitarie e sociali all'interno di questa fascia di popolazione e ponendo le basi per contrastarne l'ampliamento.

## **Sistema informativo nazionale per la sorveglianza delle esposizioni pericolose e delle intossicazioni (SIN-SEPI)**

La presenza in ambienti di vita e di lavoro di agenti chimici e biologici potenzialmente pericolosi per la salute umana richiede la disponibilità di sistemi di sorveglianza in grado di fornire indicazioni sulla sicurezza dei prodotti in commercio, segnalare condizioni di pericolo, orientare interventi di prevenzione e verificarne le ricadute. A questi fini, nel 2005 è stato implementato dall'ISS un sistema informativo nazionale per la sorveglianza delle esposizioni pericolose e delle intossicazioni (SIN-SEPI), basato sulla casistica esaminata dai Centri Antiveleni (CAV). Ogni anno, il SIN-SEPI acquisisce circa 48.000 nuovi casi di esposizione umana che vengono trasmesse dai CAV collaboranti tramite procedure standard recepite dall'Accordo tra Stato, Regioni e PA sul funzionamento dei CAV. I dati acquisiti dal SIN-SEPI sono sistematicamente sottoposti a controlli di qualità, procedure di revisione e classificazione. L'attività svolta viene documentata con rapporti annuali contenenti informazioni dettagliate sulle principali caratteristiche dei casi e sulle esposizioni rilevate. Attualmente, il database del SIN-SEPI contiene informazioni dettagliate su circa 336.000 incidenti che si sono verificati nel periodo 2005-2011 e costituisce una base informativa disponibile per lo sviluppo di specifiche attività di vigilanza e sorveglianza previste dalla normativa europea e nazionale. Nel 2011 il SIN-SEPI è stato inserito nel Piano Statistico Nazionale.

### ***Risultati attesi nel triennio***

Nel triennio 2012-2014 verrà mantenuto il flusso informativo del SIN-SEPI e si procederà nella revisione, classificazione e analisi descrittiva della casistica esposta nel periodo 2008-2013. Le osservazioni effettuate verranno comunicate ai referenti regionali e nazionali tramite dettagliati rapporti annuali. Come già avvenuto nel precedente triennio, le allerte che saranno generate dal SIN-SEPI o da altre fonti informative nazionali e internazionali verranno sottoposte a verifica e saranno oggetto di rapporti che presenteranno dati di approfondimento. Inoltre, il SIN-SEPI collaborerà tramite la trasmissione delle osservazioni effettuate ai sistemi di allerta attivi a livello nazionale e europeo. Il database del sistema verrà utilizzato per analisi su agenti specifici e/o modalità di esposizione che saranno richieste da Regioni, Ministeri e Agenzie nazionali. La base di dati disponibile verrà utilizzata per lo sviluppo e il mantenimento di specifiche attività di sorveglianza, con particolare riferimento ad esposizioni pericolose in ambiente domestico, intossicazioni acute da pesticidi, farmacovigilanza. Inoltre, la base informativa del SIN-SEPI sarà resa disponibile per attività di verifica e controllo della sicurezza dei prodotti in commercio, a supporto del regolamento comunitario 1907/2006 (REACH), e per contributi a progettualità finalizzate alla caratterizzazione dei suicidi e tentati suicidi in Italia.

### ***Trasferibilità dei risultati***

I risultati delle analisi effettuate saranno proposti come base informativa per l'individuazione di priorità di intervento mirati alla riduzione del rischio di esposizione ad agenti specifici. In particolare, costituiranno una base informativa a supporto di interventi di prevenzione mirata, normativi, di formazione e informazione, e per la valutazione della loro efficacia. La sistematica revisione della casistica acquisita dal SIN-SEPI potrà contribuire alla caratterizzazione della tossicità per l'uomo di principi attivi e formulati in commercio (farmaci e non-farmaci), integrando le informazioni disponibili, principalmente basate su dati sperimentali. Il mantenimento di un sistema di allerta rapido, orientato alla rilevazione di eventi di origine dolosa e accidentale potrà contribuire alla definizione di protocolli per interventi coordinati di verifica, approfondimento e prevenzione a livello locale e nazionale.

## **Sistema Nazionale Linee Guida (SNLG): produzione di linee guida e strategie di implementazione**

Il progetto si inserisce nell'ambito del SiVeAS, (DM 17/6/2006) che prevede per l'SSN l'utilizzo delle risorse secondo criteri di efficienza e appropriatezza. È finanziato dal Ministero del Lavoro della Salute e delle Politiche Sociali, attraverso una convenzione siglata nel dicembre 2006 tra Direzione della Programmazione Sanitaria e l'ISS.

Il fine del progetto è quello di promuovere processi di valutazione e di miglioramento dell'appropriatezza dei percorsi diagnostico terapeutici tramite l'elaborazione e la disseminazione di linee guida, la formazione di medici e infermieri alla cultura della medicina basata sulle prove e la creazione di una comunità di consenso in Italia e all'estero intorno ai temi della qualità delle linee guida e del loro utilizzo come strumento di governo clinico.

Le attività in cui è organizzato il progetto, scientifica, di informazione, di formazione e di implementazione, sono coordinate dal Reparto di Epidemiologia clinica e linee guida del CNESPS dell'ISS, che interagisce con le altre strutture del SSN.

Collaborano al programma il settore documentazione dell'ISS e l'agenzia di giornalismo scientifico Zadig.

### **Risultati attesi nel triennio**

L'attività scientifica ha come risultato la formulazione di raccomandazioni basate sulle prove di efficacia relative all'appropriatezza dei comportamenti clinici. Le raccomandazioni sono incluse in tipologie di documenti diversificati a seconda del percorso metodologico adottato: linee guida, consensus conference, e documenti di revisione rapida.

La formazione include la realizzazione di corsi residenziali e a distanza. I corsi residenziali rivolti a medici e infermieri sono dedicati alla selezione e alla valutazione metodologica degli studi clinici e alla promozione della cultura della medicina basata sulle prove di efficacia.

I corsi a distanza, ancorati ad una piattaforma on line, preparano gli operatori sanitari all'utilizzo delle linee guida prodotte. L'operatore sanitario affronta quattro o cinque percorsi clinici avendo a disposizione come materiale di studio il testo del documento SNLG.

L'attività di informazione, finalizzata alla creazione di una rete virtuale di operatori sanitari, pazienti/cittadini e manager decisori, ha prodotto un portale web dedicato ([www.snlg-iss.it](http://www.snlg-iss.it)) che ospita: i documenti prodotti in full text, (comprese le versioni divulgative dei documenti), e la piattaforma GOAL che consente la condivisione dei documenti intermedi e la comunicazione tra i membri dei diversi gruppi di lavoro multidisciplinari.

### **Trasferibilità dei risultati**

L'elaborazione di linee guida, o di documenti di sintesi di prove di efficacia, può essere definita come quell'area della ricerca traslazionale "che cerca di trasferire i risultati degli studi clinici nella pratica clinica di tutti i giorni". I prodotti ottenuti dal progetto SNLG, in questo caso le raccomandazioni di pratica clinica, sono dunque al contempo strumento di trasferibilità di risultati e essi stessi oggetto di trasferimento.

La trasferibilità intrinseca della linee guida è il successo delle sue raccomandazioni cioè l'adozione dei comportamenti raccomandati da parte di operatori sanitari e manager decisori. Si tratta di un fenomeno complesso che passa anche per alcune caratteristiche intrinseche al documento: il coinvolgimento di diverse figure professionali, l'esplicitazione della metodologia utilizzata, le dichiarazioni del conflitto di interessi, e non ultimo la forma editoriale, che deve avere caratteristiche di semplicità e brevità del testo.

## **Sistema per l'integrazione delle cure e dell'assistenza per le persone con malattie croniche**

Favorire lo sviluppo di modelli organizzativi per l'integrazione delle cure e dell'assistenza, orientati alla maggiore efficienza e al miglioramento della qualità dell'assistenza per le persone con malattie croniche. Individuare esperienze esemplari in grado di rappresentare un *benchmark* e garantire la riproposizione delle esperienze di successo, dal punto di vista organizzativo e tecnologico. Promuovere il coordinamento di iniziative simili in atto nelle diverse regioni, per scambio di know-how, armonizzazione dei requisiti e delle specifiche, complementarietà delle soluzioni. L'avvio delle attività può essere suddiviso in diverse fasi operative: di ricognizione delle esperienze esistenti (esplorativa) direttamente riconducibili ai progetti di gestione integrata e raccolta del materiale esistente; di approfondimento mirato a singoli aspetti (proattiva) e analisi comparative degli approcci adottati; di analisi sistematica delle esperienze e delle attività correlate; di individuazione di esperienze esemplari (modalità organizzative, operative e di *governance*; strumenti tecnologici adottati, ecc.) in grado di rappresentare un *benchmark*.

### **Risultati attesi nel triennio**

Costruzione condivisa di un modello generalizzato di gestione integrata ospedale territorio che sia, al contempo, sufficientemente flessibile da permettere un adattamento contestuale. Formazione degli operatori medici e non medici.

### **Trasferibilità dei risultati**

Costituzione di un'ampia rete di collaborazione per successivi studi epidemiologici e attività di sorveglianza. Pubblicazioni scientifiche. Pubblicazione di manuali.

## **Sopravvivenza per tumori (EUROCARE-5)**

Mantenimento e sviluppo della banca dati dei casi di tumore rilevati dai registri tumori europei, includendo tutti i casi diagnosticati recentemente di cui sia disponibile un follow-up:

- Messa a disposizione online della banca dati da parte dei registri che vi contribuiscono, dotandola di un software applicativo per le analisi dei dati.
- Analisi di base della sopravvivenza relativa, monitoraggio delle variazioni recenti della sopravvivenza mediante opportuni indicatori statistici.
- Stima e diffusione dei dati di prevalenza dei tumori, utilizzando le informazioni della banca dati e appropriati metodi statistici messi a punto dal gruppo EUROCARE.
- Indagine approfondita sulla variabili di stadio, sui determinanti dello stadio, e sulla terapia per un campione di casi. Raccolta dei relativi dati nelle aree dei registri tumori italiani, in corrispondenza con analoghe attività previste nelle altre aree europee.
- Centralizzazione e analisi dei dati di sopravvivenza da registri USA e del Canada per valutare le differenze di sopravvivenza tra pazienti europei e nord americani.

### **Risultati attesi nel triennio**

Analisi sistematica centralizzata della sopravvivenza in Europa. Confronti con le sopravvivenza dei pazienti nordamericani. Stima della prevalenza dei tumori nelle aree dei registri europei. Analisi statistica dei dati di sopravvivenza in relazione allo stadio e alla terapia.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati serviranno per valutare l'impatto delle politiche sanitarie e della ricerca di base nel miglioramento della prognosi dei pazienti oncologici a livello di popolazione.

### **Sorveglianza dell'epatite E in Italia: malattia emergente nei Paesi industrializzati (Sorveglianza integrata epidemiologica, virologica, ambientale)**

L'epatite E, infezione nota per essere, in molti Paesi in via di sviluppo, un'infezione endemica a trasmissione feco-orale, nei Paesi industrializzati oggi si presenta invece come malattia emergente: è in aumento infatti il numero di casi autoctoni, nonostante sia sempre stata considerata rara in questi Paesi e confinata ai viaggiatori provenienti da aree endemiche.

In Italia, nonostante valori alti di prevalenza di anticorpi anti-HEV nell'uomo, riportati da diversi studi condotti negli anni '90 (dell'1-3% circa nel centro-nord e del 3-6% nel sud e nelle isole), l'effettivo numero di casi di epatite acuta E diagnosticati e notificati al SEIEVA è relativamente basso. Questa sottostima dei casi di epatite E in Italia è dovuta a quattro fattori principali: carattere spesso sub-clinico dell'infezione; mancata esecuzione delle indagini sierologiche specifiche per l'HEV in molti centri clinici; mancanza di un'adeguata standardizzazione delle metodiche diagnostiche sierologiche; assenza di un saggio di rilevamento del genoma virale commerciale. A ciò si aggiunge il fatto che le fonti di infezione e le modalità di trasmissione dell'infezione autoctona da HEV non siano ben definite.

Obiettivo: valutare la diffusione dell'infezione da HEV in Italia e in particolare stimare l'incidenza di epatite E per area geografica, età e sesso.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati che emergeranno dalla collaborazione scientifica di tutte le UO appartenenti a questo progetto permetteranno di acquisire fondamentali informazioni e conoscenze sulla diffusione dell'infezione da HEV in Italia: verrà fornito un quadro epidemiologico aggiornato dei casi di epatite E con rappresentazione GIS (*Geographic Information System*), con particolare riferimento all'incidenza per area geografica, età e sesso e verrà valutata inoltre la distribuzione dei fattori di rischio. Inoltre con la collaborazione dei centri clinici afferenti alle ASL che segnaleranno i casi di epatite E, sarà possibile una più accurata descrizione dell'espressività clinica dell'infezione.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il sistema di sorveglianza consentirà di promuovere a livello territoriale l'esecuzione delle indagini di diagnosi sierologica. Tutto ciò comporterà un'importante ricaduta in Sanità Pubblica, in quanto sarà possibile suggerire più efficaci e mirate strategie preventive e di controllo dell'infezione (come ad esempio il trattamento delle acque e dei prodotti alimentari) che potranno concretizzarsi in un'ulteriore riduzione della diffusione delle EVA in Italia, da attendersi già a breve termine dalla loro attuazione.

Al contempo si provvederà ad una standardizzazione dei test di diagnosi virologica (*Real time PCR vs Nested PCR*) e sierologica che porterà ad una riduzione della quota di falsi negativi.

### **Sorveglianza della mortalità materna: progetto pilota in Regioni del Nord, Centro e Sud Italia**

Considerata la necessità di disporre di dati affidabili e di qualità per quanto attiene alla mortalità materna, si propone di mettere a punto un modello pilota di sorveglianza attiva della mortalità materna da implementare in alcune Regioni rappresentative per area geografica e per numero di nati dell'intero territorio nazionale. L'attivazione di tale modello pilota permetterà di rilevare i casi incidenti di morte materna e di studiarne i fattori di rischio associati attraverso appositi audit e/o indagini confidenziali, sul modello delle *Confidential Enquires into maternal deaths* britanniche, condotte da panel multidisciplinari di clinici

istituiti a livello regionale. La valutazione prospettica dei nuovi casi, rispetto ai record-linkage retrospettivi, offrirà il vantaggio di agevolare la raccolta di informazioni utili a prevenire i decessi materni evitabili. Oltre alla rilevazione dei casi incidenti attraverso la segnalazione da parte delle strutture sanitarie in cui sarà creata una rete di referenti e la verifica della causa di morte di tutti i decessi delle donne in età riproduttiva, il progetto prevede il proseguimento del record-linkage tra le schede di morte ISTAT e le SDO al fine di validare l'efficacia del sistema nel produrre rilevazioni affidabili.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Organizzazione e implementazione di un modello di sorveglianza della mortalità materna nelle Regioni partecipanti.

Validazione della sua efficacia nel produrre rilevazioni affidabili attraverso il *record-linkage* tra le schede di morte ISTAT e le SDO.

Calcolo del rapporto di mortalità materna grezzo e stratificato per età della madre e modalità di espletamento del parto. Nelle regioni che dispongono dei dati necessari calcolo degli MMR per istruzione e nazionalità delle donne. Descrizione delle cause delle morti materne dirette, indirette e precoci e tardive.

Istituzione di panel multidisciplinari di esperti a livello regionale e realizzazione di procedure di audit e/o indagini confidenziali sui casi incidenti.

Produzione di un rapporto di fine progetto.

Organizzazione di un convegno di fine progetto.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La messa a punto e l'implementazione di un modello di sorveglianza della mortalità materna in alcune regioni Italiane, distribuite sull'intero territorio nazionale, e la validazione della sua efficacia nel produrre rilevazioni affidabili permetterà all'ISS di svolgere un ruolo di coordinamento a livello nazionale delle attività di sorveglianza di questo importante indicatore di esito.

### **Sorveglianza della sicurezza di farmaci e vaccini e valutazione dell'efficacia della vaccinazione antinfluenzale in pediatria**

Lo studio si propone i seguenti obiettivi:

- Stimare il rischio di ospedalizzazione associato all'assunzione di farmaci e/o vaccini per le seguenti patologie: piastrinopenie; lesioni esofago-gastroduodenali; problemi neurologici; malattie muco-cutanee non infettive e vasculiti.
- Stimare l'efficacia del vaccino stagionale nel prevenire episodi di ospedalizzazione per influenza confermata con test di laboratorio.
- Descrivere la frequenza di ospedalizzazione per condizioni diverse da quelle elencate e che sono ritenute sospette reazioni avverse a farmaci e/o vaccini.

Lo studio è una sorveglianza su tutti gli episodi di ricovero tramite pronto soccorso, in 10 ospedali o dipartimenti pediatrici italiani, per alcune condizioni cliniche. Per la stima del rischio di insorgenza di eventi associati all'uso di farmaci o vaccini verrà utilizzato un modello di analisi caso-controllo.

Per la valutazione della efficacia della vaccinazione si prevede l'arruolamento di bambini ricoverati per una ILI (*Influenza Like Illness*). I bambini con diagnosi di ILI saranno sottoposti ad accertamento di laboratorio tramite test di *real time* PCR finalizzato a distinguere gli episodi di ILI attribuibili ai ceppi virali contenuti nel vaccino rispetto agli altri.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Approfondire il ruolo causale dei farmaci e dei vaccini nell'insorgenza di alcune patologie gravi nei bambini.
- Valutare l'efficacia della vaccinazione antiinfluenzale in pediatria.
- Organizzare un sistema di sorveglianza attiva di supporto alla farmacovigilanza nazionale.
- Verificare i segnali di rischio provenienti dalle segnalazioni spontanee attraverso la conduzione di studi epidemiologici formali.
- Stimolare la segnalazione spontanea delle reazioni avverse in pediatria.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Fornire dati all'AIFA per eventuali misure regolatorie, variazioni del riassunto delle caratteristiche del prodotto, modifica delle confezioni, revoca delle autorizzazioni all'immissione in commercio.

I principali risultati finora prodotti hanno riguardato, tra gli altri, problemi neurologici associati a metoclopramide e nafazolina; insorgenza di malattie muco-cutanee e uso di acido niflumico, problemi cardiologici e sovradosaggio di oxatomide. Questi risultati hanno portato a decisioni regolatorie: per l'acido niflumico è stata inviata una *Dear Doctor Letter* e sono state modificate le indicazioni e le reazioni avverse nel foglietto illustrativo; la metoclopramide è stata controindicata in età pediatrica. È stata fatta una rivalutazione del profilo beneficio/rischio di tutti i decongestionanti nasali che hanno portato alla controindicazione dell'uso in età pediatrica. Ritiro di una delle due confezioni di oxatomide in commercio con indicazione pediatrica.

#### **Sorveglianza epidemiologica dei tumori tra i militari inviati in Bosnia e Kosovo**

Il progetto di sorveglianza, nato come prosecuzione dello studio effettuato dalla Commissione Mandelli, si pone l'obiettivo di rilevare la mortalità e possibilmente l'incidenza di neoplasie nella coorte dei militari inviati in missione nei Balcani, e di valutare eventuali eccessi di rischio, a parità di età e area geografica, sia rispetto alla popolazione generale che ad una coorte confrontabile di militari che non abbiano partecipato a missioni all'estero, arruolata nell'arma dei carabinieri. L'analisi viene condotta partendo dall'accoppiamento su base nominativa dei dati relativi ai militari con quelli di mortalità. Per quanto riguarda l'incidenza, si valuterà la possibilità di un linkage probabilistico, non nominativo, con le schede di dimissione ospedaliera.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il programma terminerà alla fine del 2012, termine entro il quale si stimeranno i rapporti standardizzati di mortalità associati al servizio in missione per le principali neoplasie, in funzione della durata della missione, della zona di destinazione e della mansione. Analoghe stime saranno elaborate per quanto riguarda l'incidenza, se il *linkage* con le schede di dimissione si rivelerà affidabile.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati saranno strettamente specifici della particolare coorte e della potenziale situazione di rischio analizzate.

#### **Sorveglianza nazionale delle intossicazioni acute da pesticidi (biocidi e fitosanitari)**

La Direttiva 2009/128/CE, che istituisce un quadro di azione comunitaria per l'utilizzo sostenibile dei pesticidi, richiede che gli Stati membri istituiscano "sistemi" per la raccolta di

informazioni sui casi di intossicazione acuta da pesticidi art. 7, punto 2). Infatti, come indicato dalla WHO e dalla FAO nell'*International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides* (2002, 2009), la sistematica rilevazione e analisi di questi incidenti risulta di fondamentale importanza per migliorare le conoscenze sui rischi da pesticidi per la salute umana e per verifiche sulla sicurezza di modalità di commercializzazione e uso. Presso l'ISS, già a partire dal 2001 è stato avviato un piano di lavoro per l'implementazione e il mantenimento di un sistema nazionale di sorveglianza delle intossicazioni acute da pesticidi (SIN-SIAP). Il Sistema acquisisce e integra tra loro i dati rilevati da CAV, ASL e Regioni. Ogni anno vengono identificati circa 3.000 casi di esposizione, dei quali circa 1.000 risultano casi di intossicazione (40% da biocidi; 60% da fitosanitari). L'analisi di questa base informativa permette di delineare le principali caratteristiche delle intossicazioni acute da pesticidi a livello nazionale e regionale. Il database del SIN-SIAP viene correntemente utilizzato per l'identificazione di problematiche emergenti e di interesse prioritario, per la pianificazione di interventi mirati di prevenzione e normativi e per verifiche sulle loro ricadute.

### ***Risultati attesi nel triennio***

L'attività svolta nell'ambito del SIN-SIAP rende di fatto già operativo e a regime il sistema nazionale per la rilevazione delle intossicazioni acute da pesticidi richiesto dalla Direttiva 2009/128/CE con riferimento ai fitosanitari, anticipandone l'estensione anche ai prodotti biocidi. In considerazione dell'esperienza effettuata, si prevede che nel prossimo triennio verranno notificati al SIN-SIAP circa 9.000 nuovi casi di esposizione pericolosa a pesticidi, dei quali circa 3.000 saranno classificati come casi di intossicazione acuta. Di questi ultimi, circa l'83% risulterà vittima di esposizione accidentale e il 15% di esposizione a fini autolesivi. Le informazioni acquisite permetteranno di fornire indicazioni dettagliate sulle caratteristiche dei casi di intossicazione esposti a biocidi e fitosanitari, rispettivamente. Le analisi dei dati forniranno indicazioni sui prodotti commerciali e i composti chimici più frequentemente associati ai casi di intossicazione e a manifestazioni cliniche di gravità moderata, grave e mortale. Inoltre, la disamina degli ambiti e delle modalità e di esposizione contribuirà all'identificazione dei principali fattori di rischio associati agli incidenti in esame. L'insieme delle osservazioni effettuate fornirà una base informativa per interventi di prevenzione a livello nazionale e regionale. In caso di allerte generate dal SIN-SIAP o da altre fonti informative, il database del sistema verrà utilizzato per approfondimenti e verifiche.

### ***Trasferibilità dei risultati***

I risultati ottenuti verranno utilizzati per la definizione del Piano di Azione nazionale richiesto dalla Direttiva 2009/128/CE agli Stati membri, con particolare riferimento alla formazione e informazione e alla definizione di indicatori di rischio e di efficacia delle azioni intraprese. Inoltre, l'esperienza di gestione del SIN-SIAP potrà contribuire alla definizione di procedure standard condivise a livello europeo per la rilevazione, revisione, classificazione e analisi dei casi di intossicazione da pesticidi. Le analisi effettuate su base annuale contribuiranno a valutazioni sulla sicurezza di uso di agenti specifici e di loro pericolosità, in considerazione dei dati di consumo, frequenza dei casi di intossicazione e gravità di segni/sintomi. Le osservazioni effettuate potranno essere utilizzate a livello regionale per indirizzare la formazione degli agricoltori, in considerazione dei principali fattori di rischio associati alle diverse modalità di esposizione rilevate.

## **Sorveglianza nazionale delle reazioni avverse e degli errori terapeutici esaminati dai centri antiveleni (progetto nazionale FarViCAV)**

Il sistema di farmacovigilanza promosso dall'AIFA in riferimento alla Direttiva 2001/83/CE è stato sino ad ora incentrato sulla segnalazione dell'evento "reazione avversa" definito, secondo quanto indicato dalla stessa normativa, come una reazione nociva (prevista o imprevista) a un medicinale correttamente utilizzato. Tuttavia, la Direttiva 2010/84/EU ha recentemente specificato che la farmacovigilanza deve comprendere anche la rilevazione di effetti nocivi causati da errore terapeutico, abuso o uso improprio intenzionale del medicinale. Il Sistema Informativo promosso e coordinato dall'ISS nel precedente triennio per la sorveglianza delle esposizioni esaminate dai CAV ha evidenziato la rilevanza del contributo informativo di questi eventi per la sistematica caratterizzazione delle diverse tipologie di esposizione pericolosa a farmaci e per la loro prevenzione. Su questa base, è stato avviato in collaborazione con AIFA un nuovo piano di lavoro per la sistematica revisione e analisi dei casi di errore terapeutico rilevati dai CAV e per la loro notifica al sistema di farmacovigilanza regionale e nazionale (Progetto Nazionale FarViCAV). Nell'ambito di questa progettualità è stata prevista la messa a punto di adeguati strumenti operativi per l'inclusione nel sistema di farmacovigilanza anche dei casi con effetti clinici associati ad abuso e uso intenzionalmente improprio del medicinale, comprendendo in quest'ultima tipologia anche l'uso a fini autolesivi.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il Progetto Nazionale FarViCAV prenderà in esame circa 4.000 casi/anno di errore terapeutico e circa 800 casi/anno di reazione avversa a seguito di uso corretto del medicinale. Per quanto riguarda gli errori terapeutici, i dati disponibili permetteranno la caratterizzazione delle diverse modalità di incidente per tipologia di farmaco, prodotto commerciale, gravità degli effetti clinici rilevati. Inoltre, i casi sintomatici rilevati a partire dal 2011 verranno integrati nel sistema di farmacovigilanza regionale e nazionale. I casi di reazione avversa da uso corretto del farmaco saranno caratterizzati in modo analogo e forniranno un contributo alle rilevazioni già in atto. Nell'ambito del Progetto Nazionale FarViCAV verranno anche analizzati circa 6.800 casi/anno di uso intenzionalmente improprio del farmaco, comprendenti circa 6.000 casi/anno di tentato suicidio e circa 200 casi/anno di automedicazione incongrua e circa 600 casi/anno di abuso. Le osservazioni effettuate permetteranno di valutare il contributo che può essere fornito dalla sistematica rilevazione di queste tipologie di evento per la caratterizzazione delle reazioni avverse, nella loro nuova accezione, e per la definizione di appropriati interventi di prevenzione. Inoltre, l'attività svolta permetterà la messa a punto di procedure per la segnalazione e l'integrazione nella farmacovigilanza dei casi sintomatici di uso improprio del farmaco e per lo sviluppo di un flusso informativo dedicato.

### **Trasferibilità dei risultati**

Con riferimento agli errori terapeutici, sarà resa disponibile una base informativa per l'identificazione dei principali fattori di rischio per questa categoria di eventi. In particolare, saranno investigati i determinanti degli incidenti causati da scambio di farmaco, via di somministrazione e posologia errata. Le informazioni disponibili potranno essere utilizzate da AIFA per interventi mirati di tipo normativo e per richieste di modifica delle modalità di confezionamento e commercializzazione di farmaci specifici. La ricaduta degli interventi effettuati potrà essere valutata in tempi stretti seguendo l'andamento temporale della frequenza degli incidenti in esame. Per quanto riguarda il misuso intenzionale del farmaco, verranno prodotti indicatori di pericolosità per categorie di farmaci e farmaco specifici in

considerazione della gravità degli effetti rilevati e della loro frequenza. I dati analizzati saranno disponibile per ulteriori approfondimenti su problematiche emergenti.

### **Sorveglianza sanitaria ed epidemiologia della popolazione della Valle del Sacco esposta a contaminanti ambientali**

Redazione, coordinamento e controllo di qualità del protocollo di valutazione neurologica.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Determinazione del rischio di malattie neurologiche in popolazione esposta ad agenti chimici neurotossici.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Sorveglianza sanitaria di tipo neurologico della popolazione della Valle del Sacco.

### **Sperimentazione dello strumento di raccolta dati e del flusso informativo per la registrazione degli interventi di protesi di anca e la valutazione dell'esito a breve termine**

La valutazione dell'esito di interventi di sostituzione protesica è materia complessa, non basandosi solo sulla valutazione di *end point* facilmente rilevabili come potrebbe essere la mortalità a 30 giorni. L'esito è infatti il risultato di più fattori dipendenti dallo stato di salute del paziente, dal servizio prestatato nell'ospedale e dal dispositivo. Un dispositivo che ha fallito viene registrato dal sistema in quanto il paziente deve necessariamente subire un intervento di revisione. Ma la letteratura mostra che la vita media di un dispositivo *in vivo* è di circa dieci anni: risulta quindi indispensabile mettere a punto metodiche che permettano di valutare l'esito a breve considerando altri fattori. Vi è evidenza che la variabile di esito più sintetica e significativa in questo ambito sia la misura della qualità della vita. Lo studio si propone di: i) validare il questionario HOOS per la misura della qualità della vita; ii) implementare in uno studio multicentrico insieme a Regioni e Società scientifiche nell'ambito del flusso informativo relativo al Registro italiano artroprotesi (anca) la valutazione dell'esito tramite somministrazione del questionario come avviene già in altri paesi del mondo in cui è attivo da anni un Registro nazionale degli interventi (Svezia, Nuova Zelanda, Regno Unito).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Validazione del questionario. definizione del protocollo di implementazione. Elaborazione di procedure di *risk adjustment*. Calcolo di alcuni indicatori individuati all'interno del progetto.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La trasferibilità è immediata: i risultati conseguiti nello studio multicentrico per la sperimentazione della metodologia per la valutazione dell'esito nel breve-medio termine, verranno poi inseriti come protocolli per l'attivazione in seno al registro nazionale degli interventi di artroprotesi.

### **Stima dei percorsi terapeutici e dei costi sanitari dei pazienti oncologici**

In Italia le neoplasie hanno un impatto di rilevanza crescente sul sistema sanitario: il numero di diagnosi di tumore aumenta, anche per effetto della diffusione sul territorio di programmi di screening, e la speranza di vita di chi ha una diagnosi di tumore si allunga di pari passo con la disponibilità di trattamenti sempre più specifici, efficaci, con effetti collaterali moderati o assenti. Tutti questi aspetti si inseriscono in un quadro che vede l'aumento della popolazione anziana, più

colpita dalle patologie neoplastiche, e la diffusione di terapie e farmaci dal costo spesso elevato. In questo panorama diventa strategica l'individuazione dei bisogni sanitari relativi ai pazienti oncologici presenti nella popolazione e dei relativi costi per l'SSN, al fine di una corretta pianificazione dell'offerta sanitaria sul territorio. Il progetto si propone di ricostruire i percorsi terapeutici e i profili di costo dei pazienti oncologici, seguendo uno schema a tre fasi: iniziale, in cui il paziente viene principalmente sottoposto ad accertamenti di tipo diagnostico e ad intervento chirurgico laddove necessario; continua in cui i pazienti sopravvissuti alla prima fase possono continuare trattamenti di tipo radioterapico, chemioterapico o semplicemente essere sottoposti ad accertamenti periodici di monitoraggio; finale per coloro che muoiono dello specifico tumore e che necessitano di trattamenti palliativi e terapie del dolore.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto è finalizzato al raggiungimento dei seguenti obiettivi:

- Offrire una valutazione dei percorsi diagnostico-terapeutici di una coorte di pazienti con tumore (colon-retto o mammella) dalla diagnosi lungo l'intero percorso di malattia fino alla possibile guarigione o ad una fase terminale per i pazienti a peggior prognosi.
- Definire un protocollo di raccolta dei dati intergrando diverse fonti informative di sorveglianza e amministrative.
- Fornire una stima dei profili di costo lungo un percorso di malattia a tre fasi: diagnosi e primo intervento, monitoraggio, fase terminale.
- Stimare i casi prevalenti nelle aree dei registri per l'anno più recente disponibile e della loro distribuzione secondo il percorso a tre fasi, individuando la quota di casi da considerarsi guariti, che non richiedono più risorse sanitarie dedicate.
- Valutare il modificarsi dell'ammontare e della distribuzione dei bisogni sanitari a seguito di specifici interventi di prevenzione secondaria (programmi di screening oncologici) o di cura (diffusione di nuovi farmaci).
- Estendere la metodologia ai registri tumori italiani interessati e ai referenti sanitari regionali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il presente progetto estende una metodologia che è stata già applicata nell'ambito di uno studio pilota finalizzato alla valutazione delle risorse ospedaliere direttamente impiegate per i pazienti affetti da tumore del colon-retto nelle aree dei registri di Toscana e Veneto. L'esperienza pregressa ha permesso di mettere a punto uno strumento di analisi valido per tutte le aree del paese coperte da un registro tumori, per diverse sedi tumorali e in grado di supportare analisi di tipo costo-beneficio relativamente ad interventi di prevenzione, in accordo con quanto previsto dal Piano oncologico nazionale 2011-2013.

#### **Strategie sinergiche per la diffusione della cultura della preservazione della fertilità nei pazienti oncologici: approccio integrato tra medicina della riproduzione e istituzioni**

Fase sperimentale clinico-biologica durante la quale verranno sviluppati e implementati i protocolli di induzione dell'ovulazione e della crioconservazione degli ovociti nei trattamenti della PMA. Le conoscenze verranno traslate alle pazienti oncologiche per "custodirne" la fertilità prima della terapia anticancro e offrire la possibilità futura di una gravidanza. Fase di indagine sui bisogni informativi attraverso: somministrazione di un questionario per analizzare il livello di conoscenza dei pazienti oncologici sulla possibilità di preservare la loro fertilità prima dell'applicazione delle terapie anti-blastiche, analizzare come la perdita parziale-totale della fertilità e la possibilità di avere un figlio incida nella vita e nel processo

di guarigione delle pazienti; creazione di corsi di formazione che abbiamo lo scopo di coordinare l'azione di specialisti oncologici, di esperti della medicina della riproduzione e di psicologi per poter offrire una cura mirata ai pazienti oncologici in età pre-fertile e fertile; somministrazione di un questionario.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Creazione di un sistema di rete, formata da specialisti oncologici, da esperti della medicina della riproduzione e da psicologi, rivolta all'assistenza delle pazienti infertili e con patologie neoplastiche. Validazione di un protocollo specifico di riproduzione assistita con stimolazione ormonale breve e crioconservazione ovocitaria efficiente dedicato alle pazienti oncologiche. Ottimizzazione dei protocolli di assistenza e trattamento nei pazienti infertili e/o neoplastici con tecniche di procreazione medicalmente assistita e indiretta riduzione del consumo di farmaci ormonali utilizzati nei cicli di stimolazione. Offerta di moduli formativi che potranno essere ripetuti nelle diverse realtà territoriali per diffondere la cultura specifica della crioconservazione della fertilità in pazienti oncologici con metodologie appropriate e specifiche rispetto alle neoplasie trattate.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Contribuire all'attuazione di un approccio inquadrato nell'assistenza al paziente oncologico, non solo in campo riproduttivo, ma di sviluppare percorsi diagnostico terapeutici e assistenziali integrati che vedano coinvolti ospedale, pazienti e territorio per garantire al malato una presa in carico globale. Valutazione e proposta e di elementi da introdurre in un counselling mirato a tali problematiche.

### **Studi epidemiologici descrittivi e analitici nel settore delle malattie infettive (legionellosi, malattie batteriche invasive-meningococco, Hib, pneumococco, morbillo, rosolia in gravidanza e congenita, malattie trasmesse da vettori, West Nile virus, Chikungunya e Dengue; antibioticoresistenza)**

Gli studi epidemiologici descrittivi e analitici sono una componente essenziale nel controllo delle malattie infettive perché consentono di identificare fattori di rischio e verificare l'efficacia delle misure preventive. Alcune malattie, data la possibile esposizione a fattori di rischio ambientale e a vettori (legionellosi, Chikungunya, Dengue, malattia di West Nile) o a causa dell'elevata trasmissibilità (morbillo e rosolia), così come l'emergenza di nuovi ceppi di batteri resistenti ai diversi antibiotici, e il conseguente rischio di malattia severa con costi notevolmente più elevati per la società, richiedono la raccolta di informazioni dettagliate ai fini dell'attuazione di tempestive misure di controllo.

Gli studi descrittivi condotti presso il CNESPS permettono di monitorare l'andamento delle malattie sopra elencate e delle resistenze di alcuni patogeni selezionati (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis/faecium*, *Klebsiella pneumoniae/ oxytoca*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) e di identificare aree di interesse per la conduzione di studi analitici i cui risultati possano rappresentare importanti risorse per l'identificazione di azione di controllo. La recente comparsa di una situazione quasi endemica di *Klebsiella pneumoniae* resistente ai carbapenemi in molti ospedali Italiani rappresenta un esempio di situazione inattesa che necessita l'approfondimento descrittivo e analitico.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Descrizione dell'andamento in Italia dell'incidenza delle principali malattie infettive in sorveglianza (Chikungunya e Dengue, *West Nile Virus Neuroinvasive Disease* – WNND, legionellosi, antibioticoresistenza, morbillo, rosolia in gravidanza e rosolia congenita), della letalità e di eventuali focolai epidemici.

Descrizione, inoltre, di eventuali fattori di rischio per l'acquisizione di alcune malattie.

### **Trasferibilità dei risultati**

I dati acquisiti mediante gli studi epidemiologici descrittivi delle malattie sopra elencate verranno utilizzati sia per la valutazione dell'efficacia degli interventi di sanità pubblica già in atto che per l'ulteriore pianificazione. Inoltre i dati, laddove richiesto, verranno periodicamente trasferiti nel sistema TESSy dell'ECDC.

## **Studi epidemiologici sulla sindrome influenzale e la vaccinazione antinfluenzale**

La conoscenza e la stima dell'impatto che l'influenza ha sulla popolazione è cruciale per indirizzare al meglio le misure di sanità pubblica da attuare. Pertanto la stima l'impatto dell'influenza nel nostro Paese è ancora più importante, proprio perché in Italia rispetto al resto d'Europa potrebbe essere maggiore. Inoltre, i risultati potranno essere utilizzati per l'implementazione di modelli matematici nazionali per stimare l'impatto delle stagioni influenzali degli ultimi anni sulla popolazione italiana, in termini di mortalità e morbilità e il suo impatto sul sistema sanitario nazionale in termini di ospedalizzazioni e l'accettabilità ed efficacia della vaccinazione antinfluenzale. In Italia dal 1999 è attivo un Sistema di Sorveglianza della sindrome influenzale InFluNet. Purtroppo, in Italia come nel resto d'Europa, questi sistemi di sorveglianza sono soggetti al problema della sottotifica e per questo motivo, stimare l'impatto dell'influenza sulla popolazione può diventare problematico. Pertanto vengono anche utilizzate delle misure indirette, attraverso dei modelli, che permettono di stimare l'eccesso di mortalità e di ospedalizzazioni attribuibili ad influenza. Inoltre, la vaccinazione antinfluenzale nei gruppi a rischio è un'attività di prevenzione mirata a: rallentare la diffusione del virus nella comunità e a prevenire le complicanze così da ridurre diffusione, gravità e letalità delle epidemie stagionali.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- Miglioramento delle conoscenze sull'andamento e l'impatto dell'influenza, da affiancare a quelle ottenute attraverso la sorveglianza clinico-epidemiologica e virologica, utilizzando dati alternativi per confrontare l'andamento delle stagioni e per valutarne meglio l'impatto sociale.
- Stima dell'eccesso di ospedalizzazioni e mortalità attribuibile ad influenza per valutare, anche, la presenza di gradienti geografici di diffusione, da utilizzare in modelli per la previsione di un'eventuale pandemia.
- Stima dell'efficacia della vaccinazione antinfluenzale attraverso il metodo di screening e attraverso uno studio analitico di tipo caso-controllo.
- Studio sulla reattogenicità dei vaccini antinfluenzali in uso in età pediatrica (sei mesi – cinque anni).
- Studio di coorte retrospettivo per acquisire conoscenze specifiche sugli effetti a lungo termine del vaccino pandemico adiuvato FOCETRIA utilizzato in Italia nella stagione 2009/2010 attraverso uno studio di follow-up da effettuarsi in una coorte di donne gravide vaccinate. Nelle donne reclutate nello studio saranno valutati l'esito della gravidanza delle donne vaccinate con vaccino pandemico e delle donne non vaccinate (tipologia del parto, età gestazionale al parto, eventuali ricoveri nel post-partum) e le condizioni dei neonati da madre vaccinata e non.

### **Trasferibilità dei risultati**

Gli studi permetteranno di ottenere dati solidi per comprendere l'impatto della malattia sul sistema sanitario nazionale. Descrivere dettagliatamente al livello nazionale e regionale, l'eccesso di mortalità e di ospedalizzazioni, è cruciale per poter programmare al meglio la

ricaduta sul sistema sanitario di questa malattia. Inoltre, la valutazione della sicurezza e dell'efficacia di campo della vaccinazione antinfluenzale stagionale e pandemica è essenziale per valutare le raccomandazioni adottate e per definire nuove strategie di utilizzo del vaccino.

### **Studi sui determinanti genetici e ambientali della psicopatologia e di aspetti di personalità rilevanti per la salute**

Questa linea di ricerca si svolge in stretta collaborazione tra il Reparto Salute mentale il Reparto Epidemiologia Genetica del CNESPS. Alcuni progetti di ricerca sui gemelli hanno fornito o forniranno l'occasione di condurre studi sulle componenti genetiche e ambientali di numerose variabili di interesse in salute mentale tra cui soddisfazione di vita, l'ottimismo, l'autostima, la regolazione emozionale, la sicurezza nelle relazioni interpersonali strette, i tratti prepsicotici, i tratti autistici, la resistenza allo stress, al propensione al rischio.

Ogni variabile di interesse è misurata mediante uno strumento di valutazione specifico e altamente validato. Viene inoltre data a ogni soggetto la possibilità di donare un campione di saliva da acquisire nella banca biologica del CNESPS per successive indagini di genetica molecolare.

Per studiare l'ereditarietà delle variabili di interesse e gli eventuali modificatori ambientali della suscettibilità genetica individuale, si utilizza il metodo dei gemelli, basato sul confronto tra il livello di somiglianza fenotipica in gemelli MZ e DZ estratti dal Registro Nazionale Gemelli. Per l'analisi dei dati si utilizzano appositi modelli di equazioni strutturali: l'ereditabilità di un endofenotipo viene stimata esaminando la sua correlazione nelle coppie MZ e DZ. Eventuali interazioni gene-ambiente vengono saggiate stimando l'ereditabilità in sottogruppi con diversa esposizione a specifici fattori ambientali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Questo tipo di studi fornisce stime dell'ereditarietà di aspetti psicopatologici e di aspetti della personalità rilevanti per la salute sia mentale che fisica. In particolare, consente di stimare la relativa influenza esercitata su ogni variabile dai fattori genetici, dai fattori ambientali condivisi nelle famiglie, e dai fattori ambientali specifici per ogni individuo.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati di questi studi saranno utili per pianificare future indagini di genetica molecolare, fornire elementi per l'identificazione di gruppi a maggior rischio che possano essere oggetto di strategie di screening e diagnosi precoce, e identificare gli aspetti di personalità disfunzionali correlati a rischio per la salute che in base al peso relativo dei fattori genetici e ambientali si prestino maggiormente a beneficiare di interventi psicosociali.

### **Studio comparative multicentrico tra una terapia nutrizionale e una terapia biologica (terapia con anticorpo monoclonale anti-TNF) nell'induzione e mantenimento della remissione nel morbo di Crohn pediatrico: *trial* clinico randomizzato**

Il morbo di Crohn è una malattia intestinale immunomediata; esso ha un forte impatto sulla salute e sulla qualità della vita poiché il suo corso è caratterizzato da recidive ricorrenti, inoltre il trattamento rimane una sfida per i clinici in quanto le terapie tradizionali non sono in grado di modificare il corso della malattia.

È comunemente riconosciuto che agenti biologici da soli o una terapia nutrizionale da sola possono favorire una remissione a lungo termine. Non ci sono però studi che confrontano le due terapie né negli adulti né nei bambini.

Obiettivo di questo studio è un confronto tra la terapia nutrizionale da sola e una terapia biologica (terapia con anticorpo monoclonale anti-TNF), nell'induzione e il mantenimento della remissione in bambini (età 6-18 anni) con il morbo di Crohn in fase moderata o severa.

#### **Risultati attesi nel triennio**

L'outcome principale è la percentuale di pazienti che hanno sia una remissione clinica sia una cicatrizzazione delle mucose intestinali. Questa percentuale verrà valutata nei due gruppi di trattamento. Il risultato atteso è che la terapia nutrizionale abbia una efficacia paragonabile a quella della terapia biologica, ma con minori effetti collaterali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questo trial sarà di grande interesse per i pazienti e per i clinici e può avere un grande impatto per l'SSN. Una efficacia della terapia nutrizionale paragonabile a quella della terapia biologica può aprire nuovi scenari terapeutici nella gestione non farmacologica di pazienti pediatrici con disordini immunomediati.

### **Studio del fenomeno suicidario**

La linea di ricerca intende fornire un quadro epidemiologico aggiornato del fenomeno suicidario a livello nazionale, regionale e sub-regionale utilizzando tecniche statistiche atte a stimare variazioni del trend nella popolazione generale e nei diversi sottogruppi di popolazione.

Particolare attenzione verrà posta al monitoraggio del fenomeno in alcune aree del Paese e alcuni sottogruppi di popolazione a più alto rischio e/o potenziali target per interventi di prevenzione mirati (adolescenti, anziani, residenti in aree deprivate, pazienti psichiatriche, detenuti, stranieri). Poiché la WHO e la CE indicano tra le azioni efficaci per ridurre i tassi di suicidio anche la riduzione della disponibilità e accesso ai mezzi utilizzati per attuare il suicidio (come le armi da fuoco e le sostanze tossiche), l'analisi verterà anche sulle variazioni dei metodi utilizzati per attuare il gesto suicidario. Lo studio è frutto di una collaborazione scientifica con il NESMOS (Unità Operativa Complessa di Psichiatria, Centro per lo Studio e per la Prevenzione dei Disturbi dell'Umore e del Suicidio) che rappresenta uno dei principali poli al mondo di ricerca scientifica nel campo del suicidio, inoltre il responsabile del Centro per lo Studio e per la Prevenzione dei Disturbi dell'Umore e del Suicidio è anche il referente italiano della *International Association for Suicide Prevention* (IASP) che a sua volta è affiliata alla WHO come organizzazione chiave nella prevenzione del suicidio.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono così sintetizzabili:

- descrizione aggiornata dei trend temporali e della variabilità geografica dei tassi di mortalità per suicidio per genere, età e metodo utilizzato per attuare il suicidio;
- stima del fenomeno dei *masked suicide*;
- stima delle differenze per genere, stato civile, livello di istruzione e cittadinanza;
- valutazione della possibilità di ottenere stime affidabili dei tentativi di suicidio a partire dai dati SDO.

Lo studio si baserà prioritariamente di tre fonti esaustive di dati "correnti": i) i dati di mortalità di fonte ISTAT (codificati secondo la *International Classification of Disease*), ii) il database delle "concause" di morte (contenente per ciascun soggetto deceduto in Italia tutte le informazioni presenti sul certificato di decesso) sempre di fonte ISTAT e, iii) la base dati delle SDO del Ministero della Salute. Tali fonti di dati saranno integrate e completate da informazioni provenienti da altre fonti amministrative e ospedaliere (in particolare dati

raccolti presso il NESMOS, UOC di Psichiatria, Centro per lo Studio e per la Prevenzione dei Disturbi dell'Umore e del Suicidi).

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il monitoraggio dei trend temporali e l'identificazione di sottogruppi di popolazione ad alto rischio potrà fornire un utile contributo alla definizione di politiche di prevenzione del suicidio e alla programmazione di interventi volti alla promozione della salute mentale.

### **Studio del sonno in un campione di gemelli italiani**

Il sonno è un processo fisiologico attivo che coinvolge l'interazione di componenti multiple del sistema nervoso centrale e autonomo. I disturbi del sonno sono molto più frequenti e molto più comuni di quanto si possa pensare. Persone di tutte le età riferiscono spesso di non riuscire a dormire sufficientemente, di non riposare bene o di avere difficoltà ad addormentarsi. A tale scopo il Registro Nazionale Gemelli ha recentemente avviato una indagine che si propone di studiare il ruolo dei fattori genetici e ambientali nella qualità del ciclo sonno-veglia. Vengono coinvolti nello studio coppie di gemelli adolescenti (15-17 anni) e giovani adulti (18-50 anni).

In letteratura esistono diversi strumenti per l'autovalutazione del sonno. Il Registro ha deciso di adottare un questionario costruito in italiano e validato che consente una valutazione dei disturbi del sonno secondo i criteri del DSM-IV (Violani *et al. Brain Res Bull* 2004;63(5):415-21).

Il positivo incremento nell'utilizzo di Internet e delle nuove tecnologie in tutte le fasce di età, e soprattutto tra le categorie della popolazione più avanti con l'età, ha spinto il Registro Gemelli ad adottare nuove strategie nella somministrazione dei questionari e nella raccolta dei dati. I gemelli maggiorenni vengono contattati per e-mail dal registro e invitati a compilare online il questionario.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Nel corso di un anno verranno contattati e invitati a partecipare allo studio circa 3.500 gemelli, di questi 2.000 maggiorenni e 1.500 minorenni. I gemelli maggiorenni compileranno il questionario via web e i minorenni quello cartaceo arrivato per posta. Al termine della raccolta dati verranno analizzati i punteggi totali e aggregati secondo prefissati cut-off al fine di valutare il ruolo dei fattori genetici e ambientali (condivisi e non condivisi) nella variabilità dei disturbi del sonno.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questo studio costituisce la prima sperimentazione per il Registro Nazionale Gemelli di una ricerca svolta sul web. L'utilizzo di questo strumento consentirà di acquisire velocemente i dati e procedere alla loro analisi. La possibilità di individuare e distinguere l'influenza ereditaria da quella ambientale nella qualità del ciclo sonno-veglia rappresenta un punto importante sia in termini di ricerca sia per la prevenzione nella popolazione generale di questi disturbi.

### **Studio del trend in discesa della mortalità coronarica e cerebrovascolare: applicazione del modello IMPACT**

In Italia la mortalità per cardiopatia coronarica ha avuto un andamento in discesa a partire dagli anni '70. Con i dati disponibili di incidenza, prevalenza, consumo di farmaci, trattamenti chirurgici, ricoveri ospedalieri, fattori di rischio, utilizzando il modello IMPACT, realizzato dall'Università di Liverpool e validato in altri Paesi europei, Nuova Zelanda, Cina e USA, è stato valutato l'andamento in discesa della mortalità per cardiopatia coronarica in

Italia tra il 1980 e il 2000, identificando la parte attribuibile alle procedure terapeutiche in prevenzione secondaria, ai trattamenti in prevenzione primaria, e ai cambiamenti dei fattori di rischio nella popolazione dovuti alla modificazione dello stile di vita.

Dal 1980 i tassi di mortalità coronarica aggiustati per età sono diminuiti negli uomini e nelle donne di età 25-84 anni, producendo nel 2000 42.930 morti coronariche in meno. Circa il 40% di questa diminuzione è dovuta ai trattamenti specifici e circa il 55% è dovuta ai cambiamenti nei maggiori fattori di rischio cardiovascolare nella popolazione italiana, principalmente la riduzione della pressione arteriosa (25%), e della colesterolemia totale (23%).

Sulla base di questa esperienza, l'obiettivo è quello di sviluppare il modello IMPACT per valutare il trend in discesa della mortalità coronarica nell'ultimo ventennio in termini di anni di vita guadagnati, ed elaborare un modello per la spiegazione dell'andamento in discesa della mortalità per ictus.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Spiegare il trend in discesa della mortalità coronarica nell'ultimo ventennio in Italia in termini di anni di vita guadagnati.

Spiegare, attraverso l'occorrenza degli eventi cerebrovascolari, il consumo di farmaci, il numero dei ricoveri ospedalieri e i trend dei fattori di rischio l'andamento in discesa della mortalità cerebrovascolare negli ultimi decenni nella popolazione adulta italiana in modo da identificare la parte attribuibile alle procedure terapeutiche in prevenzione secondaria, ai trattamenti in prevenzione primaria e ai cambiamenti dei fattori di rischio nella popolazione dovuti alla modificazione dello stile di vita. L'implementazione del Modello IMPACT prevede le attività di revisione bibliografica, raccolta dati, aggiornamento del modello e analisi.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La spiegazione del trend in discesa della mortalità coronarica e cerebrovascolare tra il 1980 e il 2000 fornisce ai professionisti della salute e agli amministratori le basi per comprendere gli effetti e le potenzialità delle strategie di prevenzione e di cura basate sulla modificazione dei fattori di rischio nella popolazione sia attraverso l'adozione di stili di vita sani, sia attraverso il trattamento farmacologico e chirurgico della malattia nella fase acuta, in prevenzione primaria e in prevenzione secondaria. I risultati di questo lavoro consentono inoltre di confrontare, nel ventennio considerato, gli effetti sulla riduzione della mortalità coronarica di trattamenti e modificazioni degli stili di vita con i risultati degli altri Paesi su cui è stato applicato lo stesso modello. Ciò è fondamentale per sviluppare e valutare politiche sanitarie e strategie di prevenzione, pianificare servizi sanitari e spese sanitarie.

#### **Studio di follow-up dei casi segnalati nel corso del primo anno di sorveglianza sentinella dei disturbi mentali gravi (progetto SEME)**

Nell'ambito del Progetto SEME (Sorveglianza epidemiologica integrata in salute mentale) è stato realizzato il primo sistema nazionale di sorveglianza sentinella dei disturbi mentali più gravi, in grado di rilevare la frequenza dei casi di specifici disturbi mentali gravi, giunti per la prima volta all'osservazione di una rete di 22 Centri di Salute Mentale (CSM) sentinella. Tra il 2009 e il 2010 sono stati segnalati 343 nuovi casi dei disturbi mentali oggetto di indagine, con una frequenza pari a circa 18 nuovi casi trattati per 100.000 abitanti in un anno. È attualmente in corso uno studio di follow-up di questi casi, che sono stati diagnosticati con una metodologia accurata e riproducibile del tutto innovativa nel panorama nazionale. Lo studio proseguirà nel corso del 2012.

### **Risultati attesi nel triennio**

La valutazione di follow-up dei casi segnalati nel primo anno si propone di acquisire informazioni sulla continuità delle cure dei pazienti affetti dai disturbi mentali più gravi a livello di una rete di CSM, di valutare l'appropriatezza del trattamento specialistico di questi utenti e la stabilità della diagnosi psichiatrica nel tempo.

### **Trasferibilità dei risultati**

L'effettuazione dello studio di follow-up renderà disponibili per la prima volta nel panorama nazionale informazioni raccolte con metodologia riproducibile sull'efficacia, l'appropriatezza e la continuità delle cure prestate ai nuovi pazienti affetti dai disturbi mentali più gravi. Considerando che il bacino di utenza dei 22 CSM partecipanti alla rete sentinella raggiunge nel complesso circa i due milioni di abitanti, i risultati raggiunti presenteranno una discreta generalizzabilità esterna, nonostante l'arruolamento dei centri sia avvenuto su base volontaria. Le informazioni raccolte saranno pertanto utili per individuare punti di forza ed eventuali criticità nel funzionamento e nell'organizzazione dei servizi specificamente orientati alla cura della tipologia di pazienti oggetto di indagine.

## **Studio gemellare sui correlati biologici del benessere psicologico**

In questo progetto, proposto nell'ambito del Bando per Giovani Ricercatori (Ricerca Finalizzata 2010), sarà condotto uno studio su una coorte di gemelli allo scopo di investigare i fattori genetici e ambientali alla base del benessere psicologico e della sua associazione con parametri biologici rilevanti per la salute, con particolare riguardo a marker di tipo immunitario e cardiovascolare. Il progetto, di durata triennale, prevede una collaborazione tra il Reparto di Epidemiologia Genetica dell'ISS con i Reparti di Salute Mentale, Tossicologia Genetica e Malattie immuno-mediate dell'ISS, e una collaborazione con la Facoltà di Psicologia 2 dell'Università Sapienza. Almeno 2.000 coppie di gemelli del Registro Nazionale Gemelli saranno reclutate nello studio. Il primo anno sarà dedicato al reclutamento dei gemelli e alla somministrazione di questionari riguardanti varie misure di benessere psicologico. Nel secondo anno, sarà completata la raccolta dei dati psicologici, e almeno 300 coppie di gemelli saranno invitate in ISS per la raccolta dei campioni biologici, che saranno conservati nella banca biologica del CNESPS. Durante il terzo anno, sarà ultimata la raccolta dei dati biologici e sarà effettuata l'analisi statistica dei dati psicologici e biologici.

### **Risultati attesi nel triennio**

Questo studio sarà il primo al mondo ad esplorare la relazione genetica e ambientale tra il benessere psicologico (inclusi i tratti di personalità ad esso associati) e parametri biologici rilevanti per la salute. Quindi, oltre a testare l'associazione tra salute mentale e outcome di tipo biologico (immunitario e cardiovascolare), che rappresenta un settore di ricerca di estremo interesse, il nostro scopo principale è quello di determinare, per la prima volta, se e in quale misura il benessere psicologico e i suoi correlati biologici condividono gli stessi determinanti genetici e ambientali.

Ci aspettiamo di raggiungere i seguenti obiettivi: i) stimare il ruolo dei fattori genetici (cioè dell'ereditabilità) e ambientali nell'espressione di varie misure di benessere psicologico; ii) valutare la relazione tra il benessere psicologico e una serie di parametri biologici rilevanti per la salute; iii) stimare la correlazione genetica e ambientale tra il benessere psicologico e i parametri biologici considerati.

I campioni biologici (sangue e saliva), raccolti sui gemelli e conservati nella banca del CNESPS, costituiranno anche una preziosa risorsa per futuri studi di genetica molecolare.

### **Trasferibilità dei risultati**

La valutazione della componente ambientale del benessere psicologico nella popolazione italiana fornirà informazioni utili riguardo alla fattibilità di strategie basate su interventi di tipo ambientale, finalizzate alla promozione della salute mentale. La valutazione di interazioni di tipo geni-ambiente sarà di aiuto nell'identificare fattori ambientali in grado di modificare l'espressione della predisposizione genetica individuale al benessere psicologico; sulla base di questi fattori, sarà possibile una migliore pianificazione degli interventi ambientali.

La quantificazione della base genetica e ambientale della relazione tra benessere psicologico e funzionalità biologica fornirà evidenze su nuovi meccanismi rilevanti per la salute.

### **Studio italiano dell'impiego nella pratica clinica routinaria degli Interferoni Peghilati per la terapia dell'epatite cronica C**

I dati di efficacia disponibili sulla terapia con Interferone Peghilato e Ribavirina della epatite cronica C sono derivati, in massima parte, da ampi studi di registrazione. Questi studi hanno arruolato pazienti privi di comorbidità, che rappresentano la categoria maggiormente suscettibile di risposta alla terapia, ma non riflettono il paziente che si incontra quotidianamente nella pratica clinica reale

**Obiettivi:** valutare l'efficacia della terapia con Interferoni Peghilati nella popolazione generale dei pazienti affetti da epatite cronica C al fine di ottimizzare la terapia ed elaborare linee guida terapeutiche per i pazienti difficili da trattare e con presenza di comorbidità.

**Metodi:** studio osservazionale retrospettivo-prospettico condotto su un campione randomizzato di centri di riferimento primario e terziario. Popolazione in studio: tutti i pazienti cui è stata prescritta terapia per l'epatite cronica C nei 12 mesi antecedenti l'inizio dello studio (fase retrospettiva) e tutti i soggetti anti-HCV positivi che consecutivamente faranno riferimento ai centri partecipanti nei 12 mesi susseguenti l'inizio dello studio (fase prospettica).

Indicazione ed eleggibilità al trattamento, schema di trattamento e la sua eventuale sospensione verranno decisi indipendentemente da ciascun centro clinico partecipante.

L'efficacia della terapia verrà valutata sulla base della negatività del test per l'HCV-RNA effettuato sei mesi dopo la sospensione del trattamento.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Stima del tasso reale di candidabilità al trattamento.
- Stima dell'efficacia della combinazione terapeutica Peg-Interferone e Ribavirina nella pratica clinica.
- Confronto fra l'approccio terapeutico dei Centri di riferimento terziario e quello dei Centri di riferimento primario.
- Stima del rapporto costo/beneficio.
- Disponibilità di linee guida basate sulle caratteristiche del singolo paziente, in particolare per i soggetti difficili da trattare o con comorbidità.
- Riduzione dell'impatto medico ed economico dei trattamenti inefficaci.

### **Trasferibilità dei risultati**

In questo studio verranno confrontati due interferoni peghilati, nel trattamento dell'epatite cronica da HCV. Grazie alla stima del rapporto costo/beneficio, sarà possibile scegliere, in base alle diverse comorbidità presenti, il trattamento migliore.

Questo consentirà di trattare in maniera più appropriata il singolo paziente consentendo anche una riduzione dell'impatto economico del trattamento con interferone sull'SSN.

## **Studio osservazionale per la valutazione di appropriatezza, efficienza ed efficacia delle procedure AVR-TAVI nel trattamento della Stenosi Aortica**

La stenosi aortica sintomatica severa (SASS) colpisce oltre il 40% dei pazienti valvolari anziani con esiti invalidanti e riduzione della sopravvivenza se non adeguatamente trattata. L'intervento di sostituzione valvolare aortica (AVR) nei pazienti in età più avanzata e con gravi comorbidità è spesso gravata da un elevato rischio operatorio. Per i pazienti ad alto rischio si è recentemente reso disponibile un nuovo approccio terapeutico: l'impianto transcateretere di una bioprotesi valvolare (TAVI). OBSERVANT rappresenta il primo studio nazionale osservazionale sull'efficacia comparativa dei trattamenti TAVI, AVR e terapia medica nella popolazione di pazienti SASS.

OBSERVANT è finanziato dal Ministero della Salute ed è svolto in collaborazione con Agenas e con le società scientifiche Società Italiana di Chirurgia Cardiaca (SICCH), Società Italiana di Cardiologia Invasiva (SICI-GISE) e *Italian Association of Cardiothoracic Anesthesia* (ITACTA). Lo studio OBSERVANT è uno studio di coorte prospettico osservazionale multicentrico e come tale prevede l'arruolamento di tutti i pazienti SASS ricoverati in ospedale per sottoporsi a trattamento. Per ciascun paziente vengono raccolte informazioni che riguardano caratteristiche demografiche, stato di salute e presenza di comorbidità, e tipo di trattamento (sito WEB). Gli *endpoint* analizzati sono la mortalità a 30 gg dall'intervento, la mortalità a 12 e 24 mesi, e l'incidenza intra-ospedaliera di eventi cardio e cerebrovascolari maggiori.

### **Risultati attesi nel triennio**

Le attività previste in OBSERVANT consentiranno di produrre i seguenti risultati:

- valutazione degli esiti a breve, medio e lungo termine dei trattamenti considerati;
- descrizione di uso, appropriatezza, impatto economico e organizzativo per le procedure AVR e TAVI;
- elaborazione di “criteri di indirizzo” per una corretta selezione dei pazienti SASS da inviare alle procedure AVR e TAVI;
- costruzione di una nuova misura di stratificazione del rischio, adeguata alla popolazione italiana e utilizzabile anche su pazienti di età avanzata;
- stesura di linee guida, condivise dai sistemi sanitari regionali, per una codifica univoca delle procedure AVR e TAVI per il controllo amministrativo del fenomeno.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati dello studio OBSERVANT potranno essere direttamente trasferiti ai professionisti e ai decisori politici e costituiranno un valido supporto per scelte mediche basate sull'evidenza e processi decisionali.

Le istituzioni centrali potranno disporre di uno strumento aggiuntivo per l'ottimizzazione delle risorse prendendo in carico una procedura/trattamento solo se valutata di provata efficacia.

I risultati di questo progetto potranno essere utili alla società scientifiche e ai singoli professionisti per le loro valutazioni interne relativamente alla qualità delle prestazioni fornite ai cittadini.

Anche il cittadino potrà usufruire delle informazioni derivanti da questo progetto, opportunamente interpretate e rielaborate da figure di riferimento quali gli MMG, per arrivare a compiere scelte più consapevoli nell'ambito delle cure fornite dall'SSN.

### **Studio pilota: indagine esplorativa sulla vaccinazione antinfluenzale in età pediatrica, stagione 2011/2012**

Studio osservazionale prospettico condotto presso i servizi vaccinali nelle ASL di quattro Regioni (Campania, Emilia-Romagna, Liguria, Lombardia) con arruolamento della popolazione in studio durante la campagna di vaccinazione 2011-12. Nello studio verrà incluso qualsiasi vaccino anti-influenzale somministrato alla popolazione in studio.

La popolazione di riferimento è rappresentata dai bambini di età compresa tra sei mesi e cinque anni che si presenteranno per eseguire la vaccinazione antinfluenzale nel servizio vaccinale delle ASL partecipanti.

In ogni ASL partecipante saranno arruolati tutti i bambini di età compresa fra sei mesi e cinque anni che si presenteranno per eseguire la vaccinazione antinfluenzale. Non sono previsti criteri di eleggibilità oltre all'età e alle ASL partecipanti. Sarà richiesto il consenso informato per la partecipazione al genitore del bambino e per permettere di richiamare la famiglia dopo la vaccinazione. Per la raccolta dei dati verranno predisposti strumenti standardizzati di raccolta (piattaforma web per l'inserimento dei dati, diario del vaccinato). I dati verranno centralizzati all'ISS che effettuerà anche l'analisi.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Stimare la fattibilità di uno studio osservazionale prospettico al livello nazionale per valutare la sicurezza dei vaccini antinfluenzali in età pediatrica (sei mesi – cinque anni) anche per migliorare le conoscenze e migliorare il livello di adesione della campagna vaccinale antinfluenzale.

### **Supporto alle capacità di analisi e di scambio di tempestive informazioni tra operatori sanitari su temi di epidemiologia e sanità pubblica**

Il progetto si propone di aumentare l'offerta e l'utilizzazione di informazioni sui temi urgenti e emergenti di salute pubblica e lo scambio di informazioni tra operatori sanitari su temi di epidemiologia e sanità pubblica. Il sito svilupperà altre funzioni che permetteranno agli operatori delle regioni di produrre documenti di informazione o di lavoro (esempio interventi, progetti, valutazioni) di scambiare e confrontare materiali informativi o di progetto sulle attività svolte localmente, di pubblicare resoconti di esperienze, di condividere grazie a tecniche asincrone idee e proposte per produrre documenti condivisi, di identificare best practices nel campo dell'epidemiologia applicata e di condividerle. L'aggiornamento settimanale permetterà al sito di essere tempestivo nel fornire le informazioni e gli approfondimenti operativi strategici per gli operatori sanitari. Si sono predisposti ampi spazi per le esperienze e gli scambi regionali e sui temi selezionati si metteranno a disposizione di strumenti on-line per operatori, come pacchetti di diapositive monografiche su diversi temi di salute da utilizzare per presentazioni e convegni; azioni da intraprendere per la prevenzione basati sulle linee guida nazionali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

La pubblicazione e la manutenzione del sito di epidemiologia per operatori sanitari otterrà almeno 8.000 accessi giornalieri, delineando una mappa dell'epidemiologia sul territorio italiano e permettendo alle strutture locali di pubblicare risultati, quindi di acquisire maggiore visibilità e condividere esperienze; contribuirà a costituire uno spazio comune da poter utilizzare nel contesto della creazione di una rete regionale.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La messa a disposizione dell'informazione tempestiva e adeguata per supportare l'azione nel campo dell'epidemiologia applicata ha come effetto principale la creazione di reti attorno

a iniziative di sorveglianza, di ricerca, di interventi assistenziali di portata nazionale o multi regionale. Tali reti, appoggiandosi al materiale formativo e agli strumenti operativi messi a disposizione sul sito, estenderanno reti e azioni a livello locale, regionale e di azienda sanitaria locale. La struttura e il funzionamento del sito potrà ispirare altre realtà nazionali e locali per l'identificazione e la messa in opera di iniziative simile volte alla diffusione della cultura epidemiologia in supporto alla salute pubblica delle Regioni.

### **Sviluppo e produzione degli indicatori di esito per SIVeAS**

La potenziale eterogeneità dei servizi sanitari regionali, accompagnata dal diritto dei cittadini ad usufruire dei servizi dell'SSN in tutto il territorio nazionale, impone azioni di valutazione e di controllo degli esiti degli interventi per assicurare equità nell'accesso alle cure e nella loro efficacia. Il SIVeAS è un sistema realizzato presso il Ministero della Salute al fine di verificare che i finanziamenti siano effettivamente tradotti in servizi per i cittadini, secondo criteri di efficienza e appropriatezza. Il programma "Sviluppo e produzione degli indicatori di esito per SIVeAS" ha quale obiettivo principale quello di promuovere l'*accountability* di tutti gli attori del sistema sanitario fornendo informazioni valide e riproducibili attraverso lo svolgimento delle seguenti funzioni:

- definire e misurare gli esiti di una serie di interventi sanitari, frutto di quanto sperimentato durante lo svolgimento del programma "Mattone-Misura dell'Outcome";
- definire e misurare nuovi indicatori di esito, specifici per alcune malattie croniche;
- misurare la variabilità di esito dei trattamenti sanitari tra strutture, ASL e/o aree territoriali, gruppi di popolazione;
- individuare aree critiche su cui implementare programmi di miglioramento della qualità dell'assistenza;
- monitorare l'andamento della qualità delle cure nel tempo;
- valutare l'efficacia della introduzione di nuove tecnologie.

### **Risultati attesi nel triennio**

Le attività previste consentiranno di produrre i seguenti risultati:

- Produzione di 20 indicatori di esito, per struttura e ASL di residenza, relativamente ai ricoveri ospedalieri nazionali 2004-2008. Gli indicatori selezionati sono stati suddivisi in indicatori di assistenza distrettuale (ricoveri prevenibili), indicatori di assistenza ospedaliera, indicatori di risultato e indicatori di prevenzione primaria.
- Produzione di un sito web (<http://www.outcomeresearch.it/PROGRESSI>) per consentire lo scambio d'informazioni tra le UO dello studio e di diffondere le informazioni, i risultati e i documenti scientifici;
- Sperimentazione di un approccio sintetico di valutazione complessiva delle cure e dei trattamenti offerti dagli ospedali attraverso i Grafici SPIE;
- Sperimentazione di approcci Bayesiani nella valutazione dell'outcome;
- Conduzione di quattro sperimentazioni di integrazione di fonti di dati clinici e amministrativi riguardanti il diabete, il registro delle MCV, il sistema delle emergenze e i registri RENCAM;
- Sperimentazione di *record linkage* tra archivio SIO-SDO e CedAP su base regionale;
- studio per la valutazione della validità estrinseca degli indicatori di esito;
- sperimentazione di nuovi programmi di formazione sul tema "valutazione esiti", specifici per la tipologia dei destinatari.
- Produzione di risultati finali per i quattro studi clinici di valutazione degli esiti OSCAR, RISC-2, IN-ACS Outcome, BYPASS.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati del programma sono trasferibili a livello nazionale per le funzioni di valutazione comparativa in ambito LEA tra SSR, ASL ed erogatori di prestazioni sanitarie. Sono inoltre trasferibili a livello regionale e locale per le funzioni di accreditamento e valutazione dei risultati.

I risultati di questo progetto potranno essere utili alla società scientifiche e ai singoli professionisti per le loro valutazioni interne relativamente alla qualità delle prestazioni fornite ai cittadini.

Anche il cittadino potrà usufruire delle informazioni derivanti da questo progetto per arrivare a compiere scelte più consapevoli nell'ambito delle cure fornite dall'SSN.

### **Sviluppo e produzione di indicatori di processo per le strutture residenziali e di ricovero in salute mentale**

Il progetto mira a realizzare un sistema di indicatori validi, precisi e affidabili, che risulti utile a valutare e monitorare nel tempo la qualità dell'assistenza erogata dalle strutture residenziali e di ricovero in salute mentale, nell'ambito di un processo di miglioramento continuo della qualità dei servizi sanitari.

La metodologia di lavoro comprende tre fasi. La prima, di produzione della lista di indicatori e relative schede, prevede la costituzione di un gruppo di lavoro di esperti, la revisione della letteratura scientifica e delle esperienze nazionali e internazionali, l'identificazione, la definizione e la condivisione di una lista di indicatori, la redazione di una scheda per ogni indicatore.

La seconda, in collaborazione con alcuni Dipartimenti di Salute Mentale (DSM), prevede la verifica dei dati necessari alla costruzione degli indicatori, della loro disponibilità nei sistemi informativi esistenti o in alternativa della loro facilità di raccolta a livello locale, la messa a punto di apposite schede per la rilevazione dei dati, un primo impiego pilota degli indicatori nei DSM collaboranti, e la loro validazione mediante verifica della qualità delle informazioni raccolte.

Una terza e ultima fase prevede la revisione degli indicatori sulla base dei risultati del loro impiego pilota, la successiva applicazione prototipale della lista di indicatori nei DSM collaboranti, l'analisi e diffusione dei risultati.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati intermedi attesi comprendono:

- revisione sistematica della letteratura;
- disponibilità della lista preliminare di indicatori;
- disponibilità delle schede descrittive per ciascun indicatore;
- disponibilità di schede per la rilevazione dei dati;
- disponibilità di strumenti informatici per la raccolta e la gestione dei dati.

Tra i risultati finali attesi, il più importante è la disponibilità di una lista di indicatori di processo e di processo/esito validi, affidabili e applicabili nei contesti clinici di interesse, e di strumenti utili alla loro implementazione.

### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto consentirà di realizzare un sistema di indicatori di processo e di processo/esito validi, precisi e affidabili. Tale sistema è utile per valutare e monitorare nel tempo la qualità dell'assistenza erogata dalle strutture residenziali e di ricovero in salute mentale, nell'ambito di un processo di miglioramento continuo della qualità dei servizi sanitari e come premessa informativa per interventi diretti ed espliciti di programmazione sanitaria finalizzati al miglioramento della qualità dell'assistenza erogata.

### **TAVI versus traditional approaches in treating severe symptomatic aortic stenosis**

La stenosi aortica sintomatica severa (SASS) colpisce oltre il 40% dei pazienti valvolari anziani con esiti invalidanti e riduzione della sopravvivenza se non adeguatamente trattata. L'intervento di sostituzione valvolare aortica (AVR) nei pazienti in età più avanzata e con gravi comorbidità è spesso gravata da un elevato rischio operatorio. Per i pazienti ad alto rischio è stato recentemente introdotto un nuovo approccio terapeutico: l'impianto transcateretere di una bioprotesi valvolare (TAVI).

Il Progetto si propone di valutare l'efficacia del nuovo trattamento terapeutico TAVI in confronto al tradizionale trattamento AVR per la cura dei pazienti SASS ad alto rischio pre-operatorio. Esso nasce come *spin-off* del più ampio Progetto OBSERVANT ed è finanziato dal Ministero della Salute in quanto vincitore del Bando di Ricerca Finalizzata – Giovani Ricercatori del 2009.

Lo studio si presenta come combinazione di una coorte di tipo prospettico, con una raccolta clinica ad hoc dei dati, per la coorte dei pazienti SASS trattati con TAVI; per i pazienti trattati con AVR è prevista invece una raccolta dati di tipo retrospettivo e relativa l'anno precedente l'introduzione delle TAVI nel SSN (2007), da effettuarsi attraverso l'analisi delle cartelle cliniche.

Gli *end-point* analizzati saranno la mortalità (a 30 giorni, ad uno e due anni), gli eventi cerebro e cardiovascolari avversi (ad uno e due anni) e l'occorrenza di re-interventi cardiovascolari (a 30 giorni, ad uno e due anni).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Le attività previste consentiranno di produrre i seguenti risultati:

- valutazione degli esiti a breve, medio e lungo termine dei trattamenti considerati;
- valutazione dei costi-benefici dell'introduzione della TAVI per il trattamento dei pazienti SASS ad alto rischio pre-operatorio;
- contributo per la stesura di linee guida, condivise dai sistemi sanitari regionali, per una codifica univoca delle procedure AVR e TAVI che consentano il controllo amministrativo del fenomeno.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati dello studio potranno essere direttamente trasferiti ai professionisti e ai decisori politici e costituiranno un valido supporto per scelte mediche basate sull'evidenza e processi decisionali.

Le Istituzioni Centrali potranno disporre di uno strumento aggiuntivo per l'ottimizzazione delle risorse prendendo in carico una procedura/trattamento solo se valutata di provata efficacia.

### **TELL ME (Transparent communication in Epidemics: Learning Lessons from experience, delivering effective Messages, providing Evidence)**

Durante le epidemie infettive uno dei problemi maggiori è comunicare con la popolazione al fine di ridurre la diffusione dell'infezione ed evitare il panico. L'impostazione classica top-down, di comunicazione per la salute pubblica non è più sostenibile né attuale. La società globale presuppone infatti lo sviluppo di reti comunicative orizzontali per creare sinergie tra il livello locale e nazionale e interazione tra i diversi soggetti coinvolti in quel momento. *TELL ME* è un progetto di ricerca integrato, collaborativo e multidisciplinare (salute pubblica, scienze sociali, comportamentali, politiche, legge, etica, comunicazione e media), che mira a fornire evidenze e a sviluppare modelli per una migliore comunicazione del rischio durante crisi dovute a malattie infettive, tramite strategie comunicative originali

riguardanti messaggi e indicazioni a elevata complessità basati sull'incertezza. Intende rispondere a tre domande: i) come si può convincere la popolazione generale ad adottare azioni preventive efficaci durante le epidemie? ii) quali sono i migliori metodi per comunicare quando si ha a che fare con messaggi complessi? iii) quali sono le migliori strategie a supporto dell'adesione al vaccino?

L'obiettivo a cui tende consiste nello sviluppo di un pacchetto, fondato sulle evidenze, di strumenti relativi a comportamenti e comunicazione da adottare in risposta alle maggiori epidemie infettive.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Realizzazione di un kit di comunicazione integrato e basato sulle evidenze per la comunicazione in occasione di epidemie infettive e non e creazione di uno specifico software di simulazione. Il progetto si propone di ottenere risultati oltre lo stato dell'arte in tre aree di ricerca interconnesse:

- risposta comportamentale della popolazione alle epidemie;
- sfide e nuovi metodi;
- nuove strategie comunicative in fatto di influenza pandemica.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Risultati e impatto del progetto saranno misurati tramite indicatori di performance come la qualità della ricerca scientifica e il coinvolgimento degli stakeholder.

Indicatori scientifici: numero di pubblicazioni scientifiche e principali output del progetto; indicatori del coinvolgimento degli stakeholder differenziati tra pubblico e gruppi direttamente coinvolti nel processo decisionale in concomitanza di epidemie che potrebbero influenzare conoscenze e atteggiamento incline alla vaccinazione e che possono contribuire al processo comunicativo in sanità pubblica. Gli stakeholder saranno coinvolti lungo tutto il corso del progetto e sarà creato un *panel*, sarà chiesto loro di validare i principali esiti del progetto. Si considererà il numero di persone e istituzioni listati nell'elenco degli stakeholder contattati nel primo WP e coinvolti nel panel.

### **Un approccio epidemiologico ai disturbi dello spettro autistico – Studio epidemiologico sul carico familiare associato all'autismo**

Lo studio epidemiologico sul carico familiare associato all'autismo, coordinato dal Reparto Salute Mentale in collaborazione con l'UO Struttura Complessa di Neuropsichiatria Infantile dell'Azienda Ospedaliera Nazionale SS. Antonio e Biagio e C. Arrigo di Alessandria, il Centro di Riferimento Regionale Autismo dell'ASL 4 di L'Aquila, il Centro Autismo e Disturbi dello Sviluppo dell'ASL di Ravenna, e la UOC di Neuropsichiatria Infantile dell'Ospedale S. Croce di Fano, ha avuto come obiettivi la quantificazione e la caratterizzazione del carico di sofferenza e dei bisogni delle famiglie con un figlio affetto da un disturbo dello spettro autistico (DSA), e l'identificazione dei fattori demografici, socioeconomici e assistenziali associati al carico di sofferenza. E' stato condotto a tale scopo uno studio trasversale in sei regioni italiane, due per ciascuna macroarea geografica (nord, centro e sud Italia) che ha previsto l'arruolamento di tre campioni di famiglie con un figlio di età compresa tra 5 e 17 anni affetto rispettivamente da DSA, sindrome di Down e diabete mellito di tipo I esordito prima dei 5 anni, e un'articolata valutazione dei genitori (volta a valutare il carico associato al disturbo del figlio) e dei figli (volta a raccogliere dati sociodemografici, storia clinica, elementi sulla gravità del disturbo).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Le famiglie arruolate sono state 359, 145 e 155 per quanto riguarda rispettivamente i soggetti affetti da DSA, sindrome di Down e diabete mellito di tipo I, per un totale di 352

madri e 289 padri di pazienti con DSA, 140 madri e 115 padri di pazienti con sindrome di Down, e 153 madri e 133 padri di pazienti con diabete mellito di tipo I.

Tutte le famiglie studiate presentano livelli di stress emozionale e di sintomi depressivi e ansiosi sensibilmente superiori a quelli di popolazioni di riferimento valutate con i medesimi strumenti. Le famiglie in cui è presente un DSA sono sottoposte a un carico soggettivo e oggettivo, anche economico, superiore a quello, pur elevato, delle famiglie con un figlio affetto da sindrome di Down o diabete insulino-dipendente. Il carico familiare è risultato correlato a minor sostegno sociale percepito, peggiore opinione sulla qualità dell'assistenza, presenza di una patologia cronica in uno dei genitori, maggiore gravità clinica e minore funzionamento psicosociale del figlio affetto. Il ritardo mentale è risultato associato a maggiore carico familiare solo se almeno moderato.

Nel corso del 2012 saranno effettuate ulteriori analisi sui dati raccolti, con la finalità di meglio caratterizzare i fattori associati al carico. Verrà inoltre data diffusione ai risultati conseguiti sia tramite pubblicazioni scientifiche sia avendo cura di portare a diretta conoscenza degli stakeholder quanto emerso dallo studio.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I dati sul carico di sofferenza e i bisogni delle famiglie con un figlio affetto da DSA e sui fattori associati al carico saranno utili per individuare criticità nel funzionamento e nell'organizzazione dei servizi, orientare la pianificare sanitaria agli specifici bisogni ed esigenze delle famiglie, e identificare le famiglie a rischio di burn-out che richiedono maggiore intensità di intervento.

### **Un approccio epidemiologico ai disturbi dello spettro autistico**

Si è inteso utilizzare la metodologia epidemiologica con l'obiettivo principale di migliorare la conoscenza, attualmente carente, di alcuni importanti aspetti dei disturbi dello spettro autistico (DSA): l'ereditarietà dei tratti autistici nella popolazione, i possibili fattori ambientali che modifichino la suscettibilità genetica individuale, il carico di sofferenza (*burden*) che tali disturbi esercitano sulle famiglie dei pazienti, i fattori sociodemografici e assistenziali associati al burden, le evidenze scientifiche di efficacia dei trattamenti.

Obiettivi secondari sono fornire strumenti metodologicamente fondati utili per la pianificazione sanitaria, il miglioramento dell'organizzazione dei servizi, la valutazione e l'ottimizzazione degli interventi sociosanitari.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- Addestramento di un gran numero di operatori di servizi di neuropsichiatria infantile all'impiego di strumenti standardizzati di valutazione clinica.
- Disponibilità di versioni italiane validate di strumenti per la valutazione psicosociale delle famiglie con un figlio in età infantile o adolescenziale affetto da una patologia cronica.
- Disponibilità di informazioni sul carico di sofferenza (*burden*) e i bisogni delle famiglie con un figlio in età infantile o adolescenziale affetto da DSA e sui fattori demografici, socioeconomici e assistenziali associati al carico.
- Disponibilità e diffusione di una linea guida per il trattamento dei DSA prodotto mediante una metodologia rigorosa di revisione sistematica delle evidenze di efficacia.
- Disponibilità di stime della componente genetica e ambientale di endofenotipi dello spettro autistico, e di informazioni utili ad individuare varianti geniche e a identificare eventuali fattori ambientali in grado di modificare la suscettibilità genetica individuale.

- Disponibilità di criteri e informazioni utili alla progettazione di iniziative di miglioramento dei servizi sanitari collegate ai risultati del progetto.
- Pubblicazioni scientifiche e comunicazioni a congressi nazionali e internazionali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I dati sul carico familiare saranno utili per individuare criticità nell'organizzazione dei servizi e pianificare interventi per specifici bisogni e particolari richieste di supporto delle famiglie.

La linea guida per il trattamento è di elevata trasferibilità all'SSN, per l'impiego di tecniche multiple di diffusione del documento e di implementazione attiva. Sarà anche accessibile a tutti i cittadini interessati.

Lo studio di epidemiologia genetica consentirà una migliore comprensione dei fattori ambientali che aumentano la suscettibilità genetica, per delineare strategie di prevenzione di esposizioni ambientali e di screening/diagnosi precoce su gruppi a rischio. I risultati del progetto verranno diffusi mediante pubblicazione su riviste scientifiche, comunicazioni a congressi, siti web.

### **Un approccio epidemiologico ai disturbi dello spettro autistico**

Il progetto intende quantificare e caratterizzare il carico di sofferenza delle famiglie con un figlio affetto da un disturbo dello spettro autistico (DSA), e identificare i fattori associati al carico. Mira inoltre a stimare la componente genetica e ambientale di endofenotipi dell'autismo nella popolazione e a identificare possibili fattori ambientali che modifichino la suscettibilità genetica individuale. Mira infine a produrre una linea guida nazionale sul trattamento dei DSA che contribuisca al miglioramento della qualità dell'assistenza.

Lo studio del carico familiare si svolgerà in varie ASL di diverse regioni italiane. In ogni ASL, si recluterà un campione di famiglie con un figlio di 5-17 anni con DSA o una patologia cronica di confronto, mentale (Sindrome di Down) e internistica (diabete) esordite prima dei cinque anni. Verranno raccolti dati su gravità della patologia, funzionamento sociale, percorsi assistenziali, carico familiare, sintomi depressivi e ansiosi, stress, sostegno sociale e benessere spirituale.

La linea guida (LG) sul trattamento dei DSA sarà prodotta secondo la consolidata metodologia del Programma Nazionale Linee Guida (PNLG).

Lo studio sull'ereditarietà dei tratti autistici (misurati con l'*Autism Spectrum Quotient*) si basa sul confronto tra il livello di somiglianza fenotipica in gemelli MZ e DZ e sarà condotto su un campione casuale di coppie di gemelli estratte dal Registro Nazionale Gemelli.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Tra i risultati scientifici attesi, si annoverano l'addestramento di un gran numero di operatori di servizi di neuropsichiatria infantile all'impiego di strumenti standardizzati di valutazione clinica, la disponibilità di versioni italiane validate di strumenti per la valutazione psicosociale delle famiglie con un figlio in età infantile o adolescenziale affetto da una patologia cronica, la disponibilità di informazioni sul carico di sofferenza e i bisogni delle famiglie con un figlio in età infantile o adolescenziale affetto da DSA e sui fattori demografici, socioeconomici e assistenziali associati al carico, la disponibilità e la diffusione di una linea guida per il trattamento dei DSA prodotto mediante una metodologia rigorosa di revisione sistematica delle evidenze di efficacia, la disponibilità di stime della componente genetica e ambientale di endofenotipi dello spettro autistico, e di informazioni utili ad individuare varianti geniche e a identificare eventuali fattori ambientali in grado di modificare la suscettibilità genetica individuale.

### **Trasferibilità dei risultati**

I dati sul carico di sofferenza e i bisogni delle famiglie con un figlio affetto da DSA e sui fattori associati al carico saranno utili per individuare criticità nel funzionamento e nell'organizzazione dei servizi, orientare la pianificare sanitaria agli specifici bisogni ed esigenze delle famiglie, e identificare le famiglie a rischio di burn-out che richiedono maggiore intensità di intervento.

### **Uso degli aminoacidi ramificati durante l'attività sportiva e rischio di insorgenza della sclerosi laterale amiotrofica**

Valutare l'ipotesi che l'assunzione cronica di integratori alimentari a base di aminoacidi ramificati possa contribuire ad incrementare il rischio di insorgenza di SLA nei calciatori professionisti italiani.

### **Risultati attesi nel triennio**

Verificare l'ipotesi già sostenuta dai primi risultati del progetto, che un elevato consumo di aminoacidi ramificati, utilizzati dagli sportivi come integratori alimentari per accelerare il recupero dopo uno sforzo fisico, possa contribuire ad incrementare il rischio di insorgenza della SLA, una patologia neurodegenerativa ad eziologia sconosciuta.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati attesi dalla ricerca hanno un notevole impatto in termini di sanità pubblica se si considera l'ampia diffusione che gli integratori alimentari hanno raggiunto nella popolazione generale.

### **Vaccine European New Integrated Collaborative Effort II (VENICE II)**

Le vaccinazioni sono il più importante strumento di prevenzione primaria per le malattie infettive.

I vaccini sono autorizzati nell'UE con indicazioni comuni, ma i prodotti utilizzati, i calendari vaccinali e le strategie d'immunizzazione adottate differiscono tra i diversi Paesi. Al contrario, l'impatto delle politiche vaccinali va al di là dei confini territoriali di uno stato, specialmente in un contesto di libera circolazione non solo di individui ma anche di agenti infettivi.

È necessario, quindi, approfondire le conoscenze su come vengono effettuate le vaccinazioni negli stati membri a livello nazionale e subnazionale, stabilire indicatori comuni per monitorare i programmi vaccinali, definire i processi decisionali, integrare le informazioni disponibili identificando le carenze e i valori aggiunti dei diversi Paesi. Lo sviluppo di strumenti comuni per migliorare i programmi di vaccinazione e agire in modo coordinato rappresenta una delle priorità europee dei prossimi anni.

VENICE II si prefigge di promuovere la raccolta, condivisione e diffusione di conoscenze ed esperienze in tema di vaccinazione e rafforzare la collaborazione tra gli Stati membri attraverso lo sviluppo di un network di esperti, con il fine ultimo di ridurre l'eterogeneità tra i diversi paesi verso una politica vaccinale comune.

I 27 Paesi membri dell'UE con Irlanda e Norvegia partecipano al network sin dal 2009.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto è focalizzato su una diversa tematiche di volta in volta affidate dall'ECDC.

All'Italia è affidato il coordinamento delle attività del progetto. Il progetto è finanziato dall'ECDC fino a dicembre 2012, dopodiché bisognerà negoziare un possibile rinnovo.

I risultati attesi per il 2012 sono:

- Mantenere il network di esperti nella comunità europea in grado di raccogliere ed elaborare informazioni sui programmi di immunizzazione negli Stati membri a livello nazionale e subnazionale e supportare lo sviluppo di programmi vaccinali in un'ottica comune.
- Valutare la variabilità della copertura vaccinale a livello nazionale e subnazionale per specifiche vaccinazioni.
- Identificare un metodo per la raccolta di coperture vaccinali a livello di ECDC per una maggiore relazione tra dati di sorveglianza e dati di copertura vaccinale per le malattie prevenibili da vaccino (sotto progetto EVACO).
- Incoraggiare un approccio razionale ai processi decisionali riguardanti le politiche vaccinali, fornendo strumenti standardizzati (specialmente nel settore dell'Influenza).
- Altri obiettivi potranno essere definiti e proposti dall'ECDC nel corso del 2012.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La trasferibilità del progetto per la salute pubblica italiana è la disponibilità di informazioni sulle strategie vaccinali, i metodi usati e dati di copertura vaccinali da tutti i paesi europei che forniranno utili informazioni per il miglioramento delle strategie vaccinali Italiane e Europee.

Inoltre il network VENICE si è dimostrato un ottimo strumento per rapide consultazioni informali tra esperti Europei che rappresentano un valore aggiunto alle conoscenze disseminate attraverso i canali ufficiali spesso solo in lingua madre in ogni Paese.

#### **Validazione del questionario KOOS per la valutazione dell'esito a breve termine dei pazienti sottoposti a intervento di artroprotesi di ginocchio**

La valutazione dell'esito di interventi di sostituzione protesica è materia complessa, come dimostrato da studi condotti in ISS, non basandosi solo sulla valutazione di endpoint facilmente rilevabili come potrebbe essere la mortalità a 30 giorni. L'esito è infatti il risultato di più fattori dipendenti dallo stato di salute del paziente, dal servizio prestato nell'ospedale e dal dispositivo. Un dispositivo che ha fallito viene registrato dal sistema in quanto il paziente deve necessariamente subire un intervento di revisione. Ma la letteratura mostra che la vita media di un dispositivo *in vivo* è di circa dieci anni: risulta quindi indispensabile mettere a punto metodiche che permettano di valutare l'esito a breve considerando altri fattori. Vi è evidenza che la variabile di esito più sintetica e significativa in questo ambito sia la misura della qualità della vita. Lo studio si propone di validare in uno studio multicentrico il questionario KOOS per la valutazione dell'esito tramite somministrazione di questionari già validati per la misura della qualità della vita come avviene già in altri paesi del mondo in cui è attivo da anni un Registro nazionale degli interventi (Nuova Zelanda, Regno Unito)

#### **Risultati attesi nel triennio**

Validazione del questionario secondo la metodologia standardizzata per la traduzione e adattamento culturale di strumenti mirati alla misura di esiti in termini di qualità della vita. Valutazione delle caratteristiche psicometriche.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La trasferibilità è immediata: i risultati conseguiti nello studio multicentrico per la validazione del questionario KOOS per la valutazione dell'esito nel breve-medio termine, verranno inseriti nei protocolli del registro nazionale degli interventi di artroprotesi (ginocchio).

### **Valutazione comparativa del profilo beneficio-rischio dei farmaci anticoagulanti, nuovi e tradizionali, nella prevenzione del tromboembolismo venoso in chirurgia protesica della anca e del ginocchio**

Il tromboembolismo venoso rappresenta una complicazione potenzialmente grave in chirurgia ortopedica maggiore. La efficacia degli anticoagulanti nella profilassi degli eventi tromboembolici in chirurgia protesica della anca e del ginocchio è nota. Tuttavia sono limitate le informazioni sul profilo beneficio-rischio della profilassi nei pazienti i cui fattori di rischio rappresentano un criterio di esclusione nelle sperimentazioni cliniche. Non si sa inoltre come si modifica il rischio di eventi clinici tromboembolici ed emorragici in relazione ai principali fattori prognostici individuali.

Per fornire informazioni aggiuntive sul profilo beneficio-rischio dei farmaci anticoagulanti è stato disegnato uno studio osservazionale di coorte multicentrico su pazienti con età maggiore di 17 anni che eseguono interventi di chirurgia protesica della anca e del ginocchio in strutture pubbliche o accreditate della regione Lazio in un periodo di due anni. La inclusione nello studio di circa 2.000 pazienti consentirà di effettuare analisi descrittive e multivariate per confrontare le incidenze tra i diversi gruppi di pazienti e per stimare i rischi relativi controllando i fattori confondenti (socio-demografici, anamnestici e associati allo intervento).

#### **Risultati attesi nel triennio**

I principali risultati dello studio consisteranno nel confrontare la incidenza degli eventi clinici tromboembolici ed emorragici nei pazienti in profilassi con anticoagulanti sottoposti a chirurgia protesica di anca e di ginocchio, rispetto alla popolazione di pazienti inclusa nelle sperimentazioni cliniche; e di confrontare il profilo beneficio-rischio degli anticoagulanti nuovi e tradizionali. Ulteriori risultati attesi sono quelli di stimare la associazione tra i principali fattori prognostici e gli eventi clinici di interesse, e di costituire una coorte di pazienti per valutare la sopravvivenza delle protesi a breve termine.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le ricadute attese per l'SSR sono diverse. La quantificazione dei rischi di eventi tromboembolici ed emorragici in associazione ai diversi fattori prognostici consentirà agli ortopedici di promuovere la appropriatezza della profilassi. L'avvio di uno studio osservazionale su pazienti sottoposti a interventi di protesi di anca e di ginocchio consentirà inoltre di individuare una coorte di soggetti nella quale effettuare una valutazione della sopravvivenza delle protesi nel breve termine.

### **Valutazione dei pazienti ricoverati negli ospedali psichiatrici giudiziari finalizzata a proposte di modifiche di assetti organizzativi e di processo**

Sarà realizzato un registro psichiatrico *web-based* in grado di fornire informazioni affidabili sulla diagnosi della popolazione ricoverata nei sei Ospedali Psichiatrici Giudiziari (OPG) italiani, e in grado di promuovere l'attuazione di interventi riabilitativi basati su una valutazione affidabile e riproducibile delle risorse psicosociali del singolo paziente. Saranno coinvolti i sei Dipartimenti di Salute Mentale nel cui territorio gli OPG sono situati. Ciascun caso sarà valutato con un'intervista standardizzata per la diagnosi psichiatrica, uno strumento di valutazione sintomatologica e uno delle competenze sociali e lavorative, una scheda di raccolta dati su percorso e gestione clinica, un modulo relativo ai trattamenti riabilitativi ricevuti. Gli operatori dei DSM competenti sugli OPG saranno formati presso l'ISS all'utilizzo di tali strumenti.

Una infrastruttura *web-based* realizzata *ad hoc* consentirà di raccogliere i dati relativi alle caratteristiche cliniche dei pazienti e di monitorare nel tempo gli interventi terapeutici e riabilitativi effettuati e la loro efficacia.

Il registro prevederà per ciascun paziente la valutazione periodica della natura e della gravità del disturbo mentale in atto e del suo decorso, e la caratterizzazione e valutazione di efficacia nella pratica degli interventi riabilitativi effettuati. Per i pazienti indirizzati ad altre strutture saranno raccolte informazioni sul percorso del primo anno di cura all'esterno dell'OPG.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Risultati scientifici previsti:

- Disponibilità di una selezione di strumenti diagnostici e psicometrici e di una metodologia per la valutazione dei pazienti psichiatrici ricoverati presso gli OPG condivisa a livello nazionale.
- Addestramento degli operatori sanitari degli OPG all'impiego di strumenti standardizzati di valutazione.
- Disponibilità di un registro psichiatrico in rete dei pazienti ricoverati nei sei OPG italiani.
- Disponibilità di informazioni sulla diagnosi psichiatrica, la gravità sintomatologica, il livello di disabilità dei pazienti ricoverati in OPG, la tipologia e l'efficacia dei trattamenti riabilitativi effettuati.

Ricadute per l'ISS:

- Acquisizione e consolidamento di competenze nell'ambito della valutazione diagnostica psichiatrica e della valutazione di efficacia degli interventi riabilitativi nel contesto specifico del progetto.
- Promozione della valutazione degli esiti nel contesto degli OPG anche finalizzata a proposte di modifiche di assetti organizzativi e di processo del contesto specifico.
- Pubblicazioni scientifiche su riviste nazionali e internazionali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Disponibilità di una metodologia condivisa a livello nazionale per la valutazione diagnostica e degli esiti dei trattamenti riabilitativi in questa popolazione di pazienti. Disponibilità di informazioni cliniche acquisite con metodologia accurata e riproducibile sui pazienti presenti in OPG. I prodotti del progetto appaiono particolarmente preziosi anche alla luce delle previste modifiche degli aspetti organizzativi del contesto specifico.

### **Valutazione dei pazienti ricoverati negli ospedali psichiatrici giudiziari finalizzata a proposte di modifiche di assetti organizzativi e di processo**

Obiettivo generale del progetto è realizzare un registro psichiatrico orientato clinicamente, in grado di fornire informazioni affidabili sulle caratteristiche cliniche e psicosociali della popolazione internata negli Ospedali Psichiatrici Giudiziari (OPG) mediante l'impiego di strumenti standardizzati per la valutazione periodica della natura e gravità dei disturbi mentali in atto e del loro decorso. La valutazione periodica dei sintomi psicopatologici e del funzionamento psicosociale consentirà una valutazione standardizzata delle condizioni di salute nel corso del tempo e potrà verosimilmente contribuire ad accelerare l'adozione di orientamenti e pratiche più attente all'efficacia e all'appropriatezza degli interventi e alla valutazione dei risultati, con conseguenze positive sull'efficacia dei trattamenti e dei percorsi riabilitativi.

La trasmissione dei dati via web all'unità di coordinamento garantirà un controllo in tempo reale della accuratezza e completezza delle rilevazioni. Per ogni caso segnalato saranno previste successive valutazioni di follow-up a frequenza trimestrale: un database interattivo invierà messaggi di avviso all'approssimarsi della scadenza del terzo mese, coadiuvando i clinici nel sistematizzare le valutazioni della gravità dei sintomi e del funzionamento dei pazienti nel corso del tempo.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- disponibilità di un archivio informatizzato sulle caratteristiche cliniche e psico-sociali della popolazione di internati negli OPG italiani con particolari requisiti di accuratezza e riproducibilità;
- disponibilità di dati relativi alle variazioni delle frequenze nel tempo e nello spazio dei disturbi da cui sono affetti;
- disponibilità di valutazioni multidimensionali periodiche in diversi sottogruppi di internati;
- acquisizione e diffusione di informazioni sul percorso di cura e sulla gestione di questi pazienti da parte dei DSM partecipanti, anche con l'intento di individuare criticità e possibili interventi volti a migliorare la qualità dell'assistenza;
- individuazione dei fattori sociodemografici, clinici e di processo assistenziale associate ad un esito favorevole o sfavorevole;
- produzione di dati di confronto per attività di *benchmarking*.

### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto prevede la formazione degli operatori dei DSM competenti sugli OPG all'utilizzo di strumenti validati per la diagnosi e la valutazione degli esiti degli interventi e la costituzione di un registro psichiatrico dell'intera popolazione ricoverata, stimata al luglio 2011 in 1378 unità (fonte: Commissione parlamentare di inchiesta sull'efficacia e l'efficienza dell'SSN). Il registro sarà orientato in senso clinico e prevederà per ciascun paziente la valutazione periodica trimestrale della natura e della gravità del disturbo mentale in atto e del suo decorso e la caratterizzazione e valutazione di efficacia nella pratica degli interventi riabilitativi effettuati. Saranno valutate le competenze sociali e lavorative di ciascun paziente, con l'obiettivo di promuovere l'attuazione di interventi riabilitativi che siano un ponte verso l'esterno, favorendo così un riavvicinamento dei pazienti ai DSM di provenienza, così come auspicato dal DPCM.

### **Valutazione dell'impatto dei ticket (nazionali e regionali) sulla prescrizione farmaceutica**

L'obiettivo primario è quello di quantificare gli effetti dell'introduzione dei *ticket* sui farmaci in Italia, a livello aggregato regionale e di utilizzatori di farmaci; obiettivo secondario è simulare l'impatto, sulla spesa dell'SSN e dei utilizzatori, di diversi scenari di applicazione dei ticket.

L'analisi regionale si riferisce sia alle prescrizioni effettuate all'interno dell'SSN che all'acquisto privato da parte dei cittadini nel periodo 2000-2011. Si tratta dei dati relativi alla prescrizione farmaceutica convenzionata territoriale di classe A (esclusa quindi l'erogazione dei farmaci in distribuzione diretta e per conto). Per quanto concerne invece l'analisi sui farmaci acquistati privatamente dai cittadini, sono compresi i farmaci di fascia A (rimborsabili da parte dell'SSN), quelli di fascia C (non rimborsabili e con obbligo di ricetta) e i farmaci senza obbligo di prescrizione (SOP) e OTC (*over the counter*).

Le analisi sulla popolazione di utilizzatori consentiranno di descrivere l'attuale distribuzione dell'impatto dei ticket sul livello di prescrizione complessiva e per categorie terapeutiche, in base alle caratteristiche socio-demografiche (età e sesso, reddito, nazionalità ed eventualmente indici di deprivazione), prezzo dei farmaci e tipologia delle esenzioni.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il primo gruppo di risultati riguarda le analisi sui dati aggregati regionali. Si prevede di:

- descrivere l'andamento temporale della spesa farmaceutica a carico SSN, della spesa privata e dei ticket per singola Regione;

- confrontare i livelli complessivi di prescrizione dei farmaci tra Regioni con e senza ticket;
- valutare l'impatto dei provvedimenti di compartecipazione alla spesa sul complesso della prescrizione e per categoria terapeutica, distinguendo tra categorie per cui sono previste in genere esenzioni per patologia (es. antiipertensivi, antidiabetici, ecc.) e categorie con prevalente uso acuto per le quali può essere presente una esenzione per reddito (es. FANS, antibiotici).

Il secondo gruppo di risultati è relativo alle analisi sulla popolazione assistita. In particolare, si prevede di:

- descrivere l'impatto dei ticket a livello di gruppi di utilizzatori, con approfondimenti per età, sesso, fascia di reddito e presenza di esenzioni per patologia;
- simulare l'impatto, sulla spesa dell'SSN e sugli utilizzatori, di diverse ipotesi di compartecipazione: per confezione, ricetta e categoria di farmaco, in relazione alle possibili categorie di esenzione.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Nel corso dell'ultimo decennio, in seguito al rilevante aumento della spesa farmaceutica SSN osservata nel 2001, sono stati attuati a livello nazionale e regionale numerosi interventi per contenere il livello di spesa, inclusa l'introduzione di ticket. È attualmente in corso una discussione a livello nazionale e regionale circa le modalità di applicazione dei ticket: dall'entità della compartecipazione alle modalità di esenzione (reddito e/o patologia), alle ricadute di spesa per l'SSN e per i cittadini. I risultati del progetto contribuiranno in primo luogo a fornire informazioni utili nella fase di adozione di nuovi provvedimenti di compartecipazione, e in secondo luogo a valutare gli effetti dei provvedimenti adottati.

### **Valutazione della salute mentale in pazienti oncologici a lunga sopravvivenza**

Gli obiettivi dello studio, che è parte di un più ampio progetto coordinato dal Reparto Epidemiologia dei tumori del CNESPS, sono quelli di fornire una descrizione dettagliata dei bisogni di salute mentale dei pazienti oncologici che sopravvivono alla fase acuta di malattia, identificare fattori associati a disagio emozionale nonché possibili fattori protettivi, e delineare sottogruppi di pazienti che potrebbero beneficiare di specifici interventi psicosociali preventivi o comunque precoci.

Lo studio è rivolto a pazienti seguiti presso gli IRCCS di Oncologia italiani, che abbiano superato i 5 anni di sopravvivenza dalla diagnosi. A tutti i pazienti inclusi nel progetto si intende somministrare una batteria di strumenti standardizzati per la valutazione di numerose dimensioni di interesse in salute mentale, quali i sintomi depressivi, i sintomi ansiosi, la sofferenza emozionale, le modalità e strategie di gestione dello stress, il sostegno sociale percepito.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio consentirà di acquisire dati attualmente non disponibili sulla relazione tra lo stato di salute mentale dei pazienti e vari fattori demografici e clinici (es. sesso, età, sede tumorale, stadio al momento della diagnosi, stato attuale di salute) e dunque di identificare fattori associati a disagio emozionale nonché possibili fattori protettivi (es. sostegno sociale, specifiche strategie di gestione dello stress).

#### **Trasferibilità dei risultati**

Gli elementi conoscitivi raccolti mediante lo studio potranno essere utili alla pianificazione e alla valutazione di attività e interventi tesi al miglioramento del benessere psicologico e della qualità della vita dei pazienti oncologici lungosopravvissuti presso tutte le strutture oncologiche dell'SSN.

**Centro nazionale**  
**Epidemiologia, sorveglianza e promozione della salute**

**Attività di controllo, valutazione, parere**



### **Attività di formazione nel campo dell'epidemiologia delle malattie infettive**

Il Reparto Epidemiologia delle malattie infettive organizza diverse iniziative di didattica frontale nel settore della epidemiologia delle malattie infettive contribuendo alla formazione degli operatori nazionali, identificata tra le missioni del CNESPS. Inoltre, corsi organizzati dalle Università, dall'ECDC, dalle Regioni e dalle ASL vedono il coinvolgimento degli esperti del Reparto.

Oltre alla didattica, il Reparto è coinvolto in attività di formazione secondo il metodo *learning by doing* ospitando borsisti, specializzandi e persone coinvolte in particolari programmi di addestramento, sia nazionali che internazionali.

In particolare, è da menzionare che il Reparto Epidemiologia delle malattie infettive è sito di selezione e di addestramento per il programma di formazione europeo EPIET (*The European Programme for Intervention Epidemiology Training*) finanziato e organizzato dall'ECDC.

Infine, il Reparto è uno dei siti per la selezione dei partecipanti italiani ai corsi specifici e a cascata offerti dall'ECDC agli Stati membri.

#### **Attività programmata**

Corsi e attività di formazione sono previsti su tematiche legate a malattie prevenibili da vaccino, HPV, morbillo, antibiotico resistenza e, più in generale, sulla epidemiologia delle malattie infettive.

Piuttosto che prevedere un calendario su corsi ciclici, verranno organizzati o si parteciperà a eventi in base alle esigenze e alle tematiche in studio.

Nel corso del triennio 2012-2014 si parteciperà alla formazione europea partecipando come sito di selezione e di formazione per il programma EPIET sia con il cosiddetto *EU-Track* (ospitando per due anni un borsista di un altro Paese della UE) che per l'*MS-Track* (formando e ospitando per due anni un epidemiologo italiano); entrambi i programmi rappresentano un proficuo scambio di esperienze e collaborazioni a livello internazionale.

All'interno di altri progetti internazionali in cui il Reparto è coinvolto, come ad esempio il progetto *Episouth*, sono altresì pianificate attività di partecipazione a programmi internazionali di formazione.

Infine, si continuerà l'identificazione dei migliori candidati da inviare ai corsi specifici e a cascata offerti dall'ECDC sui metodi epidemiologici, vaccinologia, gestione delle epidemie, metodi per la sorveglianza e le indagini su specifiche malattie.

### **Banca di campioni biologici**

La banca di campioni biologici è un sistema che conserva differenti tipi di campioni, raccolti durante indagini epidemiologiche, da sottoporre ad analisi successive alla raccolta in condizioni di recupero efficiente e di accettabile stabilità del campione. Gli studi che meglio si adattano all'utilizzo di campioni biologici sono quelli caso-controllo annidati nella coorte (*nested case-control studies*), sono studi che hanno vantaggi sia degli studi di coorte sia degli studi caso-controllo sono protetti dai *bias* di selezione e di informazione, poiché le informazioni vengono raccolte prima che si sviluppi la malattia, hanno bassi costi di analisi, in quanto vengono condotti solo su un sottogruppo di soggetti, anziché su tutta la coorte e sono particolarmente adatti a studi eziologici, poiché in essi è possibile discriminare le condizioni antecedenti alla malattia. Disporre di campioni biologici rappresenta un grande vantaggio, perché permette di rispondere a quesiti scientifici in tempi relativamente rapidi e in condizioni di massima efficienza. La banca di campioni biologici è governata da alcune regole: può essere aperta solo quando il quesito a cui è necessario rispondere non ha già trovato risposta, quando la sua soluzione porta beneficio in termini di sanità pubblica e

quando la numerosità degli eventi sviluppati è sufficientemente ampia e adatta a rispondere al quesito.

La banca di campioni biologici del CNESPS contiene freezer a  $-30^{\circ}\text{C}$  e a  $-80^{\circ}\text{C}$ , in cui sono conservati campioni di siero, sangue intero e urine, e contenitori di azoto liquido, in cui sono conservati campioni di siero, plasma, *buffy coat* ed emazie impacchettate. Il materiale biologico è conservato in *paillette*, contenute in *visotube*, disposti in *gobelette*, contenute dentro a *canister*, immersi in azoto liquido. I campioni sono archiviati su supporto magnetico con un software che permette facilmente la loro localizzazione. I contenitori di azoto liquido sono collegati fra di loro, sono riempiti automaticamente attraverso un rifornitore esterno quando il livello di azoto scende al di sotto del limite critico; i locali sono forniti di misuratori di ossigeno e dotati degli opportuni indicatori di sicurezza; i freezer sono collegati all'azoto liquido, che viene caricato se c'è un innalzamento della temperatura. Funzionalità dei freezer e riempimento dei contenitori di azoto liquido sono controllati attraverso la rete informatizzata del CNESPS nelle postazioni dei tecnici addetti al servizio e un sistema di allarme informa automaticamente via telefono i referenti.

Attualmente nella banca sono conservati campioni appartenenti a circa 30.000 soggetti esaminati una o più volte a partire dal 1987 e facenti parte di studi prospettici: il progetto CUORE, GENOMEUTWIN, IPREA, il Registro delle demenze, l'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare 1998, l'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare/*Health Examination Survey*, Piccoli+, e il Progetto ESEN.

#### **Attività programmata**

La banca verrà ampliata e verranno mantenute le condizioni migliori per il buon funzionamento.

Per il 2012 è previsto l'arruolamento di circa 9.000 persone di età compresa fra i 35 e 79 anni. Di questi soggetti verranno conservati: quattro campioni di siero, sei di plasma, due di *buffy coat* e due di emazie impacchettate in *paillette* da conservare in azoto liquido; inoltre in frigo a  $-80^{\circ}\text{C}$  verranno conservati tre campioni per ogni persona di urine la cui raccolta è avvenuta nelle 24 ore. Dei campioni biologici di sangue intero è prevista l'estrazione del DNA nei campioni dell'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare 1998-2002, in modo da rendere disponibile il materiale genetico per studi di genetica delle malattie cardio-cerebrovascolari. È previsto inoltre nell'ambito del progetto Piccoli+ la conservazione di materiale biologico di nuovi nati estratto dal cordone ombelicale e di campioni biologici della madre.

Verrà aggiornato il software per l'archiviazione dei campioni biologici, la localizzazione degli stessi e l'appaiamento con il database e il follow-up degli studi.

La banca fa parte del network *Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure* dell'UE (BBMRI) del P3G e dello Hub italiano delle biobanche di popolazione.

#### **Committee on Alcohol Policy and Actions (Comitato sulle politiche sull'alcol e sulle azioni) – CNAPA**

Il CNAPA è un gruppo di lavoro formale che svolge attività di consulenza alla DG SANCO. È costituito dai rappresentanti degli Stati membri che vengono nominati dai governi e che partecipano ai lavori di definizione delle strategie di prevenzione europee. Il CNAPA ha sostituito il precedente *Working Group Alcohol and Health*. Su mandato del Ministero della Salute anche l'ISS dal 1999 garantisce la partecipazione dell'Italia alle attività della CE dedicate alla valutazione periodica prevista dalla Strategia comunitaria sull'alcol. A tal fine partecipa alla predisposizione di dati e di report nell'ambito delle

Relazioni sulla sanità pubblica identificate come prioritarie dalla Commissione e collabora formalmente alla produzione delle relazioni che consentono la produzione di Raccomandazioni o Conclusioni del Consiglio e delle Comunicazioni della Commissione al Parlamento UE. Su mandato e nomina del Ministero della Salute, l'Osservatorio Nazionale Alcol (ONA, presso il CNESPS) è divenuto membro permanente dei principali organismi identificati a livello europeo per il monitoraggio delle politiche sull'alcol agendo come rappresentante unico governativo italiano della CE:

- nello *Standing Committee on Alcohol Policies and Action* (Luxembourg) ([http://ec.europa.eu/health/ph\\_determinants/life\\_style/alcohol/documents/ev\\_20071105\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_determinants/life_style/alcohol/documents/ev_20071105_en.pdf))
- nello "European Alcohol and Health Forum" (Bruxelles)
- come membro dell'*advisory group* per la valutazione della strategia comunitaria.

#### **Attività programmata**

Le attività svolte e quelle programmate saranno dettagliate nella Relazione al Parlamento da parte del Ministro (L 125/2001) e reperibili sui siti della CE, ad esempio il report prodotto dall'ONA sullo stato di avanzamento delle politiche alcol correlate e sull'epidemiologia dell'alcol in Italia ([http://ec.europa.eu/health/ph\\_determinants/life\\_style/alcohol/documents/ev\\_20071105\\_co01\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_determinants/life_style/alcohol/documents/ev_20071105_co01_en.pdf)) e la raccolta europea delle *good practice* relative alla tematica dell'alcol nell'anziano attraverso il coordinamento diretto del progetto VINTAGE ([www.epicentro.iss.it/vintage](http://www.epicentro.iss.it/vintage)). Nel triennio l'ONA continuerà a partecipare alla predisposizione delle relazioni per la produzione di Raccomandazioni o Conclusioni del Consiglio e delle Comunicazioni della Commissione al Parlamento UE. Le attività saranno regolarmente pubblicate sul web ([http://ec.europa.eu/health/alcohol/policy/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/alcohol/policy/index_en.htm)) e si avvarranno della collaborazione del CAR Toscana, EUROCARE, AICAT e SIA.

### **Consulta nazionale degli esperti e degli operatori sociali sulle tossicodipendenze**

La Consulta nazionale è istituita ai sensi dell'art. 132 del DPR 9/10/1990 n. 309, presso la Presidenza del Consiglio dei Ministri - Dipartimento per le politiche antidroga.

È un tavolo di consultazione e preconcertazione delle strategie e della programmazione degli interventi in ambito delle politiche antidroga e degli interventi correlati e sede di incontro tra operatori e organizzazioni del settore con le amministrazioni responsabili, ai vari livelli, delle politiche e delle programmazioni nell'area dipendenze (Ministeri, Regioni e PA, rappresentanza delle amministrazioni locali). La Consulta è organo del Dipartimento per le Politiche Antidroga, co-gestito con le Regioni e le PA, a cui anche l'ISS partecipa con la propria *expertise* e una rappresentanza delle amministrazioni locali.

#### **Attività programmata**

Le attività della Consulta sono rivolte alla formulazione di strategie condivise a livello nazionale, all'analisi dei problemi di settore specifico e di individuazione di possibili soluzioni concertate.

La Consulta fornisce anche supporto informativo istituzionale delle amministrazioni per gli operatori di settore e proposte di miglioramento del sistema generale e del coordinamento interregionale.

### **Contributi tecnico-scientifici**

Il Reparto Epidemiologia delle malattie infettive fornisce regolarmente contributi tecnico-scientifici nell'ambito della epidemiologia delle malattie infettive. In particolare:

- contributi tecnici alla stesura del Piano Sanitario Nazionale, Piano Nazionale Vaccini, Piano Nazionale per l'Eliminazione del morbillo e della rosolia congenita, Relazione sullo stato sanitario del Paese, rapporti, circolari, linee guida e piani strategici a livello nazionale e risposte a interrogazioni parlamentari;
- contributi tecnici alla stesura e revisione di linee guida, documenti strategici e rapporti sulle malattie infettive per l'ECDC e per agenzie delle Nazioni Unite;
- contributi e risposte a richiesta di pareri su argomenti inerenti la prevenzione e il controllo delle malattie infettive per le Regioni e le autorità sanitarie locali;
- contributi per la preparazione e revisione di testi sulle malattie infettive per la redazione del sito web Epicentro ([www.epicentro.iss.it](http://www.epicentro.iss.it));
- contributi per la revisione e valutazione di articoli e progetti in ambito nazionale e internazionale.

#### **Attività programmata**

Il Reparto Epidemiologia delle malattie infettive prevede di proseguire tale attività nel prossimo triennio.

### **Formazione di operatori di sanità pubblica**

Il CNESPS esercita attività di formazione, perfezionamento e aggiornamento sulla salute pubblica, rivolte al personale dell'SSN e agli organi ed enti di promozione e tutela della salute con l'intento di fornire gli strumenti per la realizzazione e la valutazione delle attività con particolare riguardo agli obiettivi del Piano Sanitario Nazionale (PSN); diffondere i risultati di studi, implementare azioni di prevenzione nella popolazione.

L'attività di formazione è articolata su temi dell'epidemiologia di base e avanzata (indagini epidemiologiche, comunicazione, programmazione di interventi, linee guida e *Evidence Based Prevention*, uso di software) e temi specialistici di epidemiologia.

Il Centro realizza inoltre Master regionali di secondo livello in epidemiologia applicata in collaborazione con diverse Università, con diversi corsi frontali e attività di tirocinio. I corsi sono prevalentemente indirizzati a operatori nel sistema sanitario nazionale, in particolare medici, veterinari, biologi, operatori sanitari che lavorano nella salute pubblica all'interno degli osservatori epidemiologici, dei dipartimenti di prevenzione, dei servizi territoriali e ospedalieri.

Inoltre il personale del CNESPS effettua docenze su invito in corsi organizzati da altre strutture dell'SSN italiano e di istituzioni straniere.

A livello europeo il CNESPS è l'interlocutore nazionale del Programma di formazione EPIET (finanziato da UE e coordinato dalla Svezia) con la selezione dei candidati italiani e la partecipazione alle attività didattiche effettuate. Nell'ambito del programma il CNESPS ospita partecipanti stranieri che vengono addestrati in Italia per un biennio.

#### **Attività programmata**

Negli ultimi anni, le Regioni hanno acquisito e esercitato maggiore autonomia nella pianificazione sanitaria e nell'organizzazione dei servizi con la creazione o il rinforzo di Agenzie regionali sanitarie e degli osservatori epidemiologici regionali e aziendali cui viene richiesto di: raccogliere, analizzare e utilizzare informazioni epidemiologiche; progettare, attuare e valutare programmi sanitari; comunicare informazioni utili per la salute della popolazione e per la programmazione partecipata delle attività sanitarie.

I corsi di formazione residenziali si articolano in quattro aree: i corsi dell'area metodologica prendono in esame i concetti di base dell'epidemiologia con l'approfondimento dei principali strumenti e metodi della disciplina, i corsi dell'area specialistica propongono approfondimenti su aree specifiche al fine di favorire lo sviluppo di

competenze professionali coerenti con le caratterizzazioni specialistiche, culturali e operative, dei diversi contesti. I corsi dell'area tematica approfondiscono alcune metodologie di lavoro in salute pubblica e promuovono lo sviluppo di abilità e competenze per la tutela e promozione della salute. Infine, la formazione su progetto include i corsi di formazione destinati agli operatori dell'SSN identificati nelle strutture ed enti che partecipano ai progetti di ricerca.

### **Health Examination Survey (HES)**

La HES si basa su campioni di popolazione generale estratti in modo casuale nelle diverse Regioni, particolarmente utili per fornire indicazione sui comportamenti e sui determinanti della salute: attraverso esami diretti della popolazione (non attraverso questionari di autovalutazione) vengono raccolti dati su misure antropometriche, fisiologiche, cliniche e parametri ematochimici, nonché informazioni utili per valutare la prevalenza delle malattie croniche, la necessità e l'accesso ai servizi socio-sanitari, la capacità funzionale e lo stato nutrizionale. L'obiettivo dell'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare/*Health Examination Survey* (OEC/HES) è quello di descrivere alcune caratteristiche individuali e abitudini di vita (alimentazione, attività fisica, abitudine al fumo di sigaretta), nonché la prevalenza di condizioni a rischio (ipertensione arteriosa, dislipidemia, obesità), identificare aree di patologia cronico-degenerativa (malattie cardiovascolari, tumori, malattie renali, diabete) e altre condizioni per le quali è necessario intervenire in termini preventivi, diagnostici, terapeutici e assistenziali e studiare gli andamenti temporali nella popolazione generale italiana adulta di età 35-79 anni; alle comuni determinazioni sui fattori di rischio sono aggiunti una serie di esami quali la spirometria per valutare la capacità vitale, il Volume Espiratorio Massimo al 1° Secondo (VEMS) e l'indice di Tiffeneau, la densitometria ossea per valutare la capacità del calcio di legarsi alle ossa, la determinazione del monossido di carbonio per valutare la sua concentrazione nel sangue dovuta sia al fumo che all'inquinamento ambientale, alcune misure antropometriche quali la circonferenza della vita e dei fianchi e del braccio destro e alcune indagini ematochimiche come l'emocromo e la raccolta delle urine delle 24 ore, quest'ultima per valutare l'introito giornaliero di sodio, potassio e iodio.

Queste determinazioni sono confrontabili per i vari paesi dell'UE in quanto seguono un protocollo internazionale, devono essere realizzate con procedure e metodologie standardizzate e sono soggette a controllo di qualità internazionali.

#### **Attività programmata**

Sono stati arruolati campioni rappresentativi in 20 Regioni sui quali sono stati misurati o sono in corso gli esami per valutare alcuni indicatori sullo stato di salute. I dati per Regione, non appena raccolti, sono disponibili sul sito web del progetto CUORE ([www.cuore.iss.it](http://www.cuore.iss.it)). Al termine della HES sarà possibile avere un quadro obiettivo della distribuzione delle abitudini e stili di vita, dei fattori di rischio e delle condizioni a rischio, nonché la prevalenza delle principali malattie cronico-degenerative nella popolazione adulta italiana per età, per sesso, per livello socio-economico, per macroaree e per l'Italia nel suo complesso. Saranno utilizzati per valutare lo stato di salute della popolazione italiana e integrati con i dati ISTAT della *Health Interview Survey* e con quelli derivati dallo studio PASSI (Progressi delle Aziende Sanitarie per la Salute in Italia) sulla percezione dello stato di salute.

Con questo studio l'Italia contribuisce alla *Joint Action* per lo studio pilota di un sistema di sorveglianza europeo, la *European Health Examination Survey*.

### **Indagini di campo su episodi acuti**

L'epidemiologia delle malattie infettive è caratterizzata dall'insorgenza di eventi epidemici, la cui indagine epidemiologica con metodi descrittivi e analitici consente di ottenere rilevanti informazioni sulla fonte dell'evento, i fattori di rischio, le azioni di controllo da intraprendere e la loro efficacia sul campo. L'indagine delle epidemie costituisce inoltre una importante occasione di formazione e di collaborazione tra gli epidemiologi che lavorano in strutture nazionali e gli operatori del territorio.

Il Reparto di Epidemiologia e malattie infettive del CNESPS svolge regolarmente indagini di campo di eventi epidemici, recenti esempi in tal senso sono stati le indagini su casi di legionellosi, Chikungunya e micobatteriosi atipiche.

#### **Attività programmata**

Il Reparto di Epidemiologia e malattie infettive del CNESPS prevede di proseguire l'attività di supporto per le indagini di campo in occasione di epidemie e altre emergenze infettivologiche nei prossimi anni su richiesta delle Regioni e delle Autorità sanitarie locali in ambito nazionale o in collaborazione con organizzazioni europee e internazionali.

### **Osservatorio del Rischio Cardiovascolare**

Gli studi degli ultimi anni hanno dimostrato che circa l'80% delle malattie cardiovascolari sono prevenibili e controllabili intervenendo sugli stili di vita: fumo, alimentazione, attività fisica, alcol. La prevenzione ha l'obiettivo di ridurre la frequenza delle malattie cardiovascolari, ritardarne la comparsa, ridurne la gravità e le conseguenze invalidanti rimuovendo i fattori di rischio a livello individuale e di comunità; ciò consente di ridurre notevolmente i costi diretti e indiretti per il trattamento di queste patologie e delle loro complicazioni.

Il piano operativo del Piano Nazionale di Prevenzione 2005-2007 ha avuto tra i suoi obiettivi la diffusione della carta del rischio cardiovascolare e del punteggio individuale, strumenti per la stima del rischio cardiovascolare globale assoluto (Progetto CUORE-ISS). Questi strumenti consentono di misurare nella popolazione sana di età 35-69 anni la probabilità di andare incontro ad un evento cardiovascolare maggiore (infarto del miocardio o ictus) nei successivi dieci anni conoscendo il livello di alcuni fattori di rischio (età, sesso, pressione arteriosa sistolica e terapia antipertensiva, colesterolemia totale e HDL, fumo, diabete). Questi strumenti consentono di identificare soggetti a rischio basso, moderato, elevato e attivare azioni finalizzate alla riduzione dei fattori di rischio modificabili e al monitoraggio del rischio nel tempo.

È necessario sensibilizzare i medici, in primo luogo gli MMG, riguardo l'importanza della prevenzione cardiovascolare, formarli e aggiornarli riguardo alla stima del rischio e al trattamento, farmacologico e non farmacologico, dei fattori di rischio.

Il Ministero della Salute, in collaborazione con l'ISS e l'AIFA, ha lanciato il piano nazionale di formazione degli MMG sull'uso e applicazione della valutazione del rischio cardiovascolare (tuttora in corso in diverse Regioni). Sono stati realizzati, pubblicati e distribuiti due manuali (formatori e partecipanti). Il percorso formativo prevede anche la raccolta nella pratica clinica di dati sulla valutazione del rischio, sui fattori di rischio, sulle azioni di *counselling* intraprese e sulla *compliance* farmacologica.

Le nuove competenze acquisite tramite l'intervento formativo, adeguatamente integrate nel piano operativo locale, serviranno ad indurre un cambiamento dello stile di vita tra gli individui ad alto rischio e nella popolazione generale, a ridurre l'incidenza delle patologie cardiovascolari e a contribuire all'eliminazione delle disuguaglianze regionali. Il numero dei corsi svolti per regione e il numero dei medici che hanno frequentato i corsi di formazione

saranno indicatori di processo. Il numero di valutazioni, l'andamento del rischio e dei fattori di rischio potranno aiutare a valutare l'efficacia pratica degli strumenti carta del rischio e punteggio individuale.

#### **Attività programmata**

Verrà implementato l'invio dei dati all'Osservatorio del Rischio Cardiovascolare (ORC) che fornirà al Ministero della Salute, all'ISS, all'AIFA e alle Regioni una piattaforma di analisi dei dati raccolti con il programma cuore.exe e, agli MMG, uno strumento per confrontare i dati del rischio cardiovascolare dei loro assistiti con le medie regionali e nazionali.

A dicembre 2008 729 MMG avevano effettuato e inviato all'ORC, nel rispetto della legge sulla privacy, 76.901 valutazioni del rischio cardiovascolare in 32.932 uomini e 39.122 donne. Il programma nazionale di formazione proseguirà nelle Regioni e nelle associazioni della medicina generale. Il programma per la valutazione del rischio verrà inserito nei software della medicina generale per facilitarne l'uso come strumento routinario di pratica clinica e medicina di opportunità.

L'ORC continuerà la raccolta dei dati come strumento di sorveglianza del rischio cardiovascolare, dei fattori di rischio, delle azioni sugli stili di vita, della appropriatezza terapeutica in prevenzione primaria, aiutando a valutare l'efficacia della diffusione della valutazione del rischio cardiovascolare. Verrà realizzato un manuale per la prevenzione delle recidive coronariche e cerebrovascolari ad integrazione di quello sull'uso della carta del rischio in modo che la prevenzione divenga parte integrante nella formazione degli MMG.

### **Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare**

L'obiettivo dell'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare (OEC) è quello di descrivere, a dieci anni di distanza dal precedente esame, alcune caratteristiche individuali riconosciute come fattori di rischio, le abitudini di vita (alimentazione, attività fisica, abitudine al fumo di sigaretta), nonché la prevalenza di condizioni a rischio (ipertensione arteriosa, dislipidemia, obesità, diabete), identificare aree di patologia cardio-cerebrovascolare per le quali è necessario intervenire in termini preventivi, diagnostici, terapeutici e assistenziali e studiare gli andamenti temporali dei fattori di rischio e delle malattie cardio-cerebrovascolari su campioni statistici, rappresentativi della popolazione generale di età 35-79 anni. La prima indagine si è svolta nel 1998-2002 con l'esame di 9.700 persone. La seconda indagine è iniziata nel 2008 ed è tuttora in corso. La numerosità richiesta per la realizzazione degli obiettivi previsti è quella di esaminare 9.020 individui di età compresa fra 35 e 79 anni con un tasso di partecipazione del 70%. Tale numerosità deve essere raggiunta attraverso l'arruolamento di un campione in ogni regione, estratto in modo casuale dalla popolazione generale (un campione di 220 persone ogni milione e mezzo di abitanti).

Vengono eseguiti i seguenti rilievi: un questionario (comprendente informazioni anagrafiche, abitudini e stili di vita, in particolare sulle abitudini alimentari, anamnesi patologica remota, terapie in atto, ricorso ai servizi sanitari con particolare riguardo ai ricoveri ospedalieri, familiarità per cardiopatia coronarica, accidenti cerebrovascolari, diabete, ipertensione e ipercolesterolemia), un prelievo di sangue (per l'esecuzione di colesterolemia totale e HDL, trigliceridemia e glicemia), l'esecuzione di misure antropometriche (peso, altezza, circonferenza della vita e dei fianchi), misurazione della pressione arteriosa, elettrocardiogramma, raccolta delle urine delle 24 ore (per sodio, potassio, creatinina urinaria). Campioni biologici vengono conservati (siero, plasma, *buffy coat*, emazie impacchettate e urine) presso la banca di campioni biologici. La prevalenza

delle condizioni a rischio e delle malattie cardio-cerebrovascolari saranno disponibili per età, genere, livello socio-economico, per l'intero territorio e per macroaree.

Il progetto è stato approvato dal Comitato Etico dell'ISS in data 11/3/2008 ed è inserito nell'ambito del programma Guadagnare Salute – rendere facili le scelte salutari – del Ministero della Salute per la sorveglianza e valutazione della azioni di prevenzione.

#### **Attività programmata**

Verranno arruolati campioni rappresentativi in ogni Regione sui quali verranno misurati i fattori (pressione arteriosa, assetto lipidico, indice di massa corporea, abitudine al fumo, alimentazione e attività fisica) e valutate le condizioni a rischio cardiovascolare (dislipidemia, ipertensione arteriosa, sovrappeso e obesità), i relativi trattamenti (antipertensivo, dislipidemico o per il trattamento) e la frequenza di stili di vita corretti (inattività fisica, abitudini alimentari e abitudine al fumo, eccessivo consumo di sale e di alcol). Gli esami ematochimici (colesterolemia totale e HDL, LDL, glicemia, trigliceridemia) verranno effettuati centralmente. Al termine dell'esame sarà possibile avere un quadro obiettivo della distribuzione e frequenza delle condizioni a rischio cardiovascolare nella popolazione adulta italiana ed essendo disponibili i dati raccolti nel 1998-2002 adottando le stesse metodologie e procedure, sarà possibile valutare il trend dei valori medi e della frequenza delle condizioni a rischio nella popolazione italiana. Lo studio dei trend con l'applicazione di procedure e metodologie standardizzate e confrontabili permetterà anche la valutazione dell'efficacia di campagne di prevenzione realizzate in questi anni, nonché l'implementazione di azioni specifiche in differenti regioni o per programmare interventi di prevenzione secondaria, per migliorare i servizi e porre maggiore attenzione verso i trattamenti.

#### **Revisione e valutazione della documentazione clinica a corredo delle domande di registrazione di vaccini (parte IV) nazionali, per mutuo riconoscimento e centralizzate europee**

Le procedure di immissione in commercio (AIC) dei vaccini sono state uniformate per tutta l'UE, e la normativa attuale prevede che i nuovi prodotti siano autorizzati con procedura centralizzata. Presso l'EMA si riuniscono i gruppi di lavoro che includono esperti nazionali su specifici settori. Il Direttore del CNESPS è membro del *Vaccine Working Party* e partecipa ai lavori dell'EMA con la redazione di linee di indirizzo generali e di pareri per singoli prodotti di nuova introduzione. Inoltre, per i prodotti precedentemente autorizzati con procedura di mutuo riconoscimento e per i prodotti con registrazione nazionale, sono frequenti le procedure di revisione della documentazione acquisita post-marketing. In questo ambito, la Direzione del CNESPS insieme al Reparto Epidemiologia delle malattie infettive svolge supporto alla revisione della documentazione degli studi clinici di sicurezza, immunogenicità ed efficacia dei vaccini presentata a corredo delle domande di AIC (Parte IV dei dossier). La revisione si concretizza in un parere tecnico, formulazione di domande di chiarimento, valutazione delle risposte e commento finale. Negli ultimi anni sono state condotte tali attività sia in qualità di *Rapporteur o Co-rapporteur* che come *Assessor* nazionale. In particolare, sono state svolte funzioni di *Rapporteur* per il vaccino Varivax antivaricella. L'attività di *Assessor* è stata svolta per numerosi prodotti autorizzati con procedura centralizzata o di mutuo riconoscimento (es. Gardasil, Proquad, Aflunov, Zostavax, Hexavac, Quattvaxem, Panenza, Fluad, Hexaxim, Memveo, Vepacel) e su mandato dell'AIFA sono state svolte valutazioni di prodotti autorizzati in cui l'Italia è *peer review*.

### **Attività programmata**

L'attività di supporto alla revisione e valutazione della documentazione clinica a corredo delle domande di registrazione e delle valutazioni post-marketing dei vaccini proseguirà nel triennio 2012-2014, limitatamente alle risorse umane disponibili. Per le procedure di AIC, tale attività verterà sulla revisione dei trial clinici di fase II e III, che valutano l'immunogenicità, la sicurezza e l'efficacia clinica dei vaccini.

### **Segretariato del *Working Party* del *Public Health Programme* dedicato agli *Health Indicator* e valutazione di implementabilità nei 25 Stati della UE (dal 2005)**

Le attività ECHIM sono rivolte all'identificazione, definizione e implementazione dei modelli, dei sistemi e degli indicatori utili al monitoraggio dello stato di salute nella popolazione e vengono svolte in stretta collaborazione e attivo coordinamento con ISTAT, Ministero della Salute, Eurostat, WHO, OECD e CE. Le attività determineranno la definizione dello standard europeo di monitoraggio dello stato di salute dei cittadini europei.

L'ISS svolge il ruolo di Segretariato del *Working Party* del *Public Health Programme* dedicato agli *Health Indicator* e nell'ambito di un *Network europeo* di cinque *public Health Institutes* attua la valutazione di implementabilità nei 25 Stati della UE [http://europa.eu.int/comm/health/ph\\_projects/2004/action1/action1\\_2004\\_02\\_en.htm](http://europa.eu.int/comm/health/ph_projects/2004/action1/action1_2004_02_en.htm) e [www.healthindicators.org](http://www.healthindicators.org).

### **Attività programmata**

Le attività proseguiranno garantendo il ruolo di coordinamento dell'Istituto nell'ambito di un *Network europeo* e i risultati, prima di essere disseminati, verranno confrontati con quelli dei progetti nazionali:

- SIVEAS, “Validazione e comparazione Italia/EU degli indicatori LEA-SIVeAS”
- SIVEAS, “Strumenti flessibili per determinare le priorità sanitarie.

Le competenze specifiche relative alla valutazione del *Burden of Disease* saranno oggetto di collaborazione nell'ambito del *Global Burden of Disease Study* attraverso la partecipazione al *Core Member of the Cross-Cutting Issues Expert Group*.

### **Sistema di sorveglianza epidemiologica dell'interruzione volontaria di gravidanza**

Raccolta trimestrale, mediante questionario, dei dati regionali relativi alle IVG. Verifica della qualità e della congruenza dei dati attraverso una costante attività di controllo, con contatto attivo e continuo con le diverse realtà regionali. Analisi dei dati e presentazione dei risultati sia a livello nazionale che regionale. Predisposizione della Relazione per il Ministro della Salute sulla attuazione della Legge contenente norme per la tutela sociale della maternità e per l'interruzione volontaria di gravidanza (Legge 194/78) che viene presentata annualmente al Parlamento. Ritorno dell'informazione alle regioni, anche attraverso incontri annuali.

### **Attività programmata**

L'attuale evoluzione dell'andamento dell'interruzione volontaria di gravidanza, con la costante diminuzione del ricorso all'aborto tra le cittadine italiane e il sempre maggiore contributo delle cittadine straniere, dovuto all'aumento della loro presenza e al maggior rischio di incorrere in gravidanze non desiderate rispetto alle italiane, impone una sempre più attenta attività di sorveglianza.

In particolare verrà analizzata l'evoluzione del fenomeno nelle diverse articolazioni sociali delle donne in età feconda e tenendo conto della loro cittadinanza. Eventuali studi di

approfondimento verranno condotti per quanto riguarda le motivazioni del ricorso all'IVG e le tecniche adoperate per l'effettuazione dell'intervento.

### **Sistema nazionale di sorveglianza della legionellosi e rete europea ELSDNET**

Nel 1983 il Ministero della Sanità ha inserito la legionellosi tra le malattie a denuncia obbligatoria istituendo presso l'ISS il Registro nazionale della legionellosi, in cui vengono raccolti tutti i casi di malattia diagnosticati. Per ogni caso confermato o presunto deve essere compilata una scheda che contiene informazioni anagrafiche, cliniche ed epidemiologiche e su eventuali fattori di rischio.

Le segnalazioni ricevute con le schede di sorveglianza vengono periodicamente integrate con le notifiche computerizzate raccolte mediante il Sistema Informatizzato delle Malattie Infettive (SIMI). Tale integrazione serve a migliorare la completezza delle segnalazioni dato che a volte vengono compilati i questionari di sorveglianza e non le schede di notifica o viceversa. Gli obiettivi del sistema sono: monitorare la frequenza di legionellosi sia dal punto epidemiologico che clinico-nosologico, con particolare attenzione ai fattori di rischio per l'acquisizione della malattia; identificare eventuali variazioni nel trend; e identificare tempestivamente cluster epidemici dovuti a particolari condizioni ambientali al fine di interrompere il rischio di trasmissione.

Il Reparto di Epidemiologia e malattie infettive partecipa anche alla rete di sorveglianza europea della legionellosi associata ai viaggi. Le informazioni relative ai pazienti stranieri che acquisiscono l'infezione in Italia o ai casi che si verificano in cittadini italiani che hanno viaggiato in Italia o all'estero vengono inviate al network ELDSnet (*European Legionnaires' Disease Surveillance network* coordinato e gestito dall'ECDC di Stoccolma).

L'ELDSnet inoltre segnala all'ISS i casi di legionellosi che si verificano in viaggiatori stranieri che hanno trascorso un periodo in Italia, riportando informazioni sulle strutture recettive in cui hanno soggiornato i pazienti e che potrebbero rappresentare le fonti dell'infezione. Il CNESPS dell'ISS provvede, a sua volta, a segnalare i casi al Dipartimento di Prevenzione del Ministero della Salute, agli Assessorati regionali alla sanità e ai responsabili dei Servizi di Igiene Pubblica delle ASL di competenza che hanno il compito di attivare l'indagine ambientale ed epidemiologica presso le strutture indicate. Nel caso in cui la possibile fonte di infezione sia una struttura recettiva straniera, l'EDLSnet provvede ad informare le autorità sanitarie del presunto paese d'infezione.

#### **Attività programmata**

Il centro di riferimento per la sorveglianza epidemiologica nazionale, attualmente situato presso il Reparto di Epidemiologia e malattie infettive del CNESPS, effettuerà come negli anni precedenti la validazione, l'analisi e l'elaborazione annuale dei dati di sorveglianza. Verranno quindi stimati i tassi di incidenza della legionellosi sia a livello nazionale che regionale e il numero e la distribuzione proporzionale dei casi di legionellosi comunitaria, associata ai viaggi, e nosocomiale. Verrà analizzato annualmente anche l'andamento della legionellosi associata ai viaggi, per verificare l'impatto delle misure di prevenzione e controllo raccomandate dalle linee guida italiane (del febbraio 2005) e rivolte ai gestori di strutture recettive. Annualmente verrà pubblicato sul Notiziario dell'ISS un rapporto sull'andamento della legionellosi in Italia e i dati del registro nazionale saranno caricati nel sistema *TESSY* dell'ECDC.

## **Sistema nazionale di sorveglianza della rosolia in gravidanza e rosolia congenita**

Il Piano nazionale di eliminazione del morbillo e della rosolia congenita è stato rinnovato per il quinquennio 2010-2015. Il Piano si prefigge di ridurre e mantenere l'incidenza della rosolia congenita a valori inferiori a un caso ogni 100.000 nati vivi. Al fine di monitorare l'incidenza di rosolia congenita in Italia e valutare l'impatto delle strategie vaccinali contro questa infezione, il Piano ribadisce l'importanza di rafforzare il sistema di sorveglianza specifico per la sindrome/infezione da rosolia congenita e per l'infezione da virus della rosolia in gravidanza, che, sulla base delle indicazioni del Piano di Eliminazione del 2003, era stato introdotto a livello nazionale dal Decreto del Ministero della Salute 14/10/2004 (GU n. 259 del 4/11/2004).

Da gennaio 2005, quindi, la rosolia congenita e la rosolia in gravidanza sono soggette a notifica obbligatoria come malattie infettive di classe III (secondo il vigente DM 15/12/1990), che richiedono sorveglianze speciali. Per la notifica dei casi deve essere osservato il seguente flusso informativo:

- il medico segnala ogni caso sospetto di sindrome/infezione da rosolia congenita o di infezione da rosolia in gravidanza entro due giorni alla ASL (anche se le informazioni o i risultati di laboratorio fossero incompleti o mancanti);
- il competente servizio della ASL, insieme al medico segnalatore e agli altri sanitari che seguono il caso, cura l'indagine epidemiologica e la raccolta di tutte le informazioni necessarie per la compilazione della scheda di notifica;
- la ASL invia la suddetta scheda alla Regione o Provincia autonoma;
- la Regione invia le schede di notifica con cadenza mensile al Ministero della Salute (Ufficio Malattie Infettive, Dip. Prevenzione) e all'ISS (Reparto di Epidemiologia e malattie infettive del CNESPS); invia inoltre riepiloghi mensili per provincia sesso ed età a Ministero della Salute, ISS e ISTAT.

Il nuovo Piano ha modificato le schede da utilizzare per la notifica dei casi, adeguandole alle definizioni europee di caso elaborate dall'ECDC.

Il Reparto di Epidemiologia e malattie infettive del CNESPS ha l'incarico, insieme al Ministero della Salute, di ricevere le notifiche, verificarne l'accuratezza, archiviare i dati in un database dedicato e sviluppato ad hoc presso l'ISS, analizzare i dati e curare il ritorno delle informazioni.

### **Attività programmata**

Trattandosi di un sistema di sorveglianza, è prevista la continua rilevazione e valutazione delle notifiche che pervengono presso l'ISS, il relativo inserimento delle informazioni contenute nelle schede di notifica nel database dedicato e una periodica analisi dei dati raccolti.

Per la rosolia in gravidanza le principali variabili analizzate sono: età, nazionalità, parità, screening preconcezionale, stato vaccinale, conferma di laboratorio, esito della gravidanza. Per la rosolia congenita le principali variabili analizzate sono: nazionalità, classificazione dei casi (sospetto, probabile, confermato).

Numerose ASL non possiedono un protocollo standardizzato per il monitoraggio dei casi affetti da sindrome/infezione da rosolia congenita o da rosolia in gravidanza, pertanto la raccolta di queste importanti informazioni si è rivelata un punto critico; attraverso l'interazione con i referenti regionali e di ASL, verranno migliorate le procedure finalizzate a raccogliere le informazioni sul follow-up dei casi di rosolia congenita e sull'esito delle gravidanze.

I dati verranno disseminati periodicamente attraverso il Notiziario dell'ISS, il portale di Epicentro e presentati in occasione di corsi e convegni.

### **Sistema nazionale di sorveglianza delle malattie batteriche invasive**

Il sistema nazionale di sorveglianza delle meningiti batteriche è stato istituito nel gennaio 1994, con la lettera circolare n. 400.2/15/5709 del 29/12/1993. L'obiettivo del sistema di sorveglianza è descrivere le caratteristiche epidemiologiche dei casi di meningite batterica e quantificare il contributo relativo ai diversi agenti batterici nella loro eziologia. Nel 2007 il sistema è stato allargato alla sorveglianza di tutte le altre forme di malattie batteriche invasive (ad esempio sepsi) da *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*.

La Direzione Generale dell'Ospedale di ricovero invia all'Assessorato alla Sanità, al Ministero della Salute (Direzione Generale della Prevenzione, Ufficio III, Malattie Infettive e Profilassi Internazionale) e all'ISS (Reparto di Epidemiologia e malattie infettive del CNESPS), la scheda di segnalazione per i casi confermati di meningite batterica. Nel caso di malattie batteriche invasive da *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* è richiesto anche l'invio del ceppo batterico, eventualmente isolato al laboratorio di riferimento presso il Dipartimento MIPI.

Lo sviluppo dell'informatizzazione del sistema di sorveglianza ha come obiettivo una migliore gestione dei flussi informativi e in futuro la convergenza con il sistema di segnalazione delle malattie infettive.

#### **Attività programmata**

Con l'introduzione del vaccino 13 valente anti pneumococco e in attesa del vaccino anti meningococco B, il sistema fornirà informazioni sulla distribuzione dei casi e, in collaborazione con il MIPI, anche dati relativi alla tipizzazione dei patogeni responsabili di questi quadri clinici per una eventuale stima della quota dei casi prevenibili da vaccino. Queste informazioni sono indispensabili per le strategie di offerta vaccinale e per il monitoraggio delle modifiche nella distribuzione di frequenza di patogeni non prevenibili con la vaccinazione. La sorveglianza delle malattie batteriche invasive sarà rinforzata con la migrazione totale verso una segnalazione di tipo elettronica presso il CNESPS. È prevista, con il Ministero della Salute, una continua collaborazione per la condivisione dei dati e la trasmissione dei dati all'ECDC.

### **Sistema nazionale di sorveglianza integrata dell'influenza**

Dal 2009, anno della pandemia influenzale, in Italia è stata implementata una sorveglianza integrata dell'influenza. Alcuni sistemi già esistenti sono stati rafforzati mentre altri sono stati implementati per la prima volta in Italia. La sorveglianza delle sindromi influenzali è un sistema di sorveglianza sentinella basato sugli MMG e Pediatri di libera scelta rappresentativi di tutte le Regioni, attivo in Italia dal 1999. Ogni anno partecipano alla rete circa 1.000 medici e pediatri con una copertura di almeno il 2% della popolazione italiana. Il CNESPS provvede a elaborare i dati e a produrre un rapporto settimanale. Per le attività inerenti alla somministrazione del vaccino alle categorie di priorità, il CNESPS coordina un piano di rilevazione della copertura vaccinale. L'obiettivo del piano è quello di raccogliere informazioni tempestive e accurate da Regioni sulla copertura vaccinale nelle categorie in cui il vaccino è raccomandato. Il piano permette di disporre del dato relativo al numero di dosi somministrate, utile per stabilire il denominatore per il calcolo dei tassi di eventuali eventi avversi, a seguito della somministrazione del vaccino influenzale. La copertura vaccinale è calcolata sui dati relativi alle dosi somministrate e sulla popolazione eleggibile alla vaccinazione.

È stata attivata inoltre una sorveglianza speciale delle ospedalizzazioni, delle forme gravi e complicate e dei decessi dovuti a influenza. L'obiettivo della sorveglianza è quello di

conoscere e descrivere l'epidemiologia dei casi gravi e dei decessi dovuti all'influenza in termini di possibili fattori di rischio legati a sesso, età, eventuali patologie specifiche o distribuzione geografica. Per ampliare il monitoraggio della situazione epidemiologica dell'influenza ci si è avvalsi della rete sentinella di strutture di pronto soccorso già esistente, coinvolgendo ulteriori Pronto Soccorso (PS) dotati di sistemi informatizzati di rilevazione degli accessi, in grado di inviare i dati settimanalmente secondo il tracciato record concordato. Il sistema si basa sulla trasmissione settimanale dei dati relativi al totale degli accessi ai PS, dai quali vengono poi selezionati dei codici ICD9-CM che definiscono una sindrome respiratoria acuta. Sulla base dei dati storici, inviati dai pronto soccorso insieme alla loro adesione, è stato stimato con un modello statistico di regressione periodica una linea di base che rappresentava il numero di accessi attesi e due soglie di allerta. Ogni settimana i dati raccolti vengono confrontati con la linea di base calcolata dal modello, e il confronto permette di valutare l'andamento e l'eventuale superamento delle soglie d'allerta. Il sistema consente di rilevare tempestivamente l'andamento degli accessi per sindrome respiratoria, indicatore indiretto di una maggiore attività dei virus influenzali.

#### **Attività programmata**

Le attività previste per i prossimi anni riguardano il rafforzamento dei sistemi di sorveglianza già attivi e la messa a punto di ulteriori metodologie di analisi dei dati per le sorveglianze sindromiche capaci di stimare la linea di base e costruire le soglie di allerta. Per quanto riguarda la sorveglianza Influnet si cercherà di implementare metodologie capaci di stimare sia l'inizio che la fine del periodo epidemico e soglie entro cui, con una certa probabilità, la curva epidemica stagionale sarà compresa. Inoltre sarà stimata l'incidenza delle sindromi influenzali nella popolazione, verrà valutato l'eventuale gradiente geografico di diffusione, da utilizzare in modelli per la previsione del numero di casi nelle stagioni influenzali. Sarà infine costruita una base di dati al fine di valutare l'impatto delle epidemie stagionali di influenza.

### **Sistema nazionale di Sorveglianza speciale del morbillo**

Il sistema di sorveglianza speciale del morbillo è stato istituito ad aprile 2007 (Circolare ministeriale del 20/4/2007 "Piano nazionale di eliminazione del morbillo e della rosolia congenita. Istituzione di un Sistema di sorveglianza speciale per morbillo") per migliorare la sorveglianza della malattia soprattutto in termini di tempestività, completezza, ed esaustività delle notifiche, in vista dell'obiettivo della sua eliminazione inizialmente prevista per il 2010 (Piano nazionale per l'eliminazione del morbillo e della rosolia congenita 2003-2007). Il nuovo Piano di eliminazione, approvato in Conferenza Stato-Regioni il 23 marzo 2011 ha spostato gli obiettivi di eliminazione del morbillo all'anno 2015, in accordo con quanto stabilito dalla Regione europea della WHO.

La popolazione in sorveglianza è l'intera popolazione italiana. Il sistema di sorveglianza speciale prevede che tutti i casi sospetti della malattia vengano indagati con appropriate indagini epidemiologiche e/o di laboratorio e tempestivamente segnalati. In particolare è previsto il seguente flusso informativo:

- il medico segnala entro 12 ore ogni caso sospetto di morbillo alla ASL;
- la ASL svolge tempestivamente l'indagine epidemiologica del caso con l'obiettivo di confermare la diagnosi attraverso appropriate indagini di laboratorio, individuare l'origine del contagio incluso se il contagio è avvenuto all'estero o sul territorio nazionale, identificare la presenza di altri casi segnalati nei 21 giorni precedenti, valutare la presenza di contatti suscettibili per la profilassi post esposizione, vengono

inoltre raccolti campioni per l'isolamento virale o identificazione del genoma virale e la genotipizzazione del virus, da almeno 5-10 casi di ogni focolaio.

- la ASL trasmette immediatamente il modulo standard alle autorità regionali;
- la Regione invia immediatamente il modulo al Ministero della Salute e l'ISS (Reparto di Epidemiologia e malattie infettive del CNESPS)
- il Ministero della Salute, in collaborazione con il Reparto di Epidemiologia e malattie infettive, provvede alla trasmissione mensile dei dati all'ECDC e quindi alla WHO.

Presso il Reparto di Epidemiologia e malattie infettive è stato creato un database dedicato. Le schede ricevute vengono controllate per verificare la completezza e la qualità delle informazioni e i dati vengono inseriti nel database. In caso di informazioni mancanti, in particolare riguardo a variabili chiave, vengono contattati i referenti regionali o di ASL per richiedere i dati. I casi vengono classificati in base alla definizioni di caso della CE utilizzando criteri clinici, epidemiologici e di laboratorio.

#### **Attività programmata**

Nel prossimo triennio sarà necessario rafforzare ulteriormente la sorveglianza del morbillo che dovrà essere in grado di confermare in laboratorio tutti i casi sporadici della malattia e almeno un caso di ogni catena di trasmissione. Dovranno inoltre essere raccolti campioni per la tipizzazione del virus, necessaria per mostrare se l'infezione è dovuta a trasmissione indigena o a importazione.

Verranno elaborati regolarmente i dati di incidenza della malattia a livello nazionale e per età e area geografica, e altri dati particolarmente rilevanti come lo stato vaccinale dei casi, le complicanze, gli esiti e i ricoveri.

È in corso una valutazione del sistema di sorveglianza speciale del morbillo attraverso l'analisi qualitativa e quantitativa delle informazioni raccolte mediante il modulo standard per l'indagine epidemiologica e attraverso il confronto delle stesse informazioni con altri flussi di dati.

### **Sistemi informativo sperimentale per l'antibioticoresistenza**

La diffusione di batteri resistenti agli antibiotici rappresenta un importante problema di sanità pubblica: questo fenomeno è infatti in aumento in molti Paesi europei, rendendo problematica la terapia di molte infezioni, ed è aggravato anche dalla mancanza di nuovi antibiotici immessi sul mercato o in sviluppo.

In ambito europeo, l'Italia è uno dei paesi più interessati dal fenomeno dell'antibioticoresistenza sia per problematiche ben conosciute come MRSA, *vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus* (VISA), non sensibilità di *S. pneumoniae* alla penicillina, che a nuove emergenze come le *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi.

L'unico sistema stabile di monitoraggio in Italia a livello nazionale è ARISS, il sistema creato e gestito dall'ISS (CNESPS/MIPI) che raccoglie dati di resistenza agli antibiotici relativi ad alcuni patogeni selezionati in alcuni materiali (sangue e liquor).

Sebbene il sistema fornisca informazioni molto importanti, da diversi anni è stato necessario sviluppare un sistema, prima parallelo e ora affiancato, denominato MICRONET (sviluppato dallo stesso gruppo in carico di ARISS) che raccogliesse dati di isolamento e test di resistenza agli antibiotici dai sistemi informativi di un campione di laboratori di microbiologia in tempo reale (al momento 15 laboratori producono dati di buona qualità). Con il sistema MICRONET è possibile quindi disporre di dati aggiornati per successivi approfondimenti (studi) al momento del bisogno e dell'identificazione di allerte precoci.

#### **Attività programmata**

Le attività previste per i prossimi anni riguardano sia aspetti generali che specifici.

Riguardo i primi sono programmati la stabilizzazione dei laboratori partecipanti e del flusso di dati, la valorizzazione e la promozione della risorsa, il monitoraggio automatico del fenomeno dell'antibiotico resistenza con produzione di feedback a intervalli regolari, collaborazione con il Ministero della Salute per l'identificazione di allerte e fornitura di dati per esplorazione di tematiche specifiche, l'avvio di studi o la fornitura di supporto a studi nel settore dell'impatto del fenomeno dell'antibiotico resistenza e il suo controllo.

Per aspetti specifici gli obiettivi sono: una piena integrazione con il progetto ARISS (con la raccolta anche degli isolati di particolare interesse), l'approfondimento del problema della resistenza ai carbapenemi in batteri Gram negativi, l'invio di dati all'ECDC e l'avvio di studi sull'impatto in termini di mortalità da infezioni invasive da *K. pneumoniae*.

### **Sorveglianza dei casi umani delle malattie trasmesse da vettori con particolare riferimento alla Chikungunya, Dengue e West Nile**

Numerosi *Arbovirus* sono responsabili di infezioni a decorso clinico e sub-clinico nell'uomo. La maggior parte degli *Arbovirus* sopravvivono in cicli di zoonosi in cui l'uomo solo occasionalmente può rappresentare un ospite. Le infezioni nell'uomo vengono acquisite accidentalmente tramite la puntura di un artropode ematofago infetto che funge da vettore. Solo in pochi casi l'uomo funge da principale fonte dell'amplificazione del virus e di infezione per il vettore, come nel caso della Dengue, del Chikungunya e della Febbre gialla. La trasmissione parenterale, attraverso puntura accidentale o trasfusioni di sangue e trapianti di organi infetti, insieme a quella verticale (madre-figlio) sono state occasionalmente descritte.

Al momento attuale ci sono oltre 100 virus classificati come *arbovirus* in grado di produrre malattia nell'uomo. La maggior parte di questo sono stati classificati in famiglie e generi di cui i *Togaviridae* (*Alphavirus*), i *Flaviridae* (*Flavivirus*) e i *Bunyaviridae* (*Bunyavirus* e *Phlebovirus*) sono i più noti.

Negli ultimi anni fattori correlati a cambiamenti climatici e alla globalizzazione, che hanno portato all'aumento di viaggi a scopo turistico, professionale o di scambi commerciali verso molte zone del mondo hanno causato l'importazione e la riproduzione nel territorio di nuove specie di vettori provenienti da altri Paesi (tra cui zanzare del genere *Aedes albopictus*). Difatti, in Italia, a partire dagli anni '90 si è assistito alla diffusione di specie di zanzare del genere *Aedes albopictus*, in quasi tutte le Regioni italiane. Non va infine dimenticato, che parallelamente, si sta verificando anche un ampliamento dell'area di distribuzione di artropodi indigeni (in particolare flebotomi, zecche e zanzare) vettori di malattie endemiche nel nostro paese (leishmaniosi, Malattia di Lyme, Encefalite da zecche, Febbre bottonosa, malattia da *West Nile*), seguito da una tendenza al graduale aumento dei casi di infezione registrato negli ultimi anni.

Altri fenomeni quali i flussi migratori di alcune specie di uccelli, l'interazione tra virus e alcune specie animali che fungono da serbatoio per agenti trasmissibili hanno svolto un ruolo fondamentale per la comparsa di alcuni focolai di Arbovirosi in numerosi Paesi europei (*West Nile Virus* in Italia, Romania e Grecia e Chikungunya in Emilia-Romagna).

Pertanto, in Italia e in Europa, si è assistito nell'ultimo decennio in sanità pubblica umana all'aumento della segnalazione di casi importati e autoctoni di alcune Arbovirosi molto diffuse nel mondo, tra cui la Dengue, la febbre Chikungunya e la malattia da virus *West Nile*.

#### **Attività programmata**

Le attività previste dal Reparto di Epidemiologia e malattie infettive, in collaborazione con il Ministero della Salute e le Regioni, per i prossimi anni sono rappresentate dal continuare l'attività di coordinamento della sorveglianza epidemiologica attraverso il sistema

di trasmissione dati online sui casi sospetti di *West Nile*, Chikungunya e Dengue. I dati prodotti da tale sistema di sorveglianza verranno utilizzati per monitorare il fenomeno durante le stagioni estive e produrre report tempestivi sull'andamento delle segnalazioni. Inoltre, i dati di sorveglianza relativi ai casi confermati di *West Nile*, Chikungunya e Dengue saranno trasmessi all'ECDC attraverso la piattaforma *Tessy* per la trasmissione ufficiale dei dati al livello europeo.

### **Sorveglianza delle malattie cardiovascolari**

Il Sistema di sorveglianza delle malattie cardiovascolari ha l'obiettivo di stimare indicatori di frequenza di malattia, quali occorrenza (primi eventi e recidive), prevalenza, incidenza (nuovi eventi) e letalità. Per realizzare questi obiettivi vengono utilizzate diverse fonti di informazione: i registri di popolazione degli eventi coronarici e cerebrovascolari (Friuli, Brianza, Veneto, Firenze, Modena, Caltanissetta) che forniscono stime dell'occorrenza e letalità; l'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare, per stimare la prevalenza dell'infarto del miocardio, dell'ictus, dell'angina pectoris, della fibrillazione atriale, della *claudicatio intermittens*, dell'ipertrofia ventricolare sinistra; gli studi longitudinali del progetto CUORE, che forniscono stime di incidenza dell'infarto del miocardio e dell'ictus. È infatti noto che per avere un quadro esaustivo delle malattie cardiovascolari nella popolazione generale e per valutarne l'andamento nel tempo è necessario tener conto di molte fonti di informazione, sia quelle che valutano i pazienti che sopravvivono all'evento (prevalenza), sia quelli che valutano le persone che muoiono improvvisamente prima ancora di arrivare in ospedale (tasso di occorrenza e letalità). Inoltre, negli ultimi venti anni, grazie al miglioramento delle terapie in fase acuta, si è verificata una evoluzione verso un maggior numero di ricoveri in ospedale e di mortalità per quelle condizioni che rappresentano complicazioni o evoluzioni a lungo termine dell'infarto del miocardio o dell'ictus.

Le metodologie applicate nella raccolta e validazione degli eventi sono raccomandate a livello internazionale. L'appaiamento dei dati di mortalità e delle diagnosi di dimissione ospedaliera permettono l'identificazione degli eventi; la validazione di un campione di essi scelti in modo casuale durante tutto l'arco del singolo anno permette di identificare i valori predittivi positivi dei singoli codici di dimissione o causa di morte al fine di stimare gli eventi coronarici e cerebrovascolari fatali e non fatali, e valutarne la letalità a 28 giorni. Questionari standardizzati vengono somministrati per la valutazione della prevalenza; sono quelli di Rose della *London School of Hygiene and Tropical Medicine (Cardiovascular Survey Methods, WHO Geneva 2004)*, associati ad alterazioni stabilite in base alla lettura elettrocardiografica secondo il codice Minnesota. Trattandosi di metodologie e procedure applicate nei più importanti studi epidemiologici internazionali, i dati che ne derivano permettono di confrontare gli indicatori con quelli di altri paesi e di studiarne l'andamento nel tempo.

Lo studio dei trend con l'applicazione di criteri diagnostici standardizzati e confrontabili permetterà anche di valutare gli effetti di campagne di prevenzione realizzate in questi anni, ad esempio i benefici derivati dalla introduzione della legge di abolizione del fumo nei locali pubblici.

#### **Attività programmata**

Gli indicatori elaborati con i dati raccolti tramite le tre fonti di informazione descritte verranno presentati in modo da fornire indicazioni sull'impatto delle malattie cardio-cerebrovascolari. In particolare con i dati di incidenza, prevalenza, consumo di farmaci, trattamenti chirurgici, ricoveri ospedalieri, fattori di rischio, utilizzando il modello IMPACT,

verrà valutato l'andamento in discesa della mortalità per cardiopatia coronarica e per ictus degli ultimi 20 anni, identificando la parte attribuibile alle procedure terapeutiche in prevenzione secondaria, ai trattamenti in prevenzione primaria e ai cambiamenti dei fattori di rischio nella popolazione dovuti alla modificazione dello stile di vita. L'implementazione del Modello IMPACT permetterà anche di valutare gli anni di vita risparmiati.

Gli indicatori di frequenza di malattia verranno standardizzati prendendo come riferimento la popolazione europea e messi a disposizione della comunità scientifica, nonché confrontati con quelli prodotti da altri Paesi europei.

### **Sorveglianza nazionale delle intossicazioni accidentali da antiparassitari**

L'attività viene svolta in riferimento al DL.vo 194/1995 per l'attuazione della normativa 91/414/CEE in materia di immissione in commercio di prodotti fitosanitari, con cui viene richiesto che l'ISS promuova e coordini attività di sorveglianza su eventuali effetti sulla salute umana da parte di questi agenti (art. 17), e al DL.vo n. 174/2000 per il controllo dei biocidi immessi sul mercato, il quale prevede, in attuazione della normativa 98/8/CE (art. 23 e 24) la trasmissione alla CE di relazioni periodiche con indicazioni di eventuali casi di intossicazione causati da questi agenti. Il piano di lavoro prevede la sistematica revisione e analisi integrata della casistica trasmessa con procedura standard dai Centri Antiveneni, Dipartimenti di Prevenzione delle ASL e Regioni. Ciascun caso segnalato viene esaminato in applicazione di procedure standard per valutare dell'associazione tra l'esposizione e i segni/sintomi riportati. Qualora l'associazione risulti positiva, si procede alla valutazione della gravità del quadro clinico. Per quanto riguarda gli agenti antiparassitari, sono classificati in considerazione della loro destinazione di uso in Fitosanitari o Biocidi. All'interno di ciascuna delle due categorie principali, gli agenti sono allocati in sottocategorie di impiego e classi chimiche. Le analisi dei dati sono oggetto di rapporti annuali che vengono trasmessi ai referenti istituzionali. I risultati ottenuti sono utilizzati per l'individuazione a livello nazionale e regionale di problematiche emergenti, principalmente riferite alla pericolosità di formulati in commercio e a modalità di impiego scorrette. La base informativa disponibile, la quale acquisisce ogni anno circa 3.000 nuove segnalazioni, viene utilizzata per l'individuazione di priorità di intervento, l'approfondimento di tematiche specifiche, l'orientamento di attività di formazione e informazione rivolte agli utilizzatori. In particolare, i dati disponibili vengono ora proposti per verifiche sulla sicurezza dei formulati in commercio e come supporto per interventi di tipo normativo, in riferimento al regolamento comunitario per il controllo delle sostanze chimiche 1907/2006 (*REACH*).

#### **Attività programmata**

L'attività di valutazione e controllo degli incidenti causati da pesticidi verrà sviluppata in considerazione delle priorità identificate nell'ambito del progetto triennale 2012-2014 "Sorveglianza nazionale delle intossicazioni acute da pesticidi (biocidi e fitosanitari)", pianificato in riferimento all'art. 7 della Direttiva 2009/128/CE. Gli agenti (principi attivi e prodotti commerciali) coinvolti in incidenti associati a un elevato rischio di esposizione pericolosa degli astanti e/o degli utilizzatori verranno esaminati al fine di fornire elementi informativi per approfondimenti e valutazioni su: classificazione di pericolo adottata; modalità di confezionamento; informazioni presenti in etichetta; sicurezza delle modalità di utilizzo (es. mezzi protettivi, apparecchiature per l'applicazione, zone tampone, segnalazione delle aree trattate). La documentazione raccolta e le valutazioni effettuate saranno oggetto di rapporti tecnici da sottoporre alle autorità competenti a livello nazionale ed europeo.

## Ufficio di Statistica

L'Ufficio di Statistica dell'ISS (UdS) rappresenta l'ISS nell'ambito del Sistema Statistico Nazionale (SISTAN) e deve adempiere a tutti i compiti previsti dal provvedimento istitutivo del SISTAN (DL.vo 322/1989) contribuendo agli atti per la Relazione che il Presidente del Consiglio deve rendere al Parlamento sul SISTAN e alla stesura del Programma Statistico Nazionale (PSN). Quindi deve fornire ogni anno entro date fissate: i) una relazione dettagliata delle sue risorse e attività; ii) lo stato di attuazione del PSN del triennio vigente, attraverso una dettagliata descrizione dello stato di realizzazione dei lavori e della diffusione dei risultati. Un compito rilevante dell'UdS è contribuire alla sezione "Sanità" del PSN, proponendo l'inserimento e/o la conferma di "lavori statistici" (Progetti) svolti in ISS sotto forma di rilevazioni, se vengono rilevati dati *ad hoc*, di elaborazioni, se sono utilizzati dati raccolti da altri soggetti, o di studi progettuali, se vengono proposti per la prima volta. Quando nel Progetto vengono trattati dati personali (di cui al DL.vo 196/2003) l'UdS, con il responsabile del Progetto, dovrà fornire al SISTAN tutta una serie di informazioni dettagliate. Nella predisposizione del PSN è centrale il ruolo dei cosiddetti "Circoli di Qualità": organismi consultivi, organizzati sotto forma di gruppi di lavoro permanenti, formati dai responsabili e/o collaboratori degli Uffici di Statistica delle istituzioni che si occupano di ciascuno specifico argomento. Ogni anno, a conclusione della sua attività, ogni circolo di qualità predispose un documento di programmazione settoriale che costituisce un importante punto di riferimento per la formalizzazione nel PSN dell'attività statistica che dovrà essere sviluppata dal SISTAN nel triennio di riferimento del Programma. L'UdS dell'ISS è presente nel Circolo di Qualità "Sanità". Oltre ai suddetti adempimenti che sono fissi per ciascun anno vi è una serie di compiti che ogni anno debbono essere svolti e che si possono far rientrare in due grandi categorie:

- Elaborare e fornire al SISTAN i dati che all'ISS vengono richiesti nell'ambito di Progetti del PSN condotti da altre Istituzioni:, quali alcune rilevazioni a cura del MEF o del MIUR.
- Svolgere elaborazioni statistiche che rispondano a quesiti di sanità pubblica di Parlamento e/o Governo, da componenti del Servizio Sanitario (Regioni, Comuni, ASL) da Enti e istituzioni di Ricerca, da Università. Spesso le richieste poste da Governo e Parlamento necessitano di risposte con tempi brevissimi (anche in termini di poche ore) il che richiede una particolare prontezza di riorganizzazione immediata del lavoro già programmato. L'UdS gestisce la Convenzione-Accordo Quadro di collaborazione scientifica tra ISS e ISTAT e partecipa alle riunioni del Gruppo paritetico ISS-ISTAT prevista dall'accordo e organizza corsi di formazione sui *Package* statistici.

### **Attività programmata**

Nell'ambito degli adempimenti annuali previsti dal DL.vo 322/1989 verranno elaborati i seguenti documenti: i) una relazione dettagliata di risorse e attività dell'UdS; ii) lo stato di attuazione dei lavori ISS inseriti nel Programma Statistico Nazionale del triennio vigente. Personale dell'UdS parteciperà ai lavori del Circolo di Qualità "Sanità" contribuendo alla predisposizione del PSN, vagliando la riconferma dei lavori già presentati e valutando se e quali inserirne *ex novo*, seguendo i criteri stabiliti dal Comitato di indirizzo e coordinamento della informazione statistica (COMSTAT). Per i lavori inseriti nel PSN, verranno preparate, con i responsabili, dettagliate relazioni, comprendenti parti apposite per la trattazione dei dati personali (DL.vo 196/2003) da fornire al SISTAN in via cartacea/telematica. L'UdS parteciperà annualmente, raccogliendo, vagliando e fornendo dati su varie caratteristiche dell'ISS (attività, personale, finanziamenti), a più indagini SISTAN, condotte ad esempio da MEF e MIUR. L'UdS svolgerà attività d'analisi di dati d'interesse in sanità pubblica su

richiesta del Parlamento e/o Governo, di componenti del Servizio Sanitario (Regioni, Comuni, ASL) di Enti e Istituzioni di Ricerca, di Università, anche con risposte in tempi brevissimi. Verranno svolte attività relative alla gestione della Convenzione Accordo Quadro in materia statistica tra ISTAT e ISS e si terranno corsi di formazione.

### **Valutazione degli esiti di interventi sanitari**

Nell'ambito del Progetto "Mattoni SSN", il mattone "Misura dell'Outcome" ha prodotto un documento conclusivo del progetto nel quale sono contenute procedure e metodi di misura sistematica dell'outcome di servizi sanitari, interventi, prestazioni, patologie a livello di popolazione e di strutture, risultati per ricoveri ospedalieri relativi agli anni 2001-2003 e alcune raccomandazioni relative alla produzione e uso degli indicatori di esito. Nel 2008, altri due progetti "Valutazione degli esiti per promuovere il miglioramento dell'efficacia nell'erogazione delle prestazioni ricomprese nei LEA" e "Sviluppo e produzione degli indicatori di esito per SIVEAS", riuniti con l'unica denominazione di programma PROGRESSI, sono stati commissionati dal Ministero del Lavoro della Salute e delle Politiche sociali con la finalità di proseguire i lavori del progetto Mattoni "Misura dell'Outcome" producendo risultati per i ricoveri ospedalieri dall'anno 2004 e successivi e sviluppando ulteriormente la metodologia per la produzione di stime di esito e gli strumenti necessari per la valutazione dell'outcome. Lo studio dei singoli indicatori, ha permesso di esprimere un giudizio in merito alla loro fattibilità e implementabilità su base routinaria. Sono state acquisite le basi di dati SDO nazionali che hanno consentito di produrre 20 indicatori di esito per struttura e per ASL di residenza relativamente ai ricoveri ospedalieri dall'anno 2004. Questi indicatori hanno riguardato diverse aree di patologie e/o trattamenti, e sono stati suddivisi nelle seguenti categorie: indicatori di assistenza distrettuale (ricoveri prevenibili), indicatori di assistenza ospedaliera, indicatori di risultato e indicatori di prevenzione primaria. Quanto prodotto nel Progetto BPAC è servito a lanciare una nuova attività per la valutazione di esiti in cardiocirurgia (Mattone – Outcome BYPASS) e altre attività per la valutazione degli esiti relativi al trattamento delle sindromi coronariche acute (IN-ACS Outcome), alle procedure di angioplastica (OSCAR) e di *stenting* carotideo (RISC). La valutazione degli esiti di trattamenti sanitari comprende, tra le varie attività di valutazione e confronto, anche la valutazione di efficacia di tecnologie sanitarie introdotte nel SSN in assenza di valide prove scientifiche sperimentali di efficacia (vedi art. 1 comma 8 DL 229/99). In quest'ambito nel corso del 2009, l'attenzione si è focalizzata verso un argomento attuale e dibattuto quale la valutazione di appropriatezza, efficienza ed efficacia dell'impianto percutaneo o transapicale di una bioprotesi valvolare (TAVI) rispetto alla procedura chirurgica di sostituzione valvolare aortica (AVR) nel trattamento della Stenosi Aortica (studio OBSERVANT).

#### **Attività programmata**

Acquisizione db SDO nazionale 2011-2013. Produzione sistematica di 20 indicatori di esito per struttura e ASL di residenza per i ricoveri ospedalieri anno 2008 e successivi. Conclusione della raccolta dati dello studio OBSERVANT; analisi dati; stesura del rapporto finale e di articoli scientifici. Avvio delle attività del progetto "*TAVI versus traditional approaches in treatment of severe and symptomatic aortic stenosis patients*"; reclutamento centri e definizione della metodologia; raccolta dati; analisi dati *ad interim* e finale; produzione di documentazione scientifica. Valutazioni di tipo costo/efficacia utilizzando i dati dello studio OBSERVANT. Avvio del progetto "*Quality of life, cognitive abilities and costs of transcatheter aortic valve implantation and surgical aortic valve replacement*" (coord: E. Romagna), *spin-off* dello studio OBSERVANT, per la valutazione della qualità

della vita dei pazienti trattati. Costituzione di una rete europea di registri TAVI/AVR per la costruzione di una funzione di rischio e criteri di indirizzo su cui basare le scelte terapeutiche. Avvio di uno studio di fattibilità per valutazioni comparative di efficacia di trattamenti per nuove tecniche di intervento sulla valvola mitrale e il trattamento del Forame Ovale Pervio (FOP).

### **Valutazione del rischio cardiovascolare globale assoluto**

La ricerca epidemiologica sulle malattie cardiovascolari, che si è sviluppata nella seconda metà del secolo scorso, ha permesso di valutare le differenze nella frequenza delle malattie nei diversi Paesi, di identificare i fattori responsabili della alta frequenza di queste patologie (fattori di rischio epidemiogeni), di dimostrare che la riduzione di tali fattori produce una riduzione di queste malattie (reversibilità del rischio). Così, parallelamente, al crescere delle possibilità di trattamento medico e chirurgico delle malattie cardiovascolari, si è venuta affermando la consapevolezza dell'importanza di interventi di tipo preventivo, atti ad impedire o ritardare l'insorgenza della malattia stessa. Nel 1998 è stato costruito in questo istituto un database dei fattori di rischio cardiovascolare di alcuni studi longitudinali iniziati alla metà degli anni '80 e realizzato il follow-up della mortalità e morbosità cardiovascolare per stimare il rischio cardiocerebrovascolare globale assoluto nella popolazione italiana (progetto CUORE). Questa iniziativa ha permesso di costruire la funzione di rischio per la predizione degli eventi nella popolazione italiana e di costruire due strumenti: la carta e il punteggio individuale per la valutazione del rischio cardiocerebrovascolare, largamente applicati in salute pubblica (il software per il punteggio individuale e le carte del rischio sono scaricabili gratuitamente dal sito [www.cuore.iss.it](http://www.cuore.iss.it)). Si utilizzano per valutare nei successivi dieci anni la probabilità di andare incontro ad un evento acuto coronarico o cerebrovascolare conoscendo il livello di alcuni fattori di rischio (età, sesso, abitudine al fumo, diabete, pressione arteriosa sistolica e colesterolemia totale e HDL). Fattori di rischio come la colesterolemia, la pressione arteriosa e il fumo, sono largamente influenzati dallo stile di vita e quindi potenzialmente modificabili, in casi estremi anche con farmaci efficaci.

Questi strumenti sono stati messi a disposizione degli MMG, degli specialisti, dei centri di medicina preventiva, delle sezioni dei trasfuzionisti, dei donatori di sangue e dei farmacisti per una più appropriata azione di medicina preventiva con l'obiettivo di implementare l'uso e l'applicazione delle carte e del punteggio di rischio cardiovascolare in gruppi di popolazione italiana e supportare le attività di prevenzione cardiovascolare a vari livelli dell'SSN.

#### **Attività programmata**

Le funzioni di rischio risentono di tre elementi: la distribuzione dei fattori di rischio, il peso eziologico dei singoli fattori e la sopravvivenza della popolazione senza la malattia; la prima e l'ultima caratteristica variano nel tempo, pertanto, è fondamentale aggiornare le funzioni di rischio, attraverso l'arruolamento di nuove coorti e la prosecuzione del follow-up di quelle già arruolate. La distribuzione di queste coorti nell'intero territorio nazionale è garanzia anche della applicazione degli strumenti predittivi rispettando le caratteristiche che differenziano regione e regione. L'aggiornamento e l'aggiunta di nuovi fattori può migliorare la predizione con le conseguenti azioni di prevenzione. Le nuove coorti dell'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare 1998-2002 e dell'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare/*Health Examination Survey* in corso di arruolamento verranno inserite nel database degli studi longitudinali del progetto CUORE. È previsto il follow-up delle coorti per la valutazione dello stato in vita e la raccolta e validazione degli eventi cardiovascolari. Sarà possibile creare nuove funzioni di rischio con l'inclusioni di

nuovi fattori di rischio, quali la familiarità, la glicemia, la creatininemia, l'indice di massa corporea. In questo modo sarà possibile inserire nel punteggio individuale nuovi fattori di rischio e aggiornare gli strumenti per una valutazione del rischio cardiovascolare a dieci anni più precisa.

### **Valutazione dell'uso dei farmaci e delle dinamiche prescrittive nella popolazione generale**

Lo studio dell'uso dei farmaci nella popolazione ha lo scopo di acquisire conoscenze relative al profilo beneficio-rischio dei farmaci e di generare informazioni che possono essere utilizzate come base di riferimento per i processi decisionali in sanità pubblica. Inoltre la conoscenza dei volumi, dei contenuti e delle dinamiche della prescrizione farmaceutica è la condizione necessaria per inquadrare in un contesto razionale la politica del farmaco anche sotto il profilo della valutazione della spesa sanitaria pubblica. Di non poco rilievo è infine anche l'aspetto della identificazione di possibili aree di inappropriata d'uso.

Dopo l'immissione in commercio, un farmaco è soggetto a un uso allargato sia in termini quantitativi che qualitativi. Per questo è importante continuare, attraverso studi post-marketing, la valutazione del profilo beneficio-rischio dei farmaci nella pratica clinica corrente nella quale i pazienti trattati rappresentano la popolazione realmente esposta e le condizioni di utilizzo sono quelle aderenti alla realtà prescrittiva. Questa valutazione si esplica attraverso:

- conduzione di studi descrittivi sull'uso dei farmaci;
- sviluppo di modelli previsionali sull'andamento dei consumi e della spesa farmaceutica;
- conduzione di studi epidemiologici osservazionali e sperimentali;
- predisposizione di reti di sorveglianza attiva degli eventi avversi.

Il coinvolgimento attivo delle Regioni attraverso attività collaborative nell'ambito della formazione, della farmacovigilanza, della farmaco utilizzazione e dell'applicazione di modelli innovativi di strategie assistenziali.

#### **Attività programmata**

- Datawarehouse  
Predisposizione di fonti di dati certificate integrabili con altri flussi informativi (es. SDO) armonizzate in un unico *Datawarehouse*.  
Report annuali per:
  - descrivere il consumo dei farmaci in ambito ospedaliero e territoriale;
  - stimare l'impatto sui livelli di prescrizione delle modifiche organizzative di erogazione dei farmaci;
  - valutare l'effetto dell'introduzione di nuove molecole e degli interventi nazionali sulla prescrittibilità;
  - descrivere l'uso dei farmaci in alcune specifiche sottopopolazioni (es. bambini, anziani, ecc.);
  - analizzare l'appropriatezza per specifiche categorie terapeutiche.
- Studi epidemiologici eziologici  
Altre attività di ricerca riguardano la conduzione di studi su problemi di sanità pubblica, identificati congiuntamente dall'AIFA e dall'ISS.

### **World Health Organization Collaborating Centre for Research and Health Promotion on Alcohol and Alcohol-related Problems**

A seguito delle consultazioni ufficiali con il Governo italiano, la WHO ha designato nel 2001 l'ISS quale sede del *Collaborating Centre for Research and Health Promotion on Alcohol and Alcohol-related Problems* (WHO CC).

Il Centro WHO, organo di consulenza tecnico-scientifica internazionale della WHO di Copenaghen e di Ginevra, è dal 2005 il *Focal Point* nazionale per l'attuazione della *Framework on Alcohol Policy for the European Region*. Le attività salienti del Centro possono essere sommariamente identificabili nella: i) produzione delle evidenze scientifiche e nella definizione e disseminazione delle linee guida cliniche per l'integrazione delle attività preventive specifiche nei setting socio-sanitari per la riduzione del rischio alcol-correlato (dettagli alle pagine web: <http://www.who-alcohol-phaseiv.net/italy.htm>, <http://www.phepa.net/units/phepa/html/en/dir360/doc8870.html>, [www.who.int/substance\\_abuse/publications/en/italy.pdf](http://www.who.int/substance_abuse/publications/en/italy.pdf)); ii) il monitoraggio per indicatori garantita attraverso l'attiva rete di collaborazioni che assicurano l'expertise richiesto per l'assessment e l'aggiornamento periodico e continuo delle basi di dati informativi nazionali previste dal Sistema Europeo Informativo sull'Alcol (EIAS) della WHO (*Alcohol Control Database*; <http://data.euro.who.int/alcohol/Default.aspx?TabID=2421>).

Il WHO CC ha la sua articolazione nazionale nell'Osservatorio Nazionale Alcol - CNESPS.

Il Centro WHO CC (<http://www.iss.it/chis/coms/cont.php?id=115&lang=1&tipo=19>) *focal point* nazionale, europeo e internazionale sulle tematiche alcolcorrelate, epidemiologiche e di salute pubblica, continuerà a svolgere attività di prevenzione e promozione della salute. Il Comitato Scientifico permanente del CCM (Ministero della Salute) dal 2006 ha riconosciuto all'ONA il ruolo di assistenza tecnica nella realizzazione del Piano Nazionale Alcol e Salute e della Relazione al Parlamento (L. 125/2001) strettamente connessi alle strategie WHO.

#### **Attività programmata**

Le attività saranno svolte con il personale e le risorse dell'ONA e del Reparto Salute della popolazione (CNESPS) in collaborazione con la SIA e il CAR della Toscana secondo il piano di lavoro concordato che prevede: la consulenza e assistenza di un esperto all'Ufficio regionale WHO, la partecipazione alle ricerche e alla implementazione di progetti connessi all'*European Alcohol Information System*, il rafforzamento delle attività nazionali per l'identificazione precoce dell'uso dannoso di alcol, della sensibilizzazione e della riduzione del danno alcol correlato nella popolazione generale.

Verranno inoltre realizzate attività per lo sviluppo di iniziative e protocolli di studio finalizzati a:

- attività epidemiologiche, di prevenzione e di monitoraggio per indicatori a livello nazionale, regionale, europeo e internazionale (*Alcohol Control Database*, *Global Alcohol Survey and status Report* e *European Community Health Indicators for Monitoring*);
- campagne di informazione/sensibilizzazione, identificazione di strategie di diagnosi precoce e di intervento breve per la riduzione del rischio e del danno alcolcorrelato in collaborazione e con la rete internazionale INEBRIA, di cui l'ONA è membro e nell'ambito di progetti internazionali (PRISMA, PHEPA, IPIB, AMPHORA, ODHIN, ALICE RAP, EWA);
- produzione dati per i *Country Report* nazionali (*Global Survey on Alcohol* –WHO, Ginevra).

**Centro nazionale  
Malattie rare**

---

**Attività di ricerca**



## **Espressione e ruolo funzionale della disbindina nella retina**

La disbindina, il prodotto del gene DTNBP1, uno dei più promettenti geni di suscettibilità alla schizofrenia, è stata identificata nel 2001 attraverso uno screening di doppio ibrido nel lievito come un partner di interazione della distrobrevina, un componente citosolico del complesso di proteine associate alla distrofina. La disbindina fa parte del complesso macromolecolare BLOC-1 (*Biogenesis of Lysosome related Organelles Complex-1*) ed è coinvolta nei meccanismi di *trafficking* intracellulare e nella biogenesi di organelli e vescicole. Una mutazione del gene DTNBP1 è stata identificata in una paziente affetta da una malattia rara, la sindrome di Hermanski-Pudlak di tipo 7, caratterizzata da oculoalbinismo e deficit nella coagulazione. La disbindina è una proteina ubiquitaria che nel cervello è stata all'inizio considerata essere espressa esclusivamente a livello neuronale. Recentemente alcuni lavori, ivi inclusi nostri risultati preliminari, ne hanno messo in evidenza la presenza anche a livello delle cellule gliali. Queste osservazioni aprono potenzialmente una nuova strada nella comprensione del ruolo funzionale di questa proteina. Con questo progetto ci si propone di caratterizzare il ruolo funzionale della disbindina a livello delle cellule gliali utilizzando, nel modello sperimentale della retina, un approccio biochimico-molecolare e di immunofluorescenza.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto si propone, in una prima fase, di studiare nel ratto l'espressione della disbindina nel corso della maturazione postnatale della retina, allo scopo di identificare il coinvolgimento delle diverse isoforme della proteina il cui ruolo funzionale non è ancora stato definito. Parallelamente, attraverso immunofluorescenza su criosezioni di retina, saranno condotti esperimenti volti a identificare le componenti cellulari in cui la disbindina è espressa. La retina, per la combinazione tra complessità fisiologica e struttura relativamente semplice, costituisce un buon sistema per la comprensione del modo con cui i circuiti cerebrali più complessi elaborano l'informazione. In una fase successiva del progetto, il ruolo funzionale della disbindina sarà studiato in linee cellulari e colture primarie gliali attraverso esperimenti di trasfezione che inducano overespressione o silencing della proteina. Esperimenti saranno condotti anche su animali modello per la sindrome di Hermanski-Pudlak, quali il topo *sandy* che manca di disbindina. Considerato il ruolo emergente della disbindina nei meccanismi alla base della trasmissione sinaptica, a livello sia pre- che post-sinaptico, l'espressione della disbindina sarà inoltre analizzata in animali modello (topi *reelin*, *MeCP2-308*) per patologie rare con coinvolgimento neuronale e/o disordini neuropsichiatrici.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati conseguiti saranno inviati per la pubblicazione a riviste internazionali e serviranno a colmare una mancanza di informazione specifica sul ruolo funzionale della disbindina nei meccanismi patofisiologici della retina. Più in generale, i risultati ottenuti forniranno informazioni utili a meglio definire il ruolo funzionale della disbindina, una proteina implicata in patologie quali la sindrome di Hermanski-Pudlak, la distrofia muscolare di Duchenne, la schizofrenia e altri disordini neuropsichiatrici e, più in generale, nella patofisiologia dei meccanismi sinaptici, suggerendo potenzialmente nuove strategie terapeutiche.

## **Implicazioni cliniche e molecolari nella patologia di Hailey-Hailey il ruolo dei Microna**

La patologia di Hailey-Hailey (*Hailey-Hailey Disease*, HHD) anche chiamata, pemfigo benigno familiare cronico. Le lesioni cutanee compaiono durante l'adolescenza o, con

maggior incidenza, all'età di 30-40 anni e hanno carattere recidivo e ricorrente. Questa patologia ha un carattere ereditario e si trasmette come carattere autosomico dominante a penetranza incompleta. La malattia è dovuta a mutazioni del gene ATP2C1, una pompa del calcio, che interferiscono con il processo di adesione dei cheratinociti dell'epidermide. Non è attualmente disponibile una terapia specifica, e i trattamenti hanno lo scopo di alleviare i sintomi prevenendo infezioni batteriche, micotiche e virali. Così una migliore comprensione della funzione svolta dal gene ATP2C1 nell'epidermide è un passo molto importante per guidare e promuovere strategie terapeutiche per il trattamento di questa patologia. Nei nostri studi preliminari, in cui abbiamo utilizzato cheratinociti derivati da biopsie effettuate su pazienti con HHD, abbiamo messo in evidenza come un accumulo di ROS, sia in relazione con la manifestazione della sintomatologia di questa patologia.

#### **Risultati attesi nel triennio**

La malattia di Hailey-Hailey è una rara patologia dermatologica a trasmissione ereditaria, con modalità autosomica dominante, causata da un difetto di coesione delle cellule sovrabasali dell'epidermide. Il difetto genico alla base della patologia è stato identificato nel gene ATP2C1, coinvolto nei meccanismi di regolazione del trasporto del calcio all'interno della cellula. I risultati attesi possono essere riassunti come segue:

- Analisi in colture primarie di cheratinociti ottenuti da pazienti, della ridotta capacità proliferativa e di differenziamento rispetto a cheratinociti ottenuti da soggetti sani.
- Correlazione della aumentata produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) in cheratinociti sottoposti a stress ossidativo.
- Verificare che lo squilibrio del sistema ossidante-antiossidante del cheratinocita può avere un ruolo fondamentale nella patogenesi della patologia di Hailey-Hailey.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Recenti studi hanno dimostrato che i livelli dei microRna nel siero possono servire come biomarcatori per evidenziare la presenza di malattie fra cui diversi tipi di cancro. L'analisi di microRna effettuata su siero di pazienti rappresenta una prospettiva di indagine non invasiva per determinare la progressione e/o lo stato di una patologia aprendo grandi speranze nella comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nelle patologie rare e nuovi orizzonti per la sperimentazione clinica e la messa a punto di nuovi farmaci. Pertanto i risultati, una volta validati e confermati, potrebbero consentire la messa a punto di biomarcatori anche per la patologia di Hailey-Hailey.

#### ***Mechanisms of neuronal death in NIEMANN-PICK C Disease: from molecules to clinic***

La malattia di Niemann Pick di tipo C (NPCD) è una malattia fatale giovanile neurodegenerativa caratterizzata da prematura morte neuronale e alterato metabolismo del colesterolo. Gli obiettivi principali del progetto sono i seguenti:

- analizzare: il coinvolgimento dei meccanismi eccito tossici nella neurodegenerazione valutando la vitalità cellulare e l'influsso di ioni calcio in colture di neuroni da topi NPC1<sup>-/-</sup> in condizioni di controllo e dopo l'applicazione di aminoacidi eccitatori; la suscettibilità dei neuroni all'eccitotossicità in fettine cerebrali di topi NPC1<sup>-/-</sup> in condizioni di anossia/aglicemia;
- analizzare: il contributo dello stress ossidativo nella induzione di processi neurodegenerativi attraverso la valutazione dello stato redox intracellulare e la suscettibilità all'apoptosi indotta da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nei modelli neuronali della malattia; il coinvolgimento della NADPH ossidasi non-fagocitica nella produzione di ROS;

- determinare se i meccanismi di riparazione del danno DNA possano essere ridotti nei neuroni NPCD, rilevando i marcatori del danno in neuroni di colture primarie di differenti regioni del cervello di topi NPC1<sup>-/-</sup> e nei neuroni dopo silenziamento del gene NPC1. Inoltre valuteremo sia i meccanismi coinvolti nell'effetto terapeutico del *miglustat*, unica terapia efficace nel migliorare i sintomi del paziente, che quello di composti antiossidanti sulla eccitotossicità e sull'accumulo di GLSs.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Fino ad ora il ruolo giocato dalla eccitotossicità nella neurodegenerazione nella NPCD non è stato investigato. Il progetto può far luce sul coinvolgimento dei recettori del glutammato che possono avere parte attiva nella neurodegenerazione stessa. Inoltre, mentre è riportato in letteratura un danno da stress ossidativo nei fibroblasti, nei neuroni non è stato ancora caratterizzato, come è da verificare anche il ruolo della lipoproteina ossidata a bassa intensità (oxLDL) e del suo recettore LOX-1 nella perdita neuronale. Dal momento che questo complesso induce apoptosi e necrosi in molte linee cellulari riteniamo che possa avere anche un ruolo nella morte neuronale.

Nuova luce potrà anche essere data al ruolo di un danno dei meccanismi di riparo del DNA che è coinvolto nelle malattie neurodegenerative ma non è mai stato studiato in NPCD.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto fornirà utili informazioni per proporre un nuovo approccio terapeutico alla malattia di Niemann-Pick C, valutando nel modello animale gli effetti: i) del trattamento con resveratrolo, un polifenolo che interferisce con i recettori del glutammato ed è riportato ridurre la neurodegenerazione dell'ippocampo in modelli di malattia di Alzheimer e di taupatie; ii) del trattamento con un antagonista molecolare del recettore LOX-1. Riteniamo che i nostri risultati contribuiranno a chiarire i meccanismi attraverso i quali il *miglustat*, l'unico agente terapeutico approvato per il trattamento di questa malattia, porti beneficio a questi pazienti.

### **Osteocondromi multipli: impiego dei microRna come nuovi marcatori diagnostici/prognostici nell'ottimizzazione del trattamento del paziente**

La patologia degli Osteocondromi Multipli (MO) ereditari è caratterizzata dalla formazione di escrescenze ossee localizzate a livello delle ossa lunghe. Sebbene tale malattia sia correlata a mutazioni a carico di EXT1/EXT2 (geni coinvolti nella polimerizzazione delle catene glucidiche dei proteoglicani eparan-solfati, HS-PGs), il meccanismo patogenetico responsabile della formazione degli osteocondromi (OC) risulta ad oggi poco chiaro. L'attuale teoria, basata sulla necessità di un secondo hit mutazionale somatico a carico dei geni EXT, non risulta essere sufficiente a spiegare lo sviluppo degli OC nella maggior parte dei casi, lasciando aperta la strada a meccanismi alternativi che ci proponiamo di valutare nel corso del progetto. Le conoscenze disponibili non consentono inoltre di chiarire alcuni importanti aspetti tra cui l'assenza di mutazioni a carico dei geni EXT nel 10% dei pazienti, la forte variabilità clinica tra pazienti che presentano lo stesso tipo di mutazione e i fattori che determinano in circa il 5% dei pazienti la trasformazione maligna di un OC in condrosarcoma periferico.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il chiarimento di questi aspetti servirà per progettare schemi di follow-up adeguati e personalizzati identificando potenziali marcatori diagnostici/prognostici in grado di affiancare/sostituire le tradizionali analisi genetiche e radiologiche effettuate sui pazienti. Altro aspetto fondamentale del progetto risiede nell'identificare bersagli per possibili terapie,

attualmente limitate alla chirurgia correttiva. A tal fine proponiamo studi paralleli in cui verranno integrate competenze diverse volte a valutare i seguenti aspetti:

- valutare la presenza di bio-marcatori diagnostici/prognostici volti a migliorare l'assistenza e il follow-up dei pazienti;
- chiarire i meccanismi di trasformazione maligna e di variabilità clinica valutando il ruolo dei miRNA e l'eventuale coinvolgimento di “nuovi” geni allo scopo di trovare nuovi bersagli terapeutici;
- chiarire gli effetti biologici delle mutazioni a carico di EXT1/2 valutandone l'effetto qualitativo/strutturale a livello delle catene glucidiche degli HS.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati prodotti potrebbero avere le seguenti ricadute sull'SSN:

- Comprensione degli aspetti molecolari e genetici delle cause che portano all'insorgenza degli MO.
- Identificazione di un target farmacologico utile nel trattamento degli MO.
- Definizione di un miglior sistema di classificazione attraverso la correlazione fra mutazioni nei geni EXT1/EXT2, e fenotipo associato.
- Definizione di protocollo diagnostico per il trattamento di pazienti affetti.

#### **Role of protein misfolding in the pathogenesis of Niemann-Pick type C disease: a possible therapeutic target**

L'obiettivo generale del progetto è quello di valutare se il *protein misfolding* contribuisce alla patogenesi della malattia di Niemann-Pick di tipo C (NPCD), e se i regolatori intracellulari dell'omeostasi delle proteine possano rappresentare un bersaglio terapeutico per la NPCD.

Gli obiettivi principali del progetto sono:

- analizzare la stabilità, la degradazione e il *trafficking* al lisosoma delle proteine mutanti NPC1 nei fibroblasti in coltura da pazienti portatori di diverse mutazioni missense NPC1;
- analizzare l'effetto degli inibitori del proteasoma e agenti che inducono chaperon molecolari intracellulari sulla stabilità e il traffico di NPC1 in fibroblasti NPC1;
- studiare se l'aumento della stabilità della proteina NPC1 e il miglioramento del suo *trafficking* al lisosoma portano ad una correzione del fenotipo patologico in fibroblasti NPC1;
- sviluppare e caratterizzare un modello neuronale della NPCD inducendo il differenziamento neuronale di cellule staminali isolate da biopsie cutanee o fibroblasti in coltura ottenuti da pazienti NPC che presentino diverse mutazioni NPC1;
- studiare se l'aumento della stabilità della proteina NPC1 e il miglioramento del suo *trafficking* al lisosoma portano ad una correzione del fenotipo patologico nel modello neuronale della NPCD.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Non sono ancora stati esplorati il ruolo del *misfolding* sulla malattia NPC e i possibili benefici sul fenotipo NPC di agenti che migliorano la stabilità delle proteine NPC e il *trafficking*. L'eventuale uso di piccole molecole che migliorano la stabilità della proteina e sono in grado di attraversare la barriera emato-encefalica è una opzione molto interessante per questa malattia neurodegenerativa letale, dato che la proteina NPC1 non è utilizzabile per le terapie di trasduzione, e neanche la sostituzione o la riparazione del gene NPC1.

Anche se la degenerazione neuronale è la caratteristica principale nei pazienti NPC, lo studio delle vie molecolari che collegano l'accumulo lipidico e la neurodegenerazione è stato ostacolato dalle limitazioni dei modelli attualmente disponibili.

Questo progetto si propone di sviluppare un modello neuronale della malattia NPC utilizzando un metodo molto innovativo, basato sull'induzione di differenziazione neuronale di cellule staminali isolate da biopsie cutanee o fibroblasti in coltura ottenuti da pazienti con diverse mutazioni NPC1.

Ciò consentirebbe di selezionare la via molecolare che porta alla neurodegenerazione nei pazienti NPC, e superare alcuni limiti dei modelli disponibili.

Infatti, questo modello sarà utile per valutare l'impatto di diverse mutazioni sul fenotipo patologico e potrebbe rappresentare un potente strumento per effettuare screening di farmaci su cellule di pazienti NPC che presentino diversi genotipi.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi delle malattie rare rappresenta un passo fondamentale per migliorare la conoscenza sulla loro epidemiologia, sulle manifestazioni cliniche e sulle procedure diagnostiche, permettendo di sviluppare strategie terapeutiche. L'esperienza su altre malattie rare dimostra che la disponibilità di una terapia specifica aumenta fortemente la consapevolezza di una specifica malattia tra la comunità clinica.

Così, nel prossimo futuro come conseguenza di una migliore comprensione delle basi molecolari della malattia e lo sviluppo di terapie specifiche potremmo osservare:

- un complessivo miglioramento della pratica clinica e delle procedure di consulenza che coinvolgerà molti specialisti differenti in un approccio multidisciplinare ai pazienti e alle loro famiglie;
- uno sviluppo delle reti nazionali e internazionali di ricercatori di base e clinici;
- il miglioramento delle capacità diagnostiche cliniche e biochimiche.

#### **Ruolo dei MicroRNA nello studio dei tumori pediatrici del fegato**

L'epatoblastoma (HB) e l'epatocarcinoma (HCC) sono due diversi tumori primari derivanti da cellule parenchimali. Mentre l'HB è un raro tumore dell'età pediatrica la cui incidenza è stimata intorno a 0,5-1,5 casi per milione in individui di età inferiore ai 15 anni, l'HCC rappresenta un tipo tumorale molto diffuso negli adulti. HB e HCC sono accomunati da un'insorgenza spesso associata a specifiche condizioni multi-fattoriali e dalla presenza di comuni alterazioni genetiche. Da un punto di vista genetico, sono note aberrazioni su cromosomi 1q, 2q, 7q, 8, 17q and 20; inoltre, sono state identificate mutazioni (delezioni e/o puntiformi) in corrispondenza dell'esone 3 del gene CTNNB1 che codifica per la  $\beta$ -catenina, causa di attivazione costitutiva del *pathway* da essa controllato. Infine, sia in HB che in HCC è stato riportato un aumento del livello di espressione del gene IGF2. I microRNA (miR), sono delle piccole molecole di RNA (~21-27 nt) coinvolti in diversi processi cellulari e patogenetici fra i quali sviluppo e differenziamento, risposta immunitaria e carcinogenesi. Sebbene diverse evidenze scientifiche indichino l'importante contributo di alcuni miR (miR-145, miR-199a, miR-21, miR-34a, miR-221/222 e miR-224) nell'HCC, nel caso dell'HB ad oggi ci sono poche informazioni.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il numero limitato di campioni da analizzare rappresenta spesso il fattore limitante negli studi condotti sui tumori rari; lo studio dei microRNA ha consentito tuttavia di aggirare questo problema contribuendo alla classificazione di diversi tumori nonché alla comprensione dei meccanismi molecolari ad essi sottesi. Attraverso l'analisi di espressione

di specifici microRNAs, identificati nel corso di studi da noi precedentemente condotti, de-regolati in pazienti di HB, intendiamo: i) analizzare e caratterizzare i *pathway* molecolari (Wnt/b-catenina e IGF2) implicati nella patogenesi dell'HB e comuni ad altri tumori rari caratterizzati da condizioni multi-fattoriali; ii) caratterizzare alcuni marcatori precoci per la diagnosi e la prognosi dell'HB. In particolare scopo del nostro progetto è convalidare i nostri precedenti studi secondo da cui è emerso che alcuni microRNAs si comportano in HB in maniera del tutto peculiare rispetto a HCC; infatti, mentre i miR-214, miR-199a, miR-150 e miR-125a sono up-regolati in HB risultano down-regolati in HCC. Al contrario il miR-148a è down-regolato in HB e up-regolato in HCC.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questo studio ha come scopo il miglioramento della comprensione dei *pathway* molecolari coinvolti in induzione e progressione dell'HB: pertanto il nostro obiettivo prioritario è rappresentato dalla caratterizzazione di possibili marcatori molecolari precoci di diagnosi e/o prognosi.

L'approccio adottato in questo studio potrà essere esteso anche ad altri tumori rari o MR caratterizzati da meccanismi di induzione e progressione analoghi a quelli osservati nell'HB e nell'HCC che sono oggetto dei nostri studi.

In particolare, l'analisi della regolazione dell'espressione genica attraverso specifici micro-RNA coinvolti nell'HB e già identificati nel nostro laboratorio consentirà di individuare marcatori precoci e specifici in grado di classificare tumori pediatrici e discriminare tra HB e HCC.

### **Ruolo del MicroRNA 140 nelle schisi oro-facciali**

Le schisi labiali e del palato sono malformazioni congenite dello sviluppo della regione mediana del palato primitivo e del palato secondario. Recentemente, in un modello animale è stato dimostrato il coinvolgimento del microRNA 140 nello sviluppo di alcune strutture craniofacciali mediante la regolazione dell'espressione del gene PDGFRA. Il lavoro di ricerca condotto nel reparto è scaturito dall'ipotesi che il microRNA 140 possa essere, anche nell'uomo, coinvolto nello sviluppo dei processi labiopalatini attraverso la regolazione dell'espressione del PDGFRA.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Risultati attesi nel triennio sono:

- la presenza di varianti polimorfiche nella sequenza codificante il microRNA 140. Lo studio è stato effettuato mediante sequenziamento diretto e restrizione enzimatica su una casistica di 105 pazienti affetti da palatoschisi e 130 individui di controllo. I risultati hanno mostrato la presenza di un polimorfismo, per il quale non erano disponibili informazioni di frequenza nella popolazione;
- una differenza significativa della frequenza della variante allelica analizzata nelle due casistiche;
- tale variante è localizzata in un punto di giunzione cruciale per la corretta espressione del microRNA;
- risultati preliminari ottenuti attraverso saggi *in vitro* confermano le ipotesi bioinformatiche che postulavano una differente stabilità della variante polimorfica osservata nei pazienti. Infatti, in costrutti recanti la variante allelica si osserva un difetto nella maturazione del microRNA.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'identificazione di nuovi marcatori in grado di correlare microRNA e specifiche patologie rare rappresenta la finalità principale del progetto. In particolare la comprensione

dei meccanismi molecolari regolati dai microRNA ci consentirà di mettere a punto strumenti per migliorare prognosi e diagnosi. Le conoscenze acquisite potranno essere di aiuto nella definizione dei percorsi clinici e di prevenzione.

La ricerca sperimentale proposta ha delle potenziali ricadute di grande impatto sanitario, per la sua capacità di accelerare e migliorare l'accuratezza della diagnosi, nonché di sinergizzare le informazioni provenienti da diverse aree (clinica, ricerca e sanità pubblica), al fine di traslare le conoscenze sperimentali alla pratica clinica.

### **Ruolo di SHOC2 nella proliferazione e nel differenziamento delle cellule neuronali**

SHOC2 è una proteina adattatrice coinvolta nella regolazione della via di trasduzione del segnale RAS-MAPK. Recentemente è stato dimostrato che questo gene, quando mutato, causa una forma peculiare di sindrome di Noonan associata con *loose anagen hair* (NS/LAH). La mutazione patogenetica (Ser2Gly) porta alla formazione di un sito di miristilazione provocando un'alterata localizzazione intracellulare della proteina, e una iperattivazione della via RAS-MAPK, sebbene non possa essere escluso il coinvolgimento di altre vie di segnalazione intracellulare. I pazienti affetti da questa condizione sindromica mostrano difetti dello sviluppo neurologico (ritardo mentale, comportamento iperattivo, deficit di apprendimento), suggerendo un ruolo specifico di SHOC2 nella fisiologia neuronale. La comprensione del ruolo di SHOC2 nella proliferazione e nel differenziamento dei progenitori neuronali può far luce sui meccanismi patogenetici alla base del fenotipo osservato nei pazienti con SN/LAH. A tale scopo, l'attività di ricerca sarà volta alla caratterizzazione morfologica e funzionale di progenitori neuronali esprimenti la forma mutata e *wild-type* di SHOC2. In particolare, i progenitori, derivanti sia da colture primarie da ippocampo embrionale di ratto, sia da linee tumorali, saranno analizzati a diversi stadi differenziativi, per identificare quali molecole coinvolte nella proliferazione, nel differenziamento o nella maturazione neuronale vengano attivate/inibite da SHOC2.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Gli studi permetteranno di comprendere i meccanismi molecolari attraverso cui SHOC2 controlla il flusso di informazione attraverso la via RAS-MAPK ed eventuali altre cascate di segnalazione intracellulare e come la disregolazione di tali vie influenzi la proliferazione, il differenziamento e la funzionalità neuronale.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati prodotti forniranno nuove informazioni sui possibili meccanismi molecolari e cellulari che sono alla base dei deficit cognitivi e comportamentali caratteristici dei pazienti affetti da SN/LAH, e indicheranno inoltre nuove strategie terapeutiche volte al miglioramento della qualità di vita dei suddetti individui.

### **Studio dell'effetto di sostanze antiossidanti sul *signalling* intracellulare del calcio in osteoblasti umani**

Scopo di questo progetto, in collaborazione con l'Università di Tor Vergata, è quello di valutare le alterazioni della concentrazione intracellulare di Ca<sup>2+</sup> e le correnti transmembrana tramite tecniche microfluorimetriche ed elettrofisiologiche (*patch-clamp*) in colture di cellule ossee ottenute da soggetti umani affetti da osteoporosi e osteoartrite, confrontandole con quelle ottenute da pazienti sani con fratture traumatiche. Lo studio si concentrerà su diversi obiettivi: i) stabilire tecniche per realizzare colture cellulari di osso; ii) verificare come l'induzione e la propagazione delle onde di Ca<sup>2+</sup> possono essere influenzate

dal rilascio di citochine in diverse condizioni patologiche dell'osso; iii) valutare i livelli di variazioni delle onde  $Ca^{2+}$  e le loro differenze nelle due situazioni patologiche esaminate nel nostro studio (osteoartrite e osteoporosi), rispetto al gruppo di controllo (giovani fratturati); iv) valutare i livelli delle variazioni delle onde di  $Ca^{2+}$  nelle stesse culture trattate con antiossidanti quali resveratrolo e quercitina.

**Risultati attesi nel triennio**

Finora non sono stati svolti studi sulla comunicazione intercellulare osteoblastica, monitorando le variazioni della concentrazione intracellulare e delle correnti transmembrana del calcio nelle patologie prese in esame. Il progetto consentirà di caratterizzare le alterazioni presenti nei tipi cellulari derivanti da pazienti affetti dalle due patologie, e permetterà di valutare l'effetto di sostanze antiossidanti sui flussi e sulle variazioni delle concentrazioni intracellulari di calcio.

**Trasferibilità dei risultati**

Il progetto consentirà di proporre nuovi approcci terapeutici nelle patologie in esame (osteoporosi e osteoartrite), tramite l'utilizzo di sostanze antiossidanti che possono modulare la comunicazione intercellulare osteoblastica.

**Centro nazionale  
Malattie rare**

---

**Attività di controllo, valutazione, parere**



## **Designazione di prodotti medicinali orfani all'EMA**

L'Agenzia europea di valutazione dei medicinali (EMA) esamina sin dal 2000, attraverso il suo Comitato per i medicinali orfani (COMP), le domande per la designazione di "orfano" di prodotti medicinali destinati a pazienti con malattie rare. Le domande sono inoltrate all'EMA dagli Sponsor (ricercatori, aziende, ecc.). L'Italia contribuisce a questa attività mediante il CNMR che partecipa alle riunioni mensili del COMP.

La designazione di medicinale orfano viene attribuita in conformità dei criteri di cui al Regolamento (CE) n. 141/2000. Può essere ottenuta a qualunque stadio dello sviluppo del prodotto, purchè venga presentata un'adeguata documentazione scientifica.

I medicinali orfani sono destinati alla diagnosi, profilassi o alla terapia di un'affezione che comporta una minaccia per la vita o seriamente debilitante e rara e che colpisce non più di cinque individui su 10.000 cittadini nell'UE. L'industria farmaceutica non sarebbe disposta a sviluppare detti medicinali alle normali condizioni di mercato in quanto, in mancanza di incentivi i costi della loro immissione sul mercato non sarebbero recuperati con le vendite previste. Nell'UE, il regolamento 141/2000 concede incentivi agli sponsor per lo sviluppo di un medicinale designato "orfano". Gli incentivi sono: esclusività di mercato per dieci anni; assistenza scientifica per l'elaborazione di protocolli; accesso alla procedura centralizzata; riduzione di quote di pagamento; accesso a ricerche scientifiche finanziate dall'UE.

La qualifica di medicinale orfano non costituisce un'approvazione dell'uso del medicinale per l'indicazione designata, in quanto non indica che il medicinale abbia dimostrato di soddisfare i requisiti di qualità, sicurezza ed efficacia necessari per la concessione dell'autorizzazione all'immissione in commercio.

Il COMP, oltre alla sua principale attività di designare i prodotti medicinali "orfani", svolge altre attività, quali cooperare con la CE, WHO, FDA e le Agenzie nazionali del Farmaco.

### **Attività programmata**

Il CNMR continuerà le seguenti attività scientifiche:

- Verranno approntate le tematiche inerenti lo sviluppo di un prodotto orfano (dagli studi preclinici alla sperimentazione), accesso alla terapia e sorveglianza post-marketing. In tale ambito sono previsti workshop e riunioni di lavoro, cui verranno invitati anche esperti del COMP-EMA, incluso il rappresentante italiano.
- Verrà ulteriormente promossa la ricerca nel settore delle malattie rare e farmaci orfani (in collaborazione con la CE: *DG-Research* e SANCO, *International Rare Diseases Research Consortium* (IRDiRC), e con le Agenzie nazionali che finanziano la ricerca e con le azioni sovra-nazionali quali ad esempio E-RARE).
- Verranno sviluppate azioni per incentivare la cooperazione internazionale con FDA e altre Agenzie.

## **OECD: quality and proficiency testing for molecular genetic testing**

L'OECD ha rilevato la necessità di effettuare un'analisi sulla performance dei laboratori che effettuano test genetici e negli anni scorsi ha avviato un progetto per la sorveglianza di diversi laboratori (di genetica, biochimica clinica, anatomia patologica, ecc.) che eseguono test di genetica molecolare in 18 Stati associati all'OECD. L'Italia, mediante dapprima il Reparto di Malattie Rare e poi il CNMR, ha avuto un ruolo attivo in tutte le fasi di questo progetto.

Lo scopo dell'attività è stato:

- raccogliere dati nei diversi Paesi sui controlli di qualità e sugli schemi di accreditamento in atto nei laboratori clinici che offrono test di genetica molecolare, per effettuarne un'analisi comparativa;
- identificare aree di possibili cooperazioni internazionali per sviluppare standard e schemi di accreditamento;
- facilitare la collaborazione internazionale fra gruppi che si occupano di specifiche patologie, in particolare per test genetici per patologie rare;
- elaborare linee guida internazionali condivise fra i vari Paesi.

La collezione dei dati è stata effettuata mediante l'invio elettronico di questionari, attraverso i coordinatori nazionali, ai laboratori che eseguono test genetici.

I dati raccolti contenevano informazioni relative a:

- Organizzazione dei laboratori.
- Qualifica del personale.
- Tipi di test eseguiti.
- Adozione di schemi di qualità.
- Informazioni circa i campioni (in particolare lo scambio di campioni attraverso i vari Paesi).
- Tecniche impiegate.
- Pratiche di refertazione (inclusa la consulenza).
- Schemi di accreditamento.
- Uso del consenso informato.

I coordinatori dei 18 Paesi hanno individuato una lista di laboratori pubblici e privati ai quali inviare il questionario. In totale sono state raccolte informazioni provenienti da circa 600 diversi laboratori; ciascun laboratorio ha partecipato in maniera anonima e tutti i dati sono stati raccolti in una banca dati per l'analisi.

Sulla base dei risultati ciascun coordinatore ha sviluppato una specifica tematica tra quelle risultate di maggiore importanza. Il compito dell'ISS è stato quello di analizzare i dati relativi al *Trasborder flow* dei campioni biologici con particolare riferimento alle malattie rare.

A conclusione di questo lavoro sono state elaborate le Linee guida per la buona pratica nei laboratori di genetica molecolare (*OECD Guidelines for Quality Assurance in Genetic Testing* [http://www.oecd.org/document/24/0,3343,en\\_2649\\_34537\\_1885208\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/24/0,3343,en_2649_34537_1885208_1_1_1_1,00.html)).

#### **Attività programmata**

L'attività collaborativa con OECD verrà continuata, assicurando il futuro aggiornamento delle Linee guida (*OECD Guidelines for Quality Assurance in Genetic Testing* [http://www.oecd.org/document/24/0,3343,en\\_2649\\_34537\\_1885208\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/24/0,3343,en_2649_34537_1885208_1_1_1_1,00.html)) distribuite nei diversi Paesi OECD.

**Centro nazionale  
Sangue**

---

**Attività di ricerca**



### **Bancaggio e trapianto di cellule staminali di cordone ombelicale: analisi del registro internazionale**

Il trapianto di midollo osseo con cellule prelevate da cordone ombelicale è ormai diventata una realtà clinica in ambito internazionale (3.749 trapianti effettuati nel mondo nel 2009, dati *World Marrow Donor Association* – WMDA). L'ininterrotta tendenza all'aumento di questo tipo di trapianti negli anni è da attribuire alla sua crescente affidabilità e attività antitumorale medesima a quello convenzionale con cellule prelevate da donatore adulto, e alla possibilità di effettuare trapianti anche parzialmente incompatibili con un considerevole aumento della possibilità di trovare un'Unità idonea per un paziente. Il sistema si basa su una rete di banche in cui le unità raccolte al momento del parto vengono tipizzate e congelate. Le tipizzazioni vengono a loro volta immesse in Registri internazionali che sono visibili da tutti i Centri trapianto nel mondo. Eurocord rappresenta la più prestigiosa istituzione scientifica a livello mondiale per il trapianto di cellule cordonali e dispone del più esteso registro internazionale di trapianto da sangue cordonale. Eurocord, AO universitaria Careggi, CNS e CNT condividono il presente progetto internazionale finalizzato alla raccolta di dati relativi alle modalità di bancaggio delle Unità che sono state utilizzate per trapianto. I dati saranno interfacciati con l'andamento del trapianto e, dopo adeguata stratificazione per caratteristiche cliniche dei pazienti, verranno analizzate le variabili laboratoristiche che influenzano il risultato clinico.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Gli obiettivi del progetto sono: i) la creazione di un database con accoppiamento di dati utili per unità trapiantata/outcome del trapianto; ii) l'individuazione di variabili significativamente associate all'esito del trapianto; iii) la stesura di linee guida per l'affinamento del processo di bancaggio; iv) la divulgazione dei risultati del progetto su riviste internazionali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'analisi delle variabili collegate al bancaggio di cellule cordonali su un numero di campioni che rappresenta una larga parte dell'esperienza trapiantologica mondiale consente di ottimizzare l'attività delle Banche e fornisce agli specialisti di trapianto ulteriori strumenti per una più efficace selezione delle unità cordonali per i loro pazienti. I risultati dello studio saranno disponibili per la comunità scientifica con i tempi necessari all'elaborazione dei dati e alla loro pubblicazione. Attraverso questo progetto i partner, accanto ad una visibilità del network italiano, avranno la possibilità di accedere ai dati dello studio in tempo reale, consentendo un'evoluzione delle politiche e delle tecniche di bancaggio in anticipo sul network internazionale, consolidando così un'organizzazione di rete che si è già dimostrata efficace a livello internazionale. In particolare le reti trapianti e trasfusionale beneficeranno dei risultati emersi per una migliore efficienza del sistema.

### **Definizione del prezzo unitario di cessione tra aziende sanitarie e tra Regioni delle unità di sangue, dei suoi componenti e dei farmaci plasmaderivati prodotti in convenzione**

Le risorse finanziarie del sistema trasfusionale sono quelle previste dalla Legge 219/2005, dal DL.vo 207/2007 e dal DL.vo 208/2007, e quelle messe a disposizione dalle Regioni e/o da altri livelli locali. Il costo di produzione degli emocomponenti e il relativo prezzo unitario di cessione tra servizi sanitari pubblici sono stati originariamente determinati con DM 22/11/93. Fino all'Accordo Stato-Regioni del 2003, le tariffe sono state unicamente aggiornate. Lo scenario evolutivo del sistema trasfusionale, che richiede, per quanto necessario, la condivisione dei prodotti disponibili, siano essi emocomponenti o

plasmaderivati, impone oggi una revisione delle tariffe di scambio. La Legge 42/2009 (Delega al Governo in materia di federalismo fiscale, in attuazione dell'articolo 119 della Costituzione) ha introdotto importanti novità in materia di costi e di programmazione del fabbisogno nell'ambito dell'SSN al fine di abbandonare lo spreco di risorse e basare l'erogazione delle risorse da assegnare in base ai criteri di efficienza. Il CNS, come previsto dall'art. 12, comma 4, lettera b) della Legge 219/2005, ha sviluppato il presente progetto che prevede un'analisi dei costi di produzione degli emocomponenti labili e plasmaderivati volta alla determinazione del relativo prezzo unitario di cessione.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto prevede di svolgere una ricognizione e pesatura dei costi delle attività che compongono i processi trasfusionali che portano alla produzione di unità di emocomponenti e plasmaderivati, in collaborazione con gli uffici di Controllo di Gestione delle Aziende sanitarie di riferimento, nonché il confronto con i risultati di studi già effettuati in alcune regioni italiane. Attraverso il database del Sistema Informativo dei Servizi Trasfusionali (SISTRA), che contiene i dati di attività delle singole Strutture trasfusionali (ST), compreso numero di unità raccolte, saranno selezionate le 12 ST su cui effettuare lo studio. Il ciclo produttivo degli emocomponenti può essere suddiviso in fasi ad ognuna delle quali corrisponde un costo, che è dato dalla somma dei costi dei fattori produttivi impiegati (personale, materiale di consumo, costi di lavorazione e distribuzione, ecc.). In relazione al numero delle unità trattate e alle diversità operative, il processo può implicare significative differenze fra ST con importanti scostamenti nei relativi costi. I costi saranno determinati secondo quanto previsto dal DM 22/11/1993 e dal DM 15/4/1994 (art. 3). I dati raccolti saranno successivamente standardizzati in modo da rendere omogeneo il confronto tra i diversi ST e consentire una corretta definizione del prezzo unitario di cessione degli emocomponenti.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La Legge delega 42/09 prevede che le spese sostenute dalle Regioni per erogare i LEA e, di conseguenza, le somme erogate attraverso il fondo di perequazione interregionale, siano determinate nel rispetto dei costi standard e non più prendendo come riferimento la spesa storica. I risultati dello studio per la definizione del prezzo unitario di cessione tra aziende sanitarie e tra regioni delle unità emocomponenti e farmaci plasmaderivati costituiranno un'importante evoluzione del sistema trasfusionale in quest'ottica che segue logiche di benchmark e di performance qualitative che valorizzano l'efficienza e l'efficacia.

### **Definizione di un modello di presa in carico del paziente portatore di malattie emorragiche congenite finalizzato alla prevenzione e riduzione dell'impatto socio-sanitario della malattie e delle sue complicanze**

Le malattie emorragiche congenite (MEC) sono malattie rare ed ereditarie caratterizzate dal deficit di una proteina plasmatica necessaria per la coagulazione del sangue. Le più conosciute sono l'emofilia A e B causate, rispettivamente, dal deficit del fattore VIII e IX della coagulazione. La disponibilità e sicurezza di prodotti di concentrati dei fattori della coagulazione e le conoscenze sul trattamento, acquisite dagli esperti nel tempo, hanno aumentato l'aspettativa di vita dei pazienti esposti però al rischio di sviluppare concomitanti morbosità, con un grave impatto sulla gestione clinica, sia correlate alla patologia di base o al suo trattamento, sia non correlate. I centri di trattamento e cura sono sorti in molte Regioni a partire dagli anni Settanta sotto la spinta della comunità scientifica ma ancora oggi si assiste ad un'estrema variabilità nella dislocazione e nella qualità dei servizi offerti. Per dare una risposta adeguata ai bisogni dei pazienti, risulta necessario, sulla base delle risorse

disponibili, costruire e definire dei percorsi assistenziali incentrati sui Centri di cura delle MEC. Il progetto, nato dal mandato della Commissione Salute della Conferenza Stato-Regioni al CNS, mira a garantire ai pazienti risposte assistenziali adeguate e omogenee su tutto il territorio nazionale e a fornire alle Regioni strumenti per l'ottimizzazione dei percorsi diagnostico-terapeutici e dei costi del trattamento farmacologico sostitutivo.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Obiettivo principale del progetto è la produzione e condivisione di raccomandazioni/linee guida a carattere clinico ma soprattutto organizzativo che permetta alla Regioni di dotarsi di strumenti di programmazione, organizzazione e governo in grado di consentire un'efficace risposta ai bisogni socio-sanitari di tale popolazione di malati (e alle loro famiglie), favorendone l'integrazione sociale, e riducendo l'impatto della patologia e delle sue complicanze, in termini di prevenzione terziaria. Allo stesso tempo si otterrà:

- una ricognizione della normativa di riferimento, delle raccomandazioni prodotte a livello nazionale ed europeo e delle principali evidenze (*best practice*, percorsi diagnostico-terapeutici, modelli organizzativi, ecc.) presenti in letteratura;
- una ricognizione dei sistemi di accreditamento istituzionali e volontari del settore a livello nazionale e internazionale;
- la definizione di raccomandazioni/linee guida organizzative per l'assistenza alle MEC;
- la definizione di un modello socio-sanitario condiviso di organizzazione regionale per la cura delle MEC finalizzato all'erogazione di assistenza multi-dimensionale ai pazienti nell'ambito dei LEA;
- una valutazione della sostenibilità del modello di cura, nell'ottica di un bilancio fra appropriatezza, esigenze socio-sanitarie del paziente ed efficienza;
- la disseminazione e comunicazione dei risultati.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto avrà importanti ricadute territoriali in termini di assistenza socio-sanitaria e presa in carico dei pazienti con MEC e di realizzazione di una rete omogenea sul territorio nazionale attraverso reti regionali dedicate all'assistenza alle MEC. Il modello che si propone di sviluppare consentirà di rispondere ad alcuni bisogni essenziali, quali:

- diagnosi e trattamento precoce;
- appropriatezza organizzativa e terapeutica;
- assistenza in regime di emergenza;
- assistenza socio-sanitaria globale del paziente con MEC anche in presenza di patologie concomitanti gravi, quali le malattie oncologiche e multifattoriali;
- prevenzione e riduzione dell'impatto socio-sanitario della malattia e delle sue complicanze (inibitori, artropatie, co-morbosità);
- processi di in/formazione del paziente e delle famiglie, per una maggiore consapevolezza della malattia, a favore dell'integrazione sociale e per istituire programmi di formazione sul trattamento a domicilio.

#### **In vitro and in vivo studies on a new blood component: platelet gel from cord blood**

Il progetto consiste di due parti:

- Caratterizzazione *in vitro* del *Cord Blood Platelet Gel* (CBPG) (volume, cellularità, analisi proteomica mediante tecniche sviluppate presso l'Università della Tuscia), preparato come segue: i) *pool* di tre unità di CBPG in asepsi; ii) centrifugazione lenta per ottenere plasma ricco di piastrine; iii) separazione del plasma supernatante ricco di

- piastrine; iv) concentrazione delle piastrine mediante centrifugazione a circa due milioni di piastrine/uL; v) criopreservazione a -80°C.
- Studio clinico finalizzato a confrontare l'efficacia del CBPG rispetto alle medicazioni avanzate nel trattamento delle ulcere cutanee in un gruppo di grandi anziani ipomobili. Obiettivo primario: numero di ulcere cutanee guarite entro tre mesi di trattamento (CBPG rispetto alle medicazioni avanzate); obiettivi secondari: percentuale di riduzione del volume delle ulcere cutanee; costo del trattamento. Per la produzione di CBPG si stima di poter disporre annualmente di circa 10.000 unità di CB non idonee al bancaggio per scopi di trapianto emopoietico a causa di una bassa cellularità, previo consenso informato delle madri. Una ditta di biotecnologie preparerà il CBPG da tali unità in condizioni conformi con le norme GMP. Al termine del primo anno saranno disponibili circa 1.500-1.600 unità (*pool*) di CBPG. Altrettante unità potranno essere preparate nel secondo anno. Nel terzo anno verrà eseguito il *clinical trial* con le unità di CBPG precedentemente preparate.

#### **Risultati attesi nel triennio**

È atteso che il progetto produca i seguenti risultati:

- Estensione delle conoscenze relative ai fattori di crescita rilasciati dal gel piastrinico ottenuto da sangue placentare mediante identificazione, dosaggio e caratterizzazione molecolare degli stessi.
- Realizzazione di un processo produttivo industriale conforme alle norme GMP di preparazione di gel piastrinico idoneo ad un impiego clinico allogeneo nell'uomo.
- Approfondimento delle conoscenze relative ai meccanismi di azione del gel piastrinico da sangue placentare nella riparazione delle ulcere cutanee.
- Miglioramento delle metodiche di trattamento delle ulcere cutanee nei pazienti anziani ipomobili.
- Riduzione dei costi di trattamento delle ulcere cutanee.
- Più ampia valorizzazione della donazione altruistica del sangue placentare, finora utilizzata clinicamente solo a scopo di trapianto emopoietico, tramite recupero e uso clinico anche delle unità di sangue placentare non idonee al bancaggio a scopo di trapianto emopoietico perché contenenti una dose insufficiente di cellule nucleate (circa l'80% delle unità donate).

#### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati prodotti nel progetto CBPG saranno trasferibili ai seguenti livelli:

- Esecuzione di colture cellulari che utilizzino fattori di crescita ottenuti dal gel piastrinico da sangue placentare umano. Questo impiego è particolarmente rilevante in considerazione delle restrizioni normative e regolatorie che impediscono l'uso di reagenti di origine animale non umana nelle procedure di preparazione di prodotti per terapia cellulare avanzata.
- Applicazione di nuove procedure di riparazione delle ulcere cutanee resistenti ai trattamenti convenzionali a vaste casistiche di pazienti diabetici e non diabetici residenti in strutture di lungodegenza e in case di riposo.
- Promozione di altri studi clinici sperimentali del trattamento di diverse patologie ortopediche, finalizzati alla rigenerazione ossea nell'ambito della chirurgia maxillo facciale e dei difetti da carenza ossea post-traumatica.

#### **Italian Cord Blood Network (ITCBN) – analisi dei costi e definizione delle tariffe**

Ad oggi sono bancate nel mondo più di 400.000 unità di sangue cordonale, provenienti da donatori *unrelated*. Il sangue cordonale sta diventando una fonte alternativa di cellule

staminali sempre più utilizzata per la cura di malattie onco-ematologiche e non solo. In Italia ci sono 18 Banche, collocate in 11 Regioni, riunite in un network coordinato dal CNS in sinergia con il CNT. L'inventario complessivo del network italiano consta di 30.000 unità, di cui più di 20.000 estesamente caratterizzate ed esposte al Registro nazionale italiano donatori di midollo osseo (*Italian Bone Marrow Donor Registry*, IBMDR), sportello unico per le cellule staminali emopoietiche, attraverso il quale le unità sono selezionate dai centri trapianto. Le voci di costo relative alle attività di una Banca sono state analizzate in un modello proposto nel 2008 dalla Banca di Milano (Policlinico Ospedale Maggiore). Le prestazioni sanitarie erogate dalla Banca pubblica rientrano nell'ambito dei LEA e sono totalmente a carico dell'SSN. L'unica modalità di rientro dei costi (caratterizzazione delle unità cordonali e analisi qualitativa, congelamento e crioconservazione) è rappresentata dalla tariffa di cessione delle unità cordonali selezionate per trapianto e risulta inferiore a quella fissata da altri Registri internazionali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto ambisce ad effettuare una attenta mappatura dei processi aziendali coinvolti nell'attività di raccolta delle cellule staminali nel suo complesso, sin dalla sua fase iniziale (legata alla volontà dei genitori di voler donare le cellule staminali prelevate dal cordone del nascituro). Il focus delle indagini sarà, quindi, tarato (per quanto possibile, tenuto conto del *trade-off* costi/benefici) su ciascuna azienda aderente all'ITCBN, nel presupposto che solamente effettuando una analisi globale si possano definire analiticamente tutte le fasi e le componenti di costo sottese alla richiamata attività garantita dall'SSN italiano.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Considerato che la tariffa da interscambio (datata al 2003) è dichiarata sicuramente inferiore a quella praticata in altri Paesi che aderiscono al registro internazionale, il raggiungimento degli obiettivi conoscitivi del progetto renderà possibile definire (in misura sicuramente preziosa, anche se non esaustiva) i costi standard da avvalorare sulla rete delle Banche. In tal modo si potranno governare al meglio le leve direzionali di ciascuna azienda in una prospettiva di economicità e di maggiore autonomia finanziaria.

### **La qualità delle tecniche sierologiche e di amplificazione genomica finalizzate alla qualificazione biologica dei prodotti ad uso trasfusionale: organizzazione di programmi VEQ e allestimento di preparazioni di riferimento**

Il laboratorio, che esegue le indagini sierologiche e molecolari per la qualificazione biologica delle unità di sangue ed emocomponenti, deve definire e applicare procedure operative finalizzate ad ottenere risultati che rispettino standard di precisione, accuratezza e ripetibilità. Il laboratorio adotta le seguenti strategie: il "controllo di qualità interno" (CQI) che comprende l'utilizzo di Preparazioni di Riferimento o Standard al fine di intercettare un qualunque evento che possa pregiudicare l'accuratezza del metodo analitico utilizzato; il "controllo di qualità esterno" (CQE) che si concretizza principalmente mediante la partecipazione del laboratorio a Confronti Interlaboratorio, quali i Programmi di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ).

Il presente progetto, in collaborazione con il CRIVIB, si articolerà nel seguente modo:

- organizzazione di Programmi VEQ per i saggi di amplificazione genica (NAT) per la ricerca di HCV RNA, HIV RNA, HBV DNA e WNV RNA;
- organizzazione di Programmi VEQ per i saggi immunometrici per la ricerca di anti-HCV, anti-HIV1-2, HBsAg e anti-treponema;
- sviluppo di preparazioni di riferimento nazionali per HCV, HIV HBV e WNV da impiegare nei saggi NAT.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il presente progetto ha lo scopo di fornire ai Laboratori afferenti ai Servizi Trasfusionali un valido strumento per monitorare la qualità delle prestazioni analitiche e della competenza degli operatori. Inoltre le Strutture Trasfusionali verranno coinvolte in un lavoro di gruppo dal quale vengono generati dati analitici che verranno elaborati in un report che verrà distribuito ai partecipanti.

Dalla partecipazione ad un Programma VEQ ciascun laboratorio potrà:

- confrontare l'affidabilità delle proprie prestazioni analitiche con quelle di altri laboratori;
- prendere confidenza con la tecnologia in uso, e in particolare di conoscere i limiti delle metodiche NAT e immunometriche impiegate;
- individuare nel processo analitico elementi di criticità.

### **Trasferibilità dei risultati**

Il singolo laboratorio può misurare la propria prestazione confrontandola con quella degli altri partecipanti ed effettuare un'autovalutazione al fine di poter riesaminare le proprie procedure operative ed eventualmente attivare le misure correttive più appropriate.

## **La valutazione della qualità nella produzione e dell'appropriatezza nell'uso dei medicinali plasmaderivati**

Al CNS vengono assegnati, dalla normativa vigente, compiti di coordinamento e supporto tecnico alla programmazione in materia di plasma e medicinali plasmaderivati. In particolare, l'emanazione di linee guida relative alla qualità e sicurezza del sangue e dei suoi prodotti, anche in attuazione delle direttive comunitarie, l'effettuazione di studi e ricerche sulla qualità e appropriatezza delle prestazioni trasfusionali, la promozione e organizzazione del controllo di qualità riguardante le procedure e le metodiche diagnostiche in campo trasfusionale e attività di formazione relativamente alla medicina trasfusionale. Inoltre il CNS svolge attività di supporto tecnico scientifico ai fini della corretta e completa raccolta delle informazioni inerenti alle caratteristiche di qualità e sicurezza del plasma nazionale. Tenuto conto delle precedenti esperienze è stato avviato un progetto di collaborazione con il Dipartimento di Medicina del Lavoro dell'Università degli Studi di Milano per ottenere un'analisi statistica e valutazione della qualità nella produzione e dell'appropriatezza nell'uso dei medicinali plasmaderivati.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto prevede il raggiungimento dei seguenti obiettivi:

- Valutazione dell'appropriatezza dell'uso dell'albumina e dei fattori della coagulazione, attraverso il confronto per strutture, aree geografiche e/o canale distributivo e identificazione del maggiore scostamento rispetto alla media dei valori osservati, l'analisi dei possibili fattori causali, l'identificazione del campione di strutture e di soggetti assistiti su cui effettuare la rilevazione dati e l'analisi delle patologie, del percorso assistenziale e dei consumi dei soggetti identificati in un'ottica di appropriatezza d'uso.
- Approfondimento dell'analisi statistica del controllo di qualità di processo con un lavoro di studio sulle basi statistiche del controllo di qualità di processo e con esempi di applicazione.
- Analisi e valutazione dei dati epidemiologici relativi ai marcatori delle infezioni HBV, HCV, HIV e Lue nella popolazione dei donatori, attraverso analisi di tendenza sui dati di sorveglianza epidemiologica per gli anni 1999-2010, il reperimento degli stessi dati

a livello della popolazione generale, la comparazione degli andamenti delle infezioni nelle due popolazioni.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Gli esiti della valutazione dell'appropriatezza dell'uso dell'albumina e dei fattori della coagulazione saranno oggetto di un report ad uso interno che agevoleranno *policy* finalizzate a garantire l'appropriatezza dell'utilizzo del prodotto stesso.

L'analisi statistica del controllo di qualità di processo sarà utile ai fini della produzione di Linee guida destinate ai professionisti dei Servizi Trasfusionali.

L'analisi dei dati epidemiologici della popolazione generale confrontata con quelli della popolazione generale permetteranno di valutare l'efficacia del sistema di sorveglianza e prevenzione delle infezioni legate alle donazioni con considerazioni relative alla valenza clinica di eventuali trend che risultino statisticamente significativi. L'analisi sarà infine oggetto di una pubblicazione scientifica.

### **Progetto qualità della rete trasfusionale italiana**

L'accordo sancito dalla Conferenza Stato-Regioni in data 16/12/2010 ha approvato i nuovi requisiti strutturali, tecnologici e organizzativi (STO) minimi per l'esercizio delle attività sanitarie e il modello per le visite di verifica dei servizi trasfusionali e delle unità di raccolta del sangue e degli emocomponenti. Al CNS, organismo di coordinamento e di controllo tecnico-scientifico del sistema trasfusionale nazionale (Legge 21/10/2005 n. 219), è stato attribuito il compito di formare valutatori nazionali specificamente qualificati per il sistema trasfusionale. In particolare, l'art. 6, comma 1 della Legge 219/2005, prevede che venga promossa l'uniforme erogazione dei livelli essenziali di assistenza in materia di attività trasfusionali anche attraverso la qualificazione dei servizi trasfusionali, l'omogeneizzazione dei modelli organizzativi degli stessi, l'applicazione di requisiti strutturali, tecnologici e organizzativi uniformi su tutto il territorio nazionale; in applicazione a quanto stabilito dall'art. 12, comma 4, lettera t), il CNS promuove programmi di formazione per l'esercizio delle attività di vigilanza, controllo e accreditamento delle strutture trasfusionali, di competenza delle Regioni.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il CNS è chiamato a organizzare corsi di formazione della durata di 40 ore consecutive, ciascuno per un numero massimo di 25 partecipanti, selezionati e proposti dalle Regioni sulla base dei requisiti di ingresso definiti nello stesso accordo. Le materie dei corsi sono:

- normative del settore trasfusionale nazionali ed europee;
- organizzazione trasfusionale in Italia;
- normativa nazionale ed europea in materia di prodotti medicinali per gli aspetti di pertinenza del sistema trasfusionale;
- sistema di gestione della qualità;
- gestione della documentazione;
- controlli di qualità;
- gestione dei contratti e qualificazione dei fornitori;
- gestione delle attività di misurazione, analisi e miglioramento della qualità;
- ritiro dei prodotti;
- convalida di processi e procedure e controllo statistico di processo;
- gestione delle competenze del personale;
- logistica, sicurezza, igiene degli ambienti di un servizio trasfusionale e di una unità di raccolta;
- gestione delle tecnologie e dei materiali;

- sistema informatico e flussi informativi;
- gestione dei processi trasfusionali (*vein to vein*);
- tracciabilità;
- emovigilanza.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Le attività di formazione sono finalizzate ad armonizzare i criteri di valutazione e le metodologie di verifica dei requisiti STO nei processi di autorizzazione e accreditamento. Ferme restando le prerogative e le competenze delle regioni e province autonome in tema di vigilanza, il CNS è responsabile della costituzione di un elenco nazionale di valutatori per lo svolgimento degli audit presso i servizi trasfusionali e le unità di raccolta, del continuo aggiornamento dei valutatori e della verifica annuale del mantenimento delle competenze. Oltre alla formazione, il CNS si occuperà dello sviluppo di strumenti operativi per l'esecuzione delle convalide di processo/procedure e per lo sviluppo di metodologie di controllo statistico di processo; tali strumenti sono destinati a costituire un importante ausilio per i servizi trasfusionali nell'attuazione dei percorsi di adeguamento ai requisiti cogenti in materia di sistemi qualità applicati alle attività trasfusionali.

### **Programmazione nazionale del sistema plasma e plasmaderivati**

La normativa vigente assegna al CNS le seguenti specifiche funzioni: i) analisi del fabbisogno nazionale e della domanda di plasmaderivati (punto o) comma 4 dell'art. 12 della legge 21/10/2005 n. 219); ii) supporto tecnico-scientifico alla definizione di un programma finalizzato allo sviluppo della raccolta di plasma nei servizi trasfusionali e nelle unità di raccolta e alla promozione del razionale e appropriato utilizzo dei farmaci plasmaderivati (comma 2 dell'art 26 del DL.vo 20/12/2007, n. 261); iii) attività di formazione relative alla materia plasma e plasmaderivati (punto m) comma 4 dell'art. 12 della legge 21/10/2005 n. 219). Nell'ambito delle predette funzioni a supporto dell'attività di programmazione nazionale del sistema plasma e plasmaderivati, si rende necessario identificare specifici obiettivi di miglioramento che interessino:

- variabili quantitative, quali il controllo della domanda e la pianificazione dell'offerta di plasma e medicinali plasmaderivati, declinati su base regionale e territoriale;
- dimensioni qualitative, quali la qualificazione del sistema plasma e plasmaderivati attraverso la raccolta sistematica delle informazioni relative alle caratteristiche di qualità e sicurezza del plasma ai fini della certificazione di plasma master file.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto prevede le seguenti fasi:

- Valutazione del bisogno/domanda e dell'offerta di emocomponenti, plasma e medicinali plasmaderivati, con un particolare riferimento alle analisi statistiche ed epidemiologiche che prevedono georiferimento dei dati e relativa cartografia.
- Realizzazione d'iniziative formative destinate al personale dei servizi trasfusionali in modalità "a distanza" a supporto della raccolta sistematica di informazioni relative alle caratteristiche di qualità e sicurezza del plasma (PMF).

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto fornirà indicazioni basate sulle evidenze per la programmazione dell'autosufficienza regionale e nazionale finalizzate allo sviluppo della raccolta di plasma nei servizi trasfusionali e nelle unità di raccolta e alla promozione del razionale e appropriato utilizzo dei farmaci plasmaderivati, in accordo a quanto previsto dalla normativa nazionale e europea vigente. Inoltre consentirà la raccolta e organizzazione delle informazioni inerenti la qualità e sicurezza del plasma (*Plasma Master File*) utilizzato come materia prima per la

produzione di medicinali plasmaderivati, in accordo a quanto previsto dalla normativa nazionale ed europea vigente.

### **Sangue sano in città sane**

Dalla convenzione stipulata con la Rete Italiana Città Sane della WHO, finalizzata alla realizzazione di iniziative e progetti sulle tematiche della salute, della solidarietà e della prevenzione secondo le direttive della WHO, il progetto intende realizzare un exhibit museale che conduce alla scoperta del sangue, stimolando l'apprendimento delle nozioni di biologia, storia della medicina, farmaceutica e volontariato sociale. L'*exhibit* è progettato come un percorso concettuale reso materiale dalla pannellatura e da un allestimento a forma di "cuore" e sarà supportato da filmati ed esperimenti live, caffè scientifici, incontri didattici nello spazio living. La presentazione è basata sulla narrazione dei cinque sensi, utilizzando modalità espressive ad alto tasso tecnologico per garantire il coinvolgimento di un pubblico adolescente, sensibile agli effetti speciali, con la creazione di *moodboard* sensoriali per introdurre, attraverso il "senso", contenuti esplicativi offerti da didattica tradizionale (*leaflet*, spiegazioni verbali, quiz).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Obiettivo del progetto è di creare una sinergia tra organizzatore e fruitore, per sviluppare una forte transattività tra sangue che scorre nelle vene e sangue che cura (donato e trasfuso), in modo da costruire fin dall'adolescenza una pro attiva cultura della donazione consapevole e responsabile. Si ipotizza la fruizione da parte di 8 classi/giorno di 30 allievi con età dai 12 anni e oltre, per una durata di 40 minuti a percorso, mentre nel caso di caffè scientifici o incontri con esperti/performance, la platea può essere allargata, ovviamente previa valutazione della location. Per valutare le ricadute sui comportamenti dei giovani che visitano l'*exhibit* rispetto alla donazione del sangue, verrà predisposto un modulo da compilare a cura dei ragazzi maggiorenni (classi 4 e 5 degli Istituti superiori) e da consegnare ai rappresentanti del sistema trasfusionale locale che provvederanno a mantenere attivo il monitoraggio.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto intende creare un exhibit con struttura smontabile e adattabile alle diverse sedi che ospiteranno l'iniziativa. L'evento ha lo scopo di sensibilizzare i giovani alla donazione del sangue all'interno di corretti stili di vita e come valore sociale solidaristico. Per raggiungere la massima partecipazione e informazione promozionale, si ritiene indispensabile prevedere un appoggio mediatico, ad esempio attraverso le radio locali, nonché una campagna territoriale con promocard, molto efficace tra i giovani e già ampiamente collaudata dal CNS in altre occasioni. Il contributo informativo fornito dal mondo della ricerca, della cura e del volontariato produrrà un inedito mix di promozione culturale e valoriale agito da giovani per giovani.

### **Target patogenetici molecolari dell'emocromatosi secondaria**

Abbiamo dimostrato che topi *inbred* con background genetico C57bl/6 non sviluppano alcun segno ecocardiografico e istologico di cardiomiopatia in condizioni di somministrazione cronica di ferro-destrano somministrato una volta a settimana per otto settimane consecutive per via intraperitoneale alla dose di 8g/kg. Se si tiene conto che un'unità di emazie contiene circa 250 mg di ferro, risulta evidente che il ceppo di topo in questione è in grado di tollerare un sovraccarico di ferro 100 volte maggiore di quello necessario nell'uomo a indurre segni di disfunzione cardiaca. Questa capacità sembra essere

specifica del ceppo C57bl/6 poiché altri ceppi di topi come il B6D2F1 sviluppano una severa cardiomiopatia dopo 4-13 settimane di somministrazione di ferro-destrano, a parità di ferro somministrato. Questi risultati pongono un'importante questione: il ceppo C57bl/6 tollera l'abnorme apporto di ferro parenterale perché è in grado di eliminare efficacemente il ferro in eccesso? Per rispondere al quesito è necessario costituire diversi gruppi di topi C57bl/6, ai quali somministrare quantità differenti di ferro-destrano e nei quali determinare l'entità dell'accumulo di ferro nel cuore mediante tecnica *Imaging* a Risonanza Magnetica. Saranno costituite e seguite due popolazioni di topi C57bl/6 e B6D2F1, con un sovraccarico di ferro, e sarà monitorato l'accumulo di ferro cardiaco nel tempo, i livelli di escrezione di ferro a livello urinario, e l'eventuale coinvolgimento del canale DMT1.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Costituiscono obiettivi del progetto:

- verificare l'ipotesi che i topi c57bl/6 sono in grado di eliminare in maniera significativa il ferro in eccesso;
- individuare i meccanismi molecolari che sono alla base di tale fenomeno.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'emocromatosi, condizione patologica dovuta ad un progressivo accumulo di ferro nell'organismo, consegue, nella maggior parte dei casi, a trasfusioni ripetute di sangue per anemie congenite quali la beta-talassemia omozigote o acquisite quali le mielodisplasie. Dal momento che ogni ml di emazie contiene circa 1 mg di ferro, la trasfusione di appena 15 unità di emazie raddoppia il ferro totale dell'organismo. Poiché non esiste alcun meccanismo fisiologico che comporti una significativa eliminazione del ferro in eccesso, il ferro si deposita nei tessuti come fegato, cuore e pancreas dove causa danno d'organo tramite la formazione di radicali reattivi dell'ossigeno. Strategie terapeutiche tese a limitare tale accumulo rappresentano un obiettivo primario in medicina trasfusionale.

#### ***The Italian platelet technology assessment study (IPTAS): safety, efficacy, anti-HLA allo-immunization and acute transfusion reactions in onco-hematology recipients of platelets treated with two photo-chemical pathogen inactivation procedures and tested for quality by proteome analysis***

Il progetto IPTAS ha lo scopo di fornire evidenze sulla sicurezza ed efficacia delle piastrine preparate con procedure standardizzate impiegando l'inattivazione dei globuli bianchi (*White Blood Cells*, WBC) al posto della filtrazione per ridurre l'alloimmunizzazione anti-HLA e le reazioni acute post-trasfusionali. L'incidenza degli effetti collaterali e l'impatto economico della tecnologia di inattivazione dei patogeni, dato dal bilancio tra costi aggiuntivi e costi evitati, saranno comparati per le piastrine da *buffy coat* e da aferesi, le quali rappresentano le tipologie prevalenti di piastrine utilizzate in Italia. I dati prodotti dallo studio saranno utilizzati per valutare se l'inattivazione dei patogeni può essere utilizzata in sostituzione della filtrazione dei WBC, della  $\gamma$ -irradiazione e della diagnostica sierologica del citomegalovirus (CMV) sui donatori.

L'analisi proteomica potrà fornire dati *in vitro* sui possibili meccanismi che sono alla base dell'inattivazione dei globuli bianchi residui dopo inattivazione dei patogeni nelle piastrine ed evidenze sull'impatto dei processi di inattivazione dei patogeni sul profilo proteomico globale delle piastrine, essa includerà studi di proteomica funzionale sul mitocondrio, e fornirà dati per la potenziale identificazione di *marker* per le lesioni da conservazione e l'attivazione, sia per le piastrine inattivate che per quelle non trattate.

### **Risultati attesi nel triennio**

L'obiettivo primario dello studio clinico è dimostrare che le piastrine da sangue intero preparate con il metodo del *buffy coat* e le piastrine da aferesi sottoposte a trattamento fotochimico per l'inattivazione dei patogeni presentano lo stesso livello di sicurezza e non inferiorità in termini di prevenzione delle emorragie rispetto alle piastrine standard. Lo studio proteomico porterà a una valutazione delle modificazioni proteiche attraverso una analisi qualitativa e quantitativa delle piastrine inattivate da *buffy coat* versus quelle inattivate da aferesi.

Obiettivi secondari dello studio clinico: i) comparare l'incidenza delle reazioni acute post-trasfusionali, così da valutare la sicurezza delle piastrine; ii) comparare il costo delle piastrine inattivate con quello delle piastrine non trattate; iii) implementare un programma di emovigilanza attiva per tutte le piastrine prodotte; iv) valutare l'efficacia del programma nel monitoraggio della sicurezza trasfusionale nei servizi trasfusionali italiani. Obiettivi secondari di proteomica: i) migliorare la comprensione dei processi biologici coinvolti nelle lesioni da conservazione; ii) identificare i potenziali biomarcatori delle lesioni da conservazione; iii) indagare i meccanismi molecolari alla base dell'eliminazione delle capacità funzionali e proliferative dei globuli bianchi; iv) effettuare una valutazione comparativa dei meccanismi mitocondriali della produzione di energia nelle piastrine inattivate versus quelle standard.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati prodotti dallo studio saranno utilizzati per valutare l'utilizzo routinario del trattamento di inattivazione fotochimica per tutte le piastrine prodotte su base nazionale e forniranno ulteriori evidenze scientifiche sugli outcome clinici derivanti dall'impiego di piastrine a basso costo (da *buffy coat*) rispetto a quelle ad alto costo (da aferesi). L'implementazione di un sistema di emovigilanza attiva per il monitoraggio della sicurezza della trasfusione di piastrine permetterà il monitoraggio della sicurezza di tutte le piastrine prodotte e, verosimilmente, di tutti i componenti labili del sangue.

Lo studio di proteomica fornirà nuove e utili conoscenze sui cambiamenti che si verificano durante il trattamento e la conservazione degli emocomponenti e dati per l'ottimizzazione dei processi di produzione delle piastrine e/o dei sistemi di inattivazione dei patogeni incrementando gli standard di sicurezza relativi alla terapia trasfusionale con piastrine.

### **Tracking Health Communication Across Digital Media, Youth and Blood Donation**

Una delle modalità attraverso cui negli ultimi anni sono state sviluppate le campagne di coinvolgimento più innovative corrisponde all'utilizzo della rete Internet e del web 2.0 per diffondere messaggi comunicativi, creando opportunità di partecipazione e coinvolgimento in grado di far crescere il numero di donatori volontari, in particolare i giovani che utilizzano le nuove tecnologie dell'informazione e che costituiscono un bacino potenziale di nuovi donatori. Questo progetto costituisce il primo studio italiano che intende indagare e approfondire come le nuove tecnologie dell'informazione, e in particolare i social network, siano impiegate dalle giovani generazioni per promuovere e discutere le questioni legate alla salute e in particolare il tema della donazione di sangue, la donazione del sangue cordonale al momento della nascita e le attività cliniche e di ricerca in materia di medicina trasfusionale. L'intento del CNS, che ha già intrapreso un percorso di comunicazione fortemente interattiva e orientata al pubblico dei giovani, sarebbe quello di esplorare più dettagliatamente le modalità relazionali agite tra i fruitori dei *social network*, anche

attraverso l'etnografia virtuale, per favorire in modo appropriato la veicolazione delle informazioni e la formazione di opinioni riguardo alla salute e agli stili di vita.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto si articola nelle seguenti fasi:

- ricognizione delle fonti, dimensione e familiarità del fenomeno in Italia vs Europa, indagine sulle esperienze più significative di partecipazione collettiva a progetti di promozione della salute e *edutainment*;
- etnografia virtuale, con l'obiettivo di comprendere come adolescenti (15-18 anni), giovani (19-25 anni) e giovani adulti (25-29 anni) utilizzano social network e forum web per discutere dei temi legati ai comportamenti propedeutici alla donazione di sangue e alla decisione di donare il sangue cordonale vs conservazione autologa;
- *survey on line*, anche attraverso sito del CNS, con l'obiettivo di indagare la percezione di ruolo, potenzialità e limiti delle tecnologie digitali per la comunicazione della salute;
- individuazione di narrazioni efficaci sul tema della salute e della solidarietà vs materiale disponibile in rete ed elaborazione di un sistema per la valutazione di impatto di un progetto innovativo di comunicazione digitale da studiare e progettare con il patrocinio e la collaborazione dei partner della Fondazione Pubblicità e Progresso, e Associazione Editori Software Videoludico Italiana (AESVI) come, ad esempio, un video gioco diffondibile tramite la rete (*Tubegame*).

### **Trasferibilità dei risultati**

Comunicare la donazione di sangue, come gesto di consapevolezza e ottenere la fidelizzazione del donatore attraverso un percorso di accoglienza “confortevole”, è un compito molto importante, che contribuisce in modo determinante a coinvolgere un numero sempre più elevato di donatori e mantenere dunque l'autosufficienza nazionale delle scorte di sangue. L'indagine ricognitiva sull'uso dei social network e dei registri di comunicazione più efficaci (post favorevoli e video più cliccati), dovrebbe costruire il *briefing* su cui basare la progettazione di *Tubegame* e spot con intento virale da lanciare in rete, per mobilitare una “Primavera di solidarietà consapevole”, per parafrasare il fenomeno della partecipazione politica scaturita recentemente dai giovani dei Paesi che si affacciano sul Mediterraneo.

### **Valutazione del rischio di trasmettere la malattia di Creutzfeldt-Jakob attraverso trasfusioni di sangue: sorveglianza epidemiologica in medicina trasfusionale**

La CJD sporadica è una rara malattia del sistema nervoso centrale che colpisce entrambi i sessi a tutte le età ma a maggiore incidenza sopra i 60 anni. Nonostante la CJD sporadica sia una malattia trasmissibile causata da un agente infettivo molto atipico (prione) in grado di resistere alle comuni pratiche di decontaminazione utilizzate nella routine medico-chirurgica, gli eventi legati a trasmissione interumana rimangono estremamente rare (CJD iatrogene). È possibile che le trasfusioni di sangue siano un fattore di rischio per la CJD sporadica. I dati preliminari ottenuti in ISS su oltre 1.000 pazienti segnalati al registro nazionale della CJD mostrano che le trasfusioni di sangue avvenute almeno dieci anni prima dell'insorgenza della malattia sono ben cinque volte più frequenti nei pazienti con CJD sporadica che nei controlli neurologici.

Il progetto rappresenta il primo studio di sorveglianza epidemiologica in medicina trasfusionale in Italia per verificare la possibilità di trasmissione della CJD sporadica attraverso il sangue. A causa della rarità della malattia e del lungo tempo di incubazione, la realizzazione del progetto dipende dalla capacità di garantire la copertura nazionale della

raccolta dati e la possibilità di risalire alla storia trasfusionale pregressa dei pazienti per almeno dieci anni. A questo scopo, è stato pianificato uno studio prospettico *ad hoc* che tenga conto della numerosità delle strutture trasfusionali italiane.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Scopo del progetto è verificare, con uno studio di sorveglianza epidemiologica in medicina trasfusionale a copertura nazionale, se le trasfusioni di sangue siano implicate nella trasmissione della CJD sporadica e se, quindi, debbano essere considerate un fattore di rischio in sanità pubblica.

Gli obiettivi specifici sono: i) verificare la possibile associazione tra CJD sporadica e trasfusioni di sangue; ii) verificare l'esistenza di CJD sporadica in donatori di sangue; iii) valutare la capacità di risposta della rete di sorveglianza in medicina trasfusionale ad una nuova emergenza; iv) valutare l'efficacia degli strumenti per l'attuazione di studi di *look-back* in ambito trasfusionale.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'identificazione di casi di trasmissione di CJD sporadica attraverso le trasfusioni avrebbe importanti implicazioni in sanità pubblica. I risultati di questo studio, infatti, potrebbero determinare l'introduzione di nuove misure di sicurezza e linee guide regolatorie mirate alla prevenzione dell'infezione interumana. Ciò è particolarmente importante perché: i) non esistono test di screening del sangue in grado di individuare soggetti infetti ma ancora clinicamente sani; ii) non esistono terapie per la CJD; iii) l'unica misura per ridurre il rischio di trasmissione della CJD via sangue è quello di escludere i donatori che abbiano avuti casi di CJD in famiglia o coloro che siano stati esposti a fattori iatrogeni noti, quali trapianto di dura mater e terapia con ormoni ipofisari di natura estrattiva. Questo studio, inoltre, potrebbe individuare sul territorio nazionale eventuali trasmissioni della CJD variante attraverso il sangue.

### **Valutazione della *storage lesion* delle emazie portatrici di difetti congeniti del globulo rosso: il deficit enzimatico di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) e il *trait* sferocitico**

Dal momento che la sopravvivenza eritrocitaria è strettamente correlata allo stato metabolico e allo stato fisico della membrana, la presenza di un deficit di G6PD o di difetto congenito delle proteine del membrano-scheletro, rende la cellula più suscettibile allo stress ossidativo e alla denaturazione delle proteine di membrana e può accelerarne l'invecchiamento e la lisi. Le alterazioni che le emazie subiscono durante la conservazione a scopo trasfusionale condizionano l'efficacia e la sicurezza della trasfusione. Lo scopo di questa ricerca è studiare i meccanismi alla base della *storage lesion* delle emazie pre trasfusione e la loro sensibilità allo stress ossidativo. Saranno oggetto di studio globuli rossi con difetti congeniti ereditari sia da difetto enzimatico di G6PD che a carico della membrana eritrocitaria, comportanti alterazioni nella morfologia e nell'interazione tra le componenti proteiche del membrano-scheletro, al fine di paragonarne la velocità e l'entità della lesione rispetto all'invecchiamento normale (emazie controllo senza difetti congeniti) e comprenderne i meccanismi alla base della *storage lesion*. La valutazione complessiva dei dati metabolici, strutturali, reologici e morfologici associata a parametri funzionali permetterà di individuare percorsi specifici per le diverse anomalie e darà indicazioni sull'efficacia della trasfusione di tali preparati e sui tempi reali di conservazione delle emazie con difetto congenito ai fini della trasfusione.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati di questa ricerca permetteranno di:

- fornire nuovi parametri strutturali e funzionali indicativi della reale vitalità delle cellule trasfuse ai diversi tempi di conservazione;
- approfondire le conoscenze sui meccanismi che sono alla base della lesione da conservazione;
- caratterizzare la sequenza temporale dei cambiamenti in deformabilità e aggregazione dei globuli rossi durante la preservazione, anche in funzione delle possibili alterazioni del flusso ematico a livello del microcircolo;
- definire la possibilità di emolisi post trasfusionale nei riceventi in relazione al tempo di conservazione;
- valutare l'effetto sulle emazie con difetto congenito di stress ossidativi per mimare *in vitro* l'effetto di condizioni che si possono presentare in circolo dopo re infusione, come ad esempio la somministrazione di farmaci ossidanti, condizione frequente nei pazienti sottoposti a trasfusione.

**Trasferibilità dei risultati**

La ricerca darà indicazioni sulla possibilità e l'efficacia di trasfondere emazie con difetti congeniti, dirimendo un problema che si presenta nei paesi mediterranei in quelle zone con alta incidenza di tali difetti e permetterà di valutare l'opportunità e la rilevanza, a fini trasfusionali, di introdurre uno screening dei donatori per la presenza di tali difetti congeniti per evitare l'emolisi post trasfusionale nei pazienti riceventi.

**Centro nazionale  
Sangue**

---

**Attività di controllo, valutazione, parere**



### **Attività di audit nell'ambito dei percorsi di trapianto emopoietico**

Con il DL 191 del 6/11/2007, la legislazione italiana ha recepito la Direttiva europea 2004/23/CE, che definisce le norme di qualità e sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani. Nell'ambito di applicazione di questa norma sono ricomprese le strutture che raccolgono, processano, conservano e distribuiscono le cellule staminali emopoietiche midollari, periferiche e cordonali, destinate ad essere impiegate nell'uomo nell'ambito delle procedure terapeutiche di trapianto emopoietico di midollo osseo. Tali strutture si configurano, ai sensi del decreto 191/2007, come "istituti dei tessuti" e devono essere autorizzate e accreditate allo svolgimento delle attività di specifica competenza ai sensi di quanto disposto agli articoli 6 e 7 del decreto stesso. Il Ministero della Salute affida alle Regioni e Province autonome il compito di autorizzare e accreditare gli "istituti dei tessuti" e di organizzare ispezioni e misure di controllo per la verifica del rispetto dei requisiti stabiliti dalle normative vigenti, avvalendosi per questo scopo del CNT e del CNS, ciascuno per gli specifici ambiti di competenza. Nell'ambito del processo di autorizzazione e accreditamento degli "istituti dei tessuti" si colloca il percorso relativo all'accREDITAMENTO dei Programmi di Trapianto (PT) emopoietico, che in Italia sono complessivamente 106. Ciascun PT coinvolge in maniera congiunta tre differenti unità operative: l'unità di raccolta, rappresentata dai settori di aferesi dei servizi trasfusionali per quanto riguarda le CSE da sangue periferico e dalle unità operative di ematologia per quanto riguarda le CSE midollari, l'unità di processazione e l'unità clinica di trapianto. Prima del recepimento della direttiva 2004/23/CE, il CNT aveva avviato un piano di ispezioni dei PT già operativi sul territorio italiano, volto alla verifica di conformità degli stessi ai requisiti stabiliti dalle norme europee (direttiva madre 2004/23/CE, e direttive tecniche 2006/17/CE e 2006/86/CE). Il CNS, non appena istituito, è entrato a far parte di questo piano per i suoi specifici ambiti di competenza rappresentati dalle attività di verifica e controllo delle unità di raccolta e dei laboratori di processazione delle CSE in quanto settori di attività dei servizi trasfusionali. Parallelamente, i PT hanno iniziato un percorso di accREDITAMENTO tecnico-professionale secondo gli standard internazionali stabiliti dalla *Joint Accreditation Committee ISBT-EBMT International Society of Blood Transfusion - European Group for Blood and Marrow Transplantation* (JACIE). In considerazione della presenza di molti elementi comuni ai due percorsi, tecnico-professionale e istituzionale, CNT/CNS hanno stabilito una collaborazione con l'organizzazione JACIE, che ha portato alla realizzazione di verifiche ispettive congiunte presso quei PT che avevano già richiesto l'accREDITAMENTO volontario.

#### **Attività programmata**

Nel corso del 2010 e del 2011 CNS e CNT hanno realizzato attività formative rivolte ad esperti in tema di raccolta e di processazione delle CSE, individuati dai Centri regionali sangue e dai Centri regionali trapianti delle singole Regioni, con lo scopo di ampliare il team di ispettori da dedicare ai PT. I corsi di formazione sono stati di tipo teorico sui requisiti delle normative vigenti in tema di cellule e tessuti, e di tipo pratico sulla metodologia di conduzione delle attività ispettive. Nel corso del prossimo biennio (2012-2013) è previsto il completamento delle visite ispettive ai PT non ancora ispezionati secondo un calendario coordinato con quello dell'organizzazione JACIE.

## Linee guida

Ai sensi dell'art. 12 (commi d, f, g) della Legge 21 ottobre 2005 n. 219 recante "Nuova disciplina delle attività trasfusionali e della produzione nazionale di emoderivati", il CNS emana linee guida:

- relative alla qualità e alla sicurezza del sangue e dei suoi prodotti, anche in attuazione delle direttive comunitarie;
- in merito al modello organizzativo e all'accreditamento delle strutture trasfusionali;
- per il finanziamento delle attività trasfusionali.

Nel 2011, al fine di incrementare e omogeneizzare il livello complessivo di sicurezza dei prodotti labili del sangue su base nazionale e di ridurre l'incidenza complessiva di eventi avversi gravi conseguenti alla trasfusione di emocomponenti labili, sulla base dei più recenti dati epidemiologici che attestano che il danno polmonare acuto associato alla trasfusione (*Transfusion Related Acute Lung Injury*, TRALI) rappresenta la reazione avversa alla trasfusione più frequentemente causa di mortalità associata alla trasfusione di emocomponenti labili, il CNS ha emanato, con decorrenza 1/4/2011, la linea guida per la prevenzione della TRALI (LG CNS 03). La linea guida ha stabilito provvedimenti sull'appropriatezza dell'utilizzo clinico degli emocomponenti coinvolti maggiormente nelle reazioni. In particolare è stato previsto che il plasma da rilasciare per uso clinico sia quello proveniente dai soli donatori di sesso maschile o da donatrici nulligravide, con anamnesi negativa per pregresse trasfusioni di emocomponenti; per la trasfusione di piastrine da aferesi (singolo donatore) sospese in plasma tale protocollo è da seguire in modo almeno prevalente (>80%). Nel corso dei precedenti anni si è resa necessaria l'emanazione di linee guida per l'adozione di misure di sicurezza nella gestione dei processi produttivi e diagnostici nei servizi trasfusionali e per la prevenzione della contaminazione batterica del sangue intero e degli emocomponenti. Le misure di sicurezza da adottare all'interno dei servizi trasfusionali hanno riguardato l'obbligatorietà dell'apposizione dell'etichetta di validazione sulle unità di sangue e emocomponenti per evitare che unità non validate possano invece essere rilasciate. È stato inoltre previsto che la trasmissione dei dati analitici dai sistemi diagnostici ai sistemi gestionali informatici sia effettuata con procedure che escludono passaggi di trascrizione manuale e che le etichette da apporre sulle unità dovranno essere generate dai sistemi gestionali informatici con garanzia di associazione univoca fra donatore, unità, risultati analitici e, ove applicabile, *bleeding list*. Inoltre, per prevenire la contaminazione batterica delle unità donate i servizi trasfusionali dovranno utilizzare sistemi di prelievo che consentano la deviazione del primo volume di sangue (30 ml).

### Attività programmata

Nel prossimo triennio si provvederà alla stesura delle linee guida che si renderanno necessarie nell'ambito della regolamentazione delle attività trasfusionali per la salvaguardia della qualità e della sicurezza del sangue e dei suoi prodotti. Parallelamente, è prevista un'attività di controllo, di concerto con le Regioni, sull'applicazione dei requisiti di qualità e sicurezza necessari all'autorizzazione e accreditamento delle strutture trasfusionali, delle unità di raccolta e delle banche di sangue cordonale, con specifico riferimento alle disposizioni normative vigenti nazionali e di matrice europea.

## Percorsi plasma e plasmaderivati

In riferimento ai compiti assegnati al CNS dalla normativa vigente, vengono identificate le seguenti linee di attività e aree di lavoro: i) analisi del fabbisogno nazionale e della domanda di plasmaderivati [punto o) comma 4 dell'art.12 della legge 21/10/2005 n. 219]; ii) supporto tecnico-scientifico alla definizione di un programma finalizzato allo sviluppo della

raccolta di plasma nei servizi trasfusionali e nelle unità di raccolta e alla promozione del razionale e appropriato utilizzo dei farmaci plasmaderivati (comma 2 dell'art 26 del DL.vo 20/12/2007, n. 261); iii) monitoraggio e verifica degli obiettivi della programmazione [punto h) comma 4 dell'art. 12 della legge 21/10/2005 n. 219]; iv) supporto tecnico-scientifico alla definizione di tariffe nazionali di scambio dei farmaci emoderivati [punto e) comma 4 dell'art. 12 della legge 21/10/2005 n. 219]; v) supporto tecnico-scientifico al percorso attuativo della Legge 219/05 in tema di produzione di farmaci emoderivati e importazione ed esportazione degli stessi (art. 15 e 16, come modificati dalla Legge 296/06 e Legge 96/10 e della Legge 10/2011); vi) promozione e coordinamento delle attività di formazione relative alla materia plasma e plasmaderivati [punto m) comma 4 dell'art. 12 della legge 21/10/2005 n. 219]; vii) supporto tecnico-scientifico per la gestione del surplus di intermedi e prodotti finiti originati da plasma italiano; viii) supporto tecnico scientifico all'emanazione e monitoraggio implementazione delle Linee guida relative alla qualità e alla sicurezza del sangue e dei suoi prodotti [punto d) comma 4 dell'art. 12 della legge 21/10/2005 n. 219].

#### **Attività programmata**

Nell'ambito della tematica sulle valutazioni e linee guida cliniche e tecniche su temi di medicina trasfusionale, con particolare riferimento alla qualità e sicurezza dei prodotti del sangue, anche in attuazione delle direttive comunitarie [punto d) comma 4 dell'art. 12 della legge 21/10/2005 n. 219], il CNS svolgerà le seguenti attività: i) monitoraggio della qualità del plasma inviato al frazionamento dai Servizi Trasfusionali (ST); ii) valutazione tecnico-scientifica dei report periodici forniti dall'azienda di frazionamento sullo stato di implementazione della Linea Guida CNS 01 rev.1 del 22/12/2008 e sulle non conformità maggiori rilevate a carico delle unità di plasma provenienti dai ST; iii) conduzione delle indagini e dei controlli (audit) sugli ST coinvolti in eventi avversi gravi che coinvolgono il plasma italiano (es. una segnalazione di positività ai marcatori virali di *pool* di plasma industriali); iv) *risk assessment* e supporto delle attività di *risk communication* in seguito a episodi di *post donation information* (PDI) che interessano sia il plasma italiano sia quello di provenienza estera (sospetto forme classica CJD); v) relazione con le altre autorità competenti in materia di plasma e farmaci plasmaderivati.

#### **Programma di autosufficienza nazionale**

Il CNS, ai sensi dell'art. 12 della Legge 21/10/2005 n. 219, fornisce indicazioni al Ministero della Salute in merito al Programma annuale di autosufficienza nazionale, individuando i consumi storici, il fabbisogno reale, i livelli di produzione necessari, le risorse, i criteri di finanziamento del sistema, le modalità di compensazione tra le Regioni e i livelli di importazione e di esportazione che si rendono necessari.

L'autosufficienza del sangue e dei suoi prodotti è un obiettivo strategico del Paese per assicurare la continuità e la tempestività delle cure sia in condizioni normali sia quando elementi o avvenimenti critici impreveduti compromettono la regolare raccolta, produzione e messa a disposizione degli emocomponenti labili o dei farmaci emoderivati.

Dal 2009 al 2011, il CNS ha rilevato i fabbisogni regionali annuali di sangue e dei suoi prodotti e coordinato la compensazione interregionale confermandosi come punto di riferimento per le Strutture regionali di coordinamento anche per il reperimento sul territorio nazionale di unità di globuli rossi con fenotipi specifici.

Le situazioni di carenza estiva sono state presidiate e risolte mediante una serie di interventi, fra i quali: i) intensificazione della promozione della donazione da parte delle Associazioni e Federazioni dei donatori e dell'appropriatezza dell'utilizzo clinico dei globuli rossi; ii) organizzazione di interventi mediatici promozionali da parte del Ministero della

Salute e del CNS nel mese di luglio; iii) attivazione di programmi straordinari in collaborazione con alcune Regioni e con le Associazioni e Federazioni dei donatori di sangue; iv) da giugno 2011 è stata resa disponibile nel sistema informativo dei servizi trasfusionali (SISTRA) la Bachecca nazionale, uno strumento informatico di supporto alle situazioni di carenza e eccedenza di emazie coordinato dal CNS.

Al fine di rilevare con sempre maggiore affidabilità la domanda di farmaci emoderivati, il CNS ha stabilito un rapporto di collaborazione con l'AIFA.

#### **Attività programmata**

Il CNS effettuerà azioni di monitoraggio trimestrale delle attività produttive e dei consumi finalizzate a garantire la costante autosufficienza di globuli rossi e le quote di plasma da inviare alla lavorazione industriale per la produzione di plasmaderivati. Saranno intraprese azioni per il raggiungimento dei seguenti obiettivi strategici: i) intensificare la promozione della donazione e, al contempo, ridurre la donazione occasionale; ii) migliorare la rispondenza della donazione ai fabbisogni quantitativi e qualitativi di emocomponenti, attraverso la riduzione della variabilità infra-annuale della donazione e l'ottimizzazione delle dinamiche della chiamata; iii) attivare specifici interventi in situazioni locali di prevalenza e/o incidenza delle malattie infettive trasmissibili (HBV, HCV, HIV) significativamente superiori alla media nazionale; iv) pianificare e attuare una revisione dei modelli organizzativi regionali delle strutture trasfusionali, finalizzata ad incrementare il livello di qualità e standardizzazione dei prodotti e delle prestazioni e ad ottimizzare il grado di sostenibilità ed efficienza del sistema; v) progettare e attuare nuovi modelli regionali e interregionali per la gestione del percorso finalizzato alla produzione di medicinali emoderivati da plasma nazionale; f) progettare e attuare metodi e strumenti innovativi per affermare l'appropriatezza nella gestione della risorsa sangue (organizzativa e clinica).

**Centro nazionale  
Sostanze chimiche**

---

**Attività di ricerca**



### **Valutazione dei dossier relativi ai principi attivi i composti di ammonio quaternario – ADBAS**

Ai fini dell'inclusione in All. I alla Direttiva 98/8/EU vengono valutati a seguito di una convenzione con il ministero della salute i composti di ammonio quaternario.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati della valutazione vengono discussi in forum europeo (*Technical meetings*) e all'interno delle riunioni delle autorità competenti.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Inclusione della sostanza attiva in Allegato I.

### **Valutazione Dossier europei relativi alle sostanze biocide: DDAC-BKC- BARDAP 26- ADBAC- DDAC- PAP- CHLORINE- SODIUM HYPOCLORITE- CALCIUM HYPOCLORITE**

Ai fini dell'inclusione in Allegato I alla Direttiva 98/8/EU vengono valutati a seguito di una convenzione con il Ministero della Salute le sostanze DDAC-BKC- BARDAP 26- ADBAC- DDAC- PAP- CHLORINE- SODIUM HYPOCLORITE- CALCIUM HYPOCLORITE.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati della valutazione vengono discussi in forum europeo (*Technical meetings*) e all'interno delle riunioni delle autorità competenti.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Inclusione della sostanza attiva in Allegato I.

### **Applicazione della normativa comunitaria e nazionale sulle sostanze chimiche e preparati-Regolamento Reach.**

L'implementazione del regolamento 1907/2006 (Reach) richiede per ogni Stato membro la creazione di un sistema di gestione del rischio connesso alla produzione e all'uso delle sostanze chimiche attraverso i requisiti stessi del Reach: registrazione delle sostanze prodotte e/o importate nell'UE in quantità superiori a 1 ton/anno; valutazione della sicurezza di tutte le sostanze prodotte e/o importate in quantità superiori a 10 ton/anno da parte dell'industria; valutazione da parte degli Stati membri delle sostanze prioritarie in termini di rischio per l'uomo e per l'ambiente; autorizzazione delle sostanze che destano preoccupazione per usi specifici e controllati; sistema di restrizioni e divieti d'uso; accesso al pubblico alle informazioni sulle sostanze.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Supporto ai compiti dell'Autorità competente nazionale per la definizione e il funzionamento del sistema unico di gestione del Reach per le attività relative a:

- valutazione dei rapporti sulla sicurezza chimica;
- segreteria del comitato tecnico di coordinamento istituito presso il Ministero del Lavoro;
- redazione di risposte ai quesiti posti da consumatori e industria in materia di Reach;
- partecipazione a incontri nazionali e internazionali con associazioni di categoria e ai comitati dell'Agenzia ECHA;
- accordo Stato-Regioni per la vigilanza sugli articoli prodotti e importati in Italia;
- stesura di un piano nazionale di formazione per gli operatori della vigilanza regionale;

- tutti gli aspetti di gestione delle comunicazioni tra le componenti dell'autorità competente e con l'agenzia ECHA e la CE.

**Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- linee guida per la vigilanza ad uso dell'autorità centrale e degli organi periferici;
- formazione degli esperti nazionali per la valutazione delle sostanze chimiche;
- acquisizione di contratti con ECHA per la valutazione delle sostanze chimiche preoccupanti e prioritarie.

**Monitoraggio dei contenuti dei prodotti del Tabacco**

Il Ministero della Salute è l'organo incaricato di ricevere, ai sensi della Direttiva 2001/37/CEE una relazione contenente informazioni quali-quantitative e tossicologiche sugli ingredienti dei prodotti del tabacco. Tali informazioni devono annualmente essere comunicate dal Ministero della Salute alla CE. I dati forniti devono necessariamente essere acquisiti in formato elettronico per consentire la loro elaborazione.

**Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- creazione di una banca dati degli ingredienti dei prodotti del tabacco con la suddivisione per classi di prodotto contenente tutte le informazioni ricevute da Ministero della Salute;
- inserimento e indicizzazione dei dati per renderli fruibili alle autorità competenti e al pubblico;
- ottimizzazione e miglioramento delle modalità di trasmissione dei dati da parte delle aziende produttrici;
- predisposizione del rapporto annuale da inviare alla UE.

**Trasferibilità dei risultati**

Controllo e verifica dei prodotti sul mercato ai fini della salvaguardia della salute pubblica.

**Sviluppo e implementazione di metodi validati e/o alternativi per la determinazione delle caratteristiche fisico-chimiche e della potenziale attività geno/tossicologica di nanomateriali rilevanti per applicazioni industriali**

Ai fini dell'applicazione del regolamento Reach è necessaria l'esatta identificazione delle sostanze chimiche mediante la determinazione di alcuni parametri quali nome, grado di purezza, identità delle impurezze struttura molecolare. Per la registrazione di sostanze in forma nanometrica è fondamentale stabilire se una sostanza deve essere registrata in forma *bulk* oppure se debba essere registrata separatamente come costanza prodotta esclusivamente in forma nano.

**Risultati attesi nel triennio**

Acquisizione dei dati utili allo sviluppo e alla trasferibilità di metodi *in vitro* validati o in corso di validazione per soddisfare i requisiti richiesti dai Regolamenti Reach e CLP (*Classification, Labelling and Packaging*) relativi ad applicazione e uso delle sostanze in nanoforma.

Tra i risultati attesi:

- fornire un contributo per la messa a punto di linee guida specifiche per i nanomateriali da proporre al gruppo *Competent Authority Subgroup on Nanomaterials* (CASG Nano) dell'UE;

- inserire i risultati sperimentali ottenuti applicando i metodi citati in un database per consentirne la discussione critica e la valutazione ai fini del Regolamento Reach.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- ditte produttrici e importatrici di prodotti in nanoforma ai fini dello studio dei materiali prodotti;
- autorità competenti centrali e periferiche ai fini del controllo e della vigilanza sui materiali in nanoforma;
- pubblicazione dei risultati ottenuti.

#### **Alternative non-testing methods assessed for REACH Substances (Life08 ENV/IT/000435)**

Negli allegati III, VI, VII-X e XI del regolamento Reach vengono citati i *non-testing method* (NTM) ed è richiesto che si facciano degli sforzi per evitare l'utilizzo di animali nei test; tuttavia non sono specificati quali siano i metodi che possono essere utilizzati.

Nell'ambito del progetto verrà prodotto un protocollo per la valutazione degli NTM per il Reach, verranno identificati i limiti di applicabilità e gli indici di sicurezza da considerare per i vari modelli, verrà prodotta una lista di banche dati con dati utilizzabili per il Reach e una lista di laboratori con le capacità di produrre test comuni (anche con animali) sempre per il Reach.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il principale risultato di questo progetto consiste nel produrre una lista di test adatti al Reach per colmare questo vuoto di conoscenza.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Obiettivo finale è assicurare un'adeguata comunicazione e trasmissione dei risultati e promuovere i non-testing methods per scopi legislativi.

#### **Archivio preparati pericolosi (APP)**

Miglioramento tecnico-informatico:

- Modifica del campo password con inserimento di password rinnovabile per maggiore riservatezza/sicurezza.
- Codifica degli usi ai fini di una possibile armonizzazione europea.
- Possibile messa in evidenza delle sostanze coincidenti a quelle riportate in etichetta ai fini di una eventuale segnalazione delle sostanze con limitazioni d'uso e/o restrizioni.
- Possibile inserimento del campo "quantità prodotte/anno".

Azioni da intraprendersi:

- Definizione di un possibile link automatico ad una banca dati in materia di classificazione per l'aggiornamento dei dati già contenuti nel database.
- Definizione di un ipotesi di decreto che definisca:
  - i CAV accreditati all'utenza;
  - una eventuale tariffa/notifica da attribuirsi al CSC per l'attività APP.
- Definizione di un tavolo di lavoro che preveda riunioni periodiche.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Per dare seguito a quanto proposto si prevede l'emanazione di un DL.vo esplicativo sulla materia.

### **Attivazione di un Centro di competenza sul rischio sanitario nelle emergenze ambientali**

Valutazione nelle emergenze ambientali e studio dei principali indicatori sanitari in aree specificatamente interessate alla attuale situazione di crisi o caratterizzate dalla presenza di nuovi impianti di incenerimento dei rifiuti solidi urbani.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Unità operativa CSC:

- valutazione della presenza nelle emissioni vulcaniche di sostanze come l'idrogeno solfuro e il carbonio diossido in relazione ai loro effetti nocivi per la salute umana.
- ricerca su basi fattuali e bibliografiche per integrare e aggiornare le informazioni già disponibili sulle sostanze di interesse con un quadro completo sulle loro proprietà e sugli effetti tossici.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- supporto per l'applicazione di attività di bonifica delle aree interessate;
- supporto alla protezione civile e alle autorità locali per l'individuazione delle problematiche di carattere sanitario e ambientale;
- pubblicazione dei risultati delle indagini effettuate.

### **Messa a punto di criteri per la valutazione di particolari categorie di prodotti biocidi, incluse nell'allegato IV del DL.vo 174/2000**

All'interno di specifiche categorie di prodotti biocidi, l'attività rivolta in particolare alla descrizione e valutazione dell'efficacia richiede la competenza di particolari e peculiari aspetti spesso non così diffusi.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Definizione e formazione di esperti in materia di efficacia per particolari categorie di prodotti biocidi.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Inclusione della sostanza attiva in Allegato I.

### **Rapporti di valutazione sul principio attivo TETRAKIS (idrossimetil) fosfonio solfato (THPS) per i PT 2-6-11-12**

Ai fini dell'inclusione in Allegato I alla Direttiva 98/8/EU vengono valutati a seguito di una convenzione con il Ministero della Salute il principio attivo TETRAKIS (idrossimetil) fosfonio solfato (THPS) per i PT 2-6-11-12.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati della valutazione vengono discussi in forum europeo (*Technical meetings*) e all'interno delle riunioni delle autorità competenti prima della votazione comunitaria finale ai fini dell'inclusione in Allegato I alla Direttiva 98/8/EU.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Inclusione della sostanza attiva in Allegato I.

### **Revisione della banca dati delle schede di sicurezza**

Il Regolamento 1907/2006 (REACH) richiede un flusso di informazione lungo tutta la catena di approvvigionamento dal produttore o importatore delle sostanze chimiche fino

all'utente a valle. La circolazione delle informazioni lungo la catena di approvvigionamento, è finalizzata a migliorare la gestione dei rischi e l'osservanza della normativa comunitaria in vigore. Lo strumento di comunicazione per assicurare tale circolazione è rappresentato dalla scheda dati di sicurezza per le sostanze e le miscele (SDS) che, introdotta con la Direttiva 91/155 e successivamente emendata dalla Direttiva 2001/58/CE, è stata integrata nel Regolamento REACH. Il recente Regolamento 453/2010 ha modificato l'allegato II del regolamento 1907/2006 al fine di adeguarlo ai criteri di classificazione previsti dal regolamento CLP e alle norme relative alle SDS del *Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals* (GHS). A partire dal 2009, il Ministero della Salute ha proposto sul proprio sito una banca dati di schede di dati di sicurezza (SDS) di sostanze chimiche come supporto per tutti gli attori che hanno l'obbligo di trasmettere al destinatario della sostanza una SDS a norma dell'allegato II del regolamento REACH. Scopo di questo progetto è quello di uniformare ed elevare la qualità delle SDS e fornire un punto di riferimento per l'attività di vigilanza.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il presente progetto intende valutare la qualità delle schede di sicurezza contenute nella banca dati di modelli di schede di sicurezza presenti sul sito del Ministero della Salute e procedere al loro aggiornamento.

Le SDS verranno esaminate e aggiornate sulla base delle informazioni scientifiche più recenti e in relazione a quanto richiesto dal Regolamento 453/2010.

Valutare e integrare l'infrastruttura informatica dell'ISS e mantenere, ottimizzare e implementare la gestione informatica della banca dati delle schede di sicurezza.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Trasferimento di strumenti di valutazione alle autorità regionali preposte all'attività di vigilanza, quali *check-list* per la valutazione di aspetti di carattere generale e dei contenuti scientifici in relazione alle 63 voci richieste dalle disposizioni europee.

### **Cooperation Agreement on the validation of Reach related and other technical translations**

Revisione della versione italiana delle linee guida e di altra documentazione inerente al Regolamento Reach.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Verifica della traduzione dall'inglese all'italiano dei documenti, su richiesta dell'agenzia ECHA, con particolare riguardo al corretto uso della terminologia inerente al regolamento Reach nel rispetto della uniformità dei termini e tenendo presente il glossario pubblicato dall'ECHA.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Disponibilità delle linee guida in italiano per:

- gli organismi ufficiali di controllo;
- l'Industria;
- gli enti privati interessati.

### **Studio comparativo per la caratterizzazione del contenuto di idrocarburi policiclici aromatici (IPA) negli pneumatici**

Definizione di una tabella di correlazione tra il contenuto di IPA nell'olio diluente utilizzato nella miscela per la fabbricazione dello pneumatico e il contenuto di IPA nel

prodotto finale, pneumatico. Definizione delle metodiche da utilizzare per il campionamento delle diverse parti del prodotto pneumatico.

Standardizzazione dei metodi di analisi degli oli diluenti e dei prodotti attraverso due tecniche di rilevamento strumentale: gascromatografia ad alta risoluzione abbinata alla spettrometria di massa a bassa risoluzione HRGC-LRMS (*High-Resolution Gas Chromatography - Low Resolution Mass Spectrometry*) e cromatografia liquida con rilevamento a fluorescenza HPLC-FL (*High Performance Liquid Chromatography - Fluorescence*).

Applicazione delle metodiche analitiche e validazione interlaboratorio.

Applicazione del metodo ISO 21461 sui campioni di pneumatico con analisi NMR.

### **Risultati attesi nel triennio**

Messa a punto di metodi analitici sugli oli diluenti e sugli pneumatici. Validazione del metodo di analisi HRGC-LRMS e del metodo HPLC-FL per la determinazione degli IPA negli pneumatici. Verifica dell'applicabilità dei metodi HRGC-LRMS e del metodo HPLC-FL alla determinazione degli IPA negli oli e relativa validazione (estensione del metodo). Confronto intra e interlaboratorio dei metodi di prova per gli pneumatici e gli oli. Esecuzione delle analisi sulle diverse tipologie di campioni. Valutazione e approfondimento dei risultati.

In particolare questo progetto produrrà:

- una metodica di campionamento degli oli diluenti e degli pneumatici;
- una metodica per l'analisi degli oli diluenti e degli pneumatici con tecnica HRGC-LRMS;
- una metodica per l'analisi degli oli diluenti e dei pneumatici con tecnica HPLC-FL.

Realizzazione delle tabelle comparative con i dati ottenuti dalle diverse tipologie di materie prime nonché con le diverse tecniche analitiche.

Definizione di una tabella di correlazione tra il contenuto di IPA nell'olio diluente utilizzato nella miscela per la fabbricazione del pneumatico e il contenuto di IPA nel prodotto finale, pneumatico.

Definizione delle metodiche da utilizzare per il campionamento delle diverse parti del prodotto pneumatico.

### **Trasferibilità dei risultati**

La raccolta e l'approfondimento delle conoscenze sugli oli diluenti e sugli pneumatici nonché acquisizione della specializzazione nel settore.

Si avrà disponibile una metodica di campionamento degli oli diluenti e degli pneumatici; una metodica per l'analisi degli oli diluenti e degli pneumatici con tecnica HRGC-LRMS, una metodica per l'analisi degli oli diluenti e degli pneumatici con tecnica HPLC-FL.

La possibilità di realizzare tabelle comparative con i dati ottenuti dalle diverse tipologie di materie prime nonché con le diverse tecniche analitiche.

## **Studio per la valutazione del rischio chimico correlato alla contaminazione ambientale derivante dall'escrezione dei farmaci ad uso umano e veterinario**

L'utilizzo di farmaci ad uso umano e veterinario può costituire una rilevante fonte di contaminazione della catena alimentare.

Il progetto è finalizzato ad esplorare le possibili vie di contaminazione alimentare dei metaboliti dei principali farmaci utilizzati a livello nazionale (es. pillole contraccettive e antibiotici) e a stimare quantitativamente l'esposizione umana a tali sostanze a causa della contaminazione dei diversi comparti ambientali e in particolare il comparto acquatico.

A tal fine si ritiene necessaria la collaborazione degli enti preposti per reperire le informazioni relative al consumo specifico dei farmaci selezionati.

È prevista infine una caratterizzazione del rischio specifica a livello locale.

Il progetto prevede le seguenti fasi:

- selezione di farmaci di maggiore utilizzo a livello nazionale;
- valutazione del metabolismo;
- definizione di scenari di esposizione in considerazione della potenziale contaminazione della catena alimentare;
- caratterizzazione del rischio per la popolazione generale.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto è mirato alla verifica delle seguenti ipotesi:

- Il farmaco non metabolizzato viene escreto con e attraverso la rete fognaria raggiunge i fiumi e da qui le falde acquifere e il mare.
- Attualmente la qualità dell'acqua potabile è controllata attraverso indagini cromatografiche strumentali che sono mirate a definiti xenobiotici tra i quali non sono compresi gli ormoni e solo parzialmente gli antibiotici.
- I prodotti vegetali per il consumo umano e per gli alimenti per il bestiame potrebbero contenere sostanze presenti nei terreni tramite le falde acquifere o nel secondo caso tramite farine derivate da pesci a loro volta contaminati in quanto vissuti in bacini marini che raccolgono liquami non trattati adeguatamente dai depuratori comunali.
- Valutazione del rischio per la popolazione generale.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La trasferibilità dei risultati prodotti sarà attuata attraverso la loro disseminazione mediante l'organizzazione di seminari e convegni anche per le autorità di controllo e attraverso la promozione in ambito nazionale ed europeo dell'adozione di appropriate misure di gestione del rischio.

### **Sviluppo di nuovi modelli di valutazione del rischio associato a esposizione multipla a sostanze chimiche contaminanti**

Le varie fasi del ciclo di vita delle sostanze chimiche possono essere associate a significativi livelli di esposizione per diverse figure professionali e per la popolazione generale. La contemporanea esposizione a molteplici contaminanti con simili meccanismi di azione e/o con possibili effetti sinergici viene solitamente sottovalutata nelle procedure di valutazione del rischio previste dalla normativa comunitaria (es. Reach, Direttiva Biocidi, ecc.).

In analogia a quanto ampiamente definito nei protocolli di valutazione degli effetti sinergici tra farmaci destinati a terapie pluridisciplinari, occorrerebbe definire protocolli simili per sostanze che per la loro natura coesistono nei comparti ambientali e di cui poco si conosce sul destino finale.

Il progetto prevede di esplorare specifici scenari relativi alla possibile esposizione multipla a sostanze chimiche in ambito professionale e per la popolazione con l'obiettivo di proporre livelli di esposizione sicuri per le singole sostanze e di promuovere in ambito europeo l'adattamento delle attuali procedure di valutazione del rischio a tale eventualità di esposizione.

Il progetto prevede le seguenti fasi:

- Selezione di sostanze con effetti potenzialmente additivi e/ sinergici.
- Definizione di scenari di esposizione multipla con controllo adeguato del rischio.

### **Risultati attesi nel triennio**

Accrescere la consapevolezza che le attuali misure di gestione del rischio per le singole sostanze potrebbero non essere sufficienti in caso di esposizione multipla a contaminanti con simili meccanismi d'azione o con possibili effetti sinergici.

Sviluppo di una procedura valutativa decisionale per adattare le misure di gestione del rischio sanitario agli scenari di esposizione multipla.

Proporre livelli di esposizione sicuri in base all'integrazione degli scenari di esposizione relativi alle singole sostanze.

Definizione di scenari di esposizione multipla potenzialmente a rischio.

Integrazione della ricerca con quelle già in atto in ambito europeo.

### **Trasferibilità dei risultati**

La trasferibilità dei risultati prodotti sarà attuata attraverso la loro disseminazione mediante l'organizzazione di seminari e convegni e attraverso la promozione in ambito europeo di un adattamento delle attuali procedure di valutazione del rischio delle singole sostanze al fine di contemplare anche le loro possibili interazioni.

## **Sviluppo di tecniche innovative (OMICS) e impiego di tecniche analitiche classiche per l'individuazione rispettivamente di biomarcatori e di residui di trattamenti illeciti di bovini destinati all'alimentazione umana**

I trattamenti con sostanze ad effetto anabolizzante possono influenzare l'intero equilibrio dell'animale, agendo sia sul bilancio energetico che sul profilo ormonale. Tali trattamenti determinano infatti l'alterazione dei livelli dei corticosteroidi endogeni e degli ormoni proteici (LH, GH) così come la somministrazione di ormoni proteici e steroidei altera i livelli dei corticosteroidi endogeni. L'attività di ricerca pertanto è finalizzata allo studio dei profili degli ormoni proteici e degli ormoni steroidei in bovini allevati in condizioni controllate e dopo trattamento, per l'individuazione di nuovi indicatori di trattamento illecito che consentano di discriminare un animale trattato da uno non trattato. Tale obiettivo sarà raggiunto attraverso:

- lo sviluppo e la validazione di metodi di analisi in LC-MS/MS per lo studio di ormoni steroidei, naturali e di sintesi, e proteici in fluidi biologici e tessuti edibili di bovino;
- lo sviluppo e la validazione di metodi di screening (ELISA) per la determinazione degli ormoni proteici anche mediante confronto con il metodo di riferimento LC-MS/MS.

### **Risultati attesi nel triennio**

Valutazione dei profili di escrezione degli ormoni proteici e degli ormoni steroidei naturali e di sintesi e dei loro metaboliti.

Sviluppo di metodi di conferma in LC-MS/MS e di metodi di screening (ELISA) che prevedano l'utilizzo di matrici target al fine di evidenziare differenze nei profili ormonali tra animali trattati e non con sostanze ad effetto anabolizzante.

### **Trasferibilità dei risultati**

Consolidamento delle banche dati e delle informazioni per una più efficace azione di prevenzione e monitoraggio dell'uso di sostanze ad effetto anabolizzante.

## **Sviluppo di un sistema di coordinamento delle attività di comunicazione del rischio chimico alla popolazione scolastica**

Il Regolamento Reach, fondamento legislativo sui criteri per garantire la sicurezza d'uso delle sostanze chimiche, dei prodotti e articoli che le contengono e che non sono

regolamentati da altre specifiche normative, prevede che le istituzioni dei vari Stati membri abbiano un ruolo attivo nell'informazione al pubblico relativamente ai rischi correlati alle sostanze e al tempo stesso garantiscano l'armonizzazione degli strumenti di comunicazione del rischio chimico ai fini della protezione della salute umana e della tutela dell'ambiente. Il progetto prevede la partecipazione alle attività del *Risk Communication Network* dell'ECHA e alle attività di comunicazione, informazione e formazione con il coinvolgimento del Comitato di coordinamento interregionale sul Reach e dell'Autorità competente.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Sviluppare un protocollo di coordinamento a livello nazionale delle attività di comunicazione del rischio chimico alla popolazione finalizzate al miglioramento della comunicazione stessa e della percezione del pericolo e del rischio chimico da parte della popolazione scolastica.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Modello di intervento informativo-comunicativo per il miglioramento della comunicazione del rischio chimico.

### **Sviluppo e implementazione di una piattaforma online quale supporto informatico alla raccolta di dati e informazioni relativamente ai nanomateriali fabbricati, importati e utilizzati in Italia**

La valutazione del rischio dei nanomateriali presenta varie lacune dovute alla mancanza di metodi di campionamento e di analisi quali-quantitative di test standardizzati di conoscenza del ciclo di vita delle sostanze in nanoforma. Il monitoraggio dell'esposizione ai nanomateriali in Europa non è attualmente eseguibile.

Ai benefici riconosciuti ai nanomateriali impiegati attualmente in molti prodotti di consumo sono associati i rischi potenziali per la salute umana e per l'ambiente, dovuti alle loro proprietà chimico-fisiche. Tali rischi non sono stati ad oggi sufficientemente investigati e si rende necessaria una conoscenza di base delle proprietà intrinseche delle forme nano che spesso è legata alle caratteristiche specifiche di un determinato materiale spesso ancora in fase di sviluppo o prodotto in piccola scala volumetrica.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- tracciabilità delle sostanze in nanoforma mediante la verifica del processo di fabbricazione, utilizzo e smaltimento di un determinato nanomateriale, con l'identificazione degli operatori economici implicati nei vari processi;
- identificazione dei rischi connessi a produzione, uso e smaltimento dei materiali citati e l'individuazione delle misure di gestione del rischio che si rendono necessarie;
- costruzione di una piattaforma informatica per supportare la raccolta di dati e informazioni relative ai nanomateriali fabbricati da sottoporre a test mediante versione pilota;
- gestione ed elaborazione dei dati e produzione di rapporti.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Tra i risultati:

- ditte produttrici e importatrici di prodotti in nanoforma ai fini della registrazione Reach e della classificazione CLP;
- autorità competenti centrali e periferiche ai fini del controllo e della vigilanza.

### **TAIEX - assistenza alla comunità turco-cipriota in materia di legislazione comunitaria relativa ai prodotti fitosanitari**

Preparazione di testi giuridici in linea con l'*acquis* comunitario in materia di fitofarmaci affinché questi siano immediatamente applicabili alla data di entrata in vigore di una soluzione globale del problema di Cipro.

Preparazione per l'attuazione dell'*acquis* comunitario in vista della possibile annessione in Europa.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi sono:

- assistenza per facilitare la riunificazione di Cipro;
- promozione dello sviluppo economico della comunità turco-cipriota con particolare attenzione per l'integrazione economica dell'isola, sul miglioramento dei contatti tra le due comunità e con l'UE, e sulla preparazione per l'*acquis communautaire*.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Trasferimento delle informazioni comunitarie in materia di legislazione su sostanze e preparati fitosanitari.

### **Valutazione dei dossier relativi alle due sostanze biocide: Diclorvos e Triflumeron**

Ai fini dell'inclusione in Allegato I alla Direttiva 98/8/EU vengono valutati a seguito di una convenzione con il Ministero della Salute le sostanze Diclorvos e Triflumeron.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati della valutazione vengono discussi in forum europeo (Technical meeting) e all'interno delle riunioni delle autorità competenti.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Inclusione della sostanza attiva in Allegato I.

### **Valutazione dei dossier relativi a sostanze biocide – IV Lista**

Ai fini dell'inclusione in Allegato I alla Direttiva 98/8/EU vengono valutati a seguito di una convenzione con il Ministero della Salute le sostanze assegnate all'Italia per la IV lista di priorità.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati della valutazione vengono discussi in forum europeo (*Technical meeting*) e all'interno delle riunioni delle autorità competenti prima della votazione comunitaria finale ai fini dell'inclusione in Allegato I alla Direttiva 98/8/EU.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Inclusione della sostanza attiva in Allegato I.

**Centro nazionale  
Sostanze chimiche**

---

**Attività di controllo, valutazione, parere**



### **Aggiornamenti di normative (OECD e UE)**

Il CSC partecipa con propri rappresentanti alle attività di aggiornamento e adeguamento tecnico di diverse normative comunitarie sui prodotti chimici quali il regolamento Reach, regolamento CLP in materia di classificazione ed etichettatura sostanze e miscele, e direttiva biocidi e partecipa alla definizione e aggiornamenti delle linee guida OECD.

Partecipa inoltre alle attività di aggiornamento del Sistema globale di classificazione ed etichettatura GHS presso le Nazioni Unite.

D'intesa con il corrispondente gruppo OECD, il CSC partecipa alle attività di coordinamento nazionale per l'aggiornamento dei metodi di prova ufficiali, utilizzabili per la produzione di dati sulle proprietà fisico-chimiche, tossicologiche ed ecotossicologiche delle sostanze chimiche, attualmente incluse nel regolamento della Commissione 440/2008/CE.

#### **Attività programmata**

Le attività per il prossimo triennio riguardano: adeguamento del Regolamento Reach con inserimento di sostanze altamente preoccupanti fra quelle oggetto di specifica autorizzazione; identificazione di nuove sostanze oggetto di restrizioni e revisione di Linee Guida ECHA; terzo adeguamento del Regolamento CLP con inclusione delle classificazioni armonizzate aggiornate comprese le sostanze fitosanitarie e biocidi. Partecipazione all'attività di inclusione delle sostanze attive biocide nell'Allegato I Direttiva 98/8/CE, e al processo di revisione della direttiva stessa. Aggiornamento dei metodi di saggio Reach in base alla recente modifica dei criteri di classificazione delle sostanze e delle miscele, per l'adeguamento del Regolamento 440/08 sui metodi di saggio per la determinazione delle proprietà chimico fisiche, tossicologiche ed ecotossicologiche delle sostanze chimiche da sottoporre a sperimentazione ai fini Reach e CLP. Proseguiranno i lavori per l'attuazione della Direttiva 128/09 sui pesticidi e del Regolamento 1107/09 sulla commercializzazione di fitosanitari. Sono programmate attività di valutazione di sostanze in ambito OECD *Cooperative Chemicals Assessment Meeting* (COCAM) e partecipazione alla Task Force sulla valutazione dell'esposizione e ai gruppi di lavoro Nazioni Unite per l'aggiornamento del Sistema globale di classificazione ed etichettatura GHS sui criteri di classificazione chimico-fisici, tossicologici ed ecotossicologici delle sostanze e miscele.

### **Attività di valutazione per la registrazione dei prodotti biocidi, presidi medico chirurgici e prodotti fitosanitari**

Il CSC sulla base di Convenzioni stipulate con il Ministero della Salute ha il compito di valutare i dati forniti dalle imprese ai fini dell'autorizzazione di prodotti biocidi, presidi medico chirurgici e fitosanitari.

Partecipa con propri rappresentanti alle attività della Commissione Biocidi, della Commissione Consultiva Fitofarmaci, in particolare per quanto riguarda la classificazione di pericolo delle sostanze attive e dei formulati, nonché su altri argomenti più specifici e alle attività di controllo e valutazione previste dal Regolamento CLP in materia di classificazione, etichettatura e imballaggio delle sostanze.

#### **Attività programmata**

Nel prossimo triennio l'attività sarà rifocalizzata in funzione dell'entrata in vigore della nuova regolamentazione comunitaria sui prodotti fitosanitari, sui biocidi e sui PMC. È previsto il prosieguo dell'attività di valutazione in materia di autorizzazione dei prodotti biocidi che porterà alla valutazione di circa 400 fascicoli/anno tra prime autorizzazioni e mutui riconoscimenti, secondo il calendario previsto dall'inclusione delle sostanze attive in Allegato I della Direttiva 98/8/UE. Per tale attività di valutazione si prevede un aumento delle tariffe, con allineamento a quelle previste dagli altri Stati membri.

Il CSC sarà coinvolto inoltre nell'attività comunitaria prevista dal nuovo regolamento biocidi in attuazione dal settembre 2013, e che prevede il trasferimento della competenza dalla Commissione europea all'ECHA. Anche detta attività verrà svolta all'interno di una convenzione quadro con il Ministero della Salute che prevede specifiche tariffe per le diverse valutazioni.

In materia di PMC continuerà l'attività di valutazione dei prodotti sulla base della documentazione fornita dalle imprese secondo le modalità già in essere dei servizi resi a terzi dall'ISS.

In materia di fitosanitari continuerà l'attività valutativa a supporto della Commissione Consultiva per i Prodotti Fitosanitari (CCPF).

### **Attività ispettiva**

Il CSC è coinvolto in attività ispettive ai fini della vigilanza su incarico dell'autorità centrale (Ministero della Salute) concentrando la propria azione sull'applicazione delle normative sulla classificazione/etichettatura, sulle schede di sicurezza, sull'applicazione della procedura di notifica per le nuove sostanze chimiche.

Svolge attività per la verifica della conformità dei centri di saggio sui test non clinici in regime di buona pratica di laboratorio, condizione essenziale per l'accettabilità dei dati prodotti (ispezioni per la verifica di conformità ai principi di Buona Pratica di Laboratorio, DL.vo 120/92 e successive modifiche).

Svolge audit per la verifica di conformità alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 dei laboratori di prova su incarico dell'Organismo nazionale di Accreditamento nell'ambito della Convenzione ACCREDIA ISS del 14/2/2011.

#### **Attività programmata**

Nel prossimo triennio si prevedono attività ispettive per la verifica della conformità ai Regolamenti Reach e CLP con le autorità competenti nazionali e regionali.

Le ispezioni riguarderanno anche la vigilanza sulle sostanze e preparati pericolosi e le attività ispettive congiunte con altri Stati membri.

L'attività ispettiva riguarderà anche la conformità dei centri di saggio alle BPL in base alla revisione dei metodi di prova e ai nuovi criteri di classificazione.

Gli esperti qualificati del CSC saranno inoltre coinvolti nelle attività di audit per ACCREDIA ai fini della verifica della conformità ai criteri della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 dei laboratori di prova.

### **Pareri per i Ministeri, NAS, e sistema di Allerta RAPEX**

Il CSC è chiamato ad esprimere pareri in materia di esposizione e caratterizzazione del rischio, pericolosità di preparati, miscele e articoli e conformità alle disposizioni vigenti in materia di Reach, CLP, (etichettature e classificazione dei pericoli, ecc.), codice del consumo, disposizioni in materia di sicurezza su richiesta del Ministero della Salute, Ministero Ambiente, Carabinieri per la Salute e nell'ambito del Sistema di allerta RAPEX a livello nazionale ed europeo.

Svolge inoltre tali attività anche su richiesta delle Regioni e delle ASL, delle autorità giudiziarie, dei laboratori ufficiali di controllo e a seguito di interrogazioni parlamentari.

#### **Attività programmata**

Sulla base delle richieste pervenute si prevede un'attività di valutazione su sostanze e preparati pericolosi e non pericolosi e su articoli anche relativamente a necessità o emergenze nazionali e comunitarie.

## **Piano nazionale di Controllo Reach e CLP e supporto alle Regioni**

Il CSC in attuazione all'art. 10 dell'Accordo Stato, Regioni e Province autonome del 2009, è tenuto a supportare da un punto di vista tecnico-scientifico le Regioni, Province autonome e i laboratori di controllo (ARPA, Laboratori Sanità Pubblica – LSP) ai fini della vigilanza e del controllo, in particolare, ad individuare i pericoli e caratterizzare i rischi, fornire i metodi di prova, i criteri per il controllo delle sostanze, dei prodotti e articoli.

Il CSC, su specifica richiesta, è tenuto ad effettuare controlli analitici su prodotti non conformi a seguito dei campionamenti ufficiali da parte delle ASL o dei NAS o su richiesta delle autorità competenti.

### **Attività programmata**

Il CSC in base all'Accordo Stato-Regioni predisporrà annualmente, su richiesta delle Regioni e del Ministero della Salute, la proposta di Piano di Controllo Reach e CLP.

Per l'attuazione del Piano è previsto il supporto ai laboratori di controllo, quali ARPA e LSP – ASL, nella individuazione dei pericoli e rischi, nella definizione dei metodi di prova da adottare e dei criteri di controllo e nell'implementazione del Sistema di gestione per la qualità dei laboratori per le attività di controllo ufficiale sia dei laboratori nazionali sia della struttura di laboratorio del Centro. In tale ambito è prevista l'implementazione delle risorse necessarie per le attività analitiche.

Le diverse tipologie di prodotti previsti per il 2012 (detergenti, oli, materiali da costruzione, tessili) sono state concordate con le autorità centrali e regionali.

Su richiesta delle autorità competenti (Ministero, Allerta RAPEX, NAS) e delle imprese nell'ambito di contenziosi, il CSC dovrà effettuare controlli analitici o analisi di revisione.

## **Sostanze e preparati pericolosi**

Il CSC è il punto di riferimento nazionale per tutte le attività riguardanti la valutazione del pericolo e del rischio sulle sostanze e preparati pericolosi di utilizzo domestico e professionale. Il CSC gestisce tra l'altro alcune banche dati destinate al pubblico nonché una banca dati (Archivio Preparati Pericolosi) riservata ai Centri Antiveneni per la gestione delle intossicazioni acute. Nell'archivio preparati pericolosi devono essere registrati anche i prodotti non pericolosi quali i detergenti.

Il CSC esprime pareri su situazioni di rischio potenziale legate all'uso di sostanze chimiche, prodotti e articoli.

### **Attività programmata**

L'Archivio preparati pericolosi prosegue le proprie attività di valutazione e monitoraggio sulla conformità dei dati con le relative comunicazioni alle ditte interessate e l'allineamento ad un prossimo format europeo.

Sarà assicurata la partecipazione al tavolo di informazione e consultazione con le associazioni dei consumatori in materia di sostanze chimiche, come previsto dall'art. 123 del Regolamento (CE) n. 1907/2006 – Reach.

Si prevede una collaborazione con il Ministero dell'Ambiente per la condivisione delle informazioni sulla classificazione delle sostanze chimiche con il software per la gestione delle aziende a rischio rilevante “direttiva Seveso”.

## **Valutazione di sostanze attive biocide**

Il CSC coordina le attività dell'Istituto per l'elaborazione delle monografie relative alle sostanze attive biocide assegnate all'Italia in applicazione della direttiva 98/8/CE. L'attività viene svolta tramite convenzioni stipulate con il Ministero della Salute.

### **Attività programmata**

Nel prossimo triennio si prevede la conclusione dell'attività di revisione delle sostanze attive biocide da immettersi in commercio. Il CSC sarà quindi impegnato non solo nell'elaborazione delle monografie per le sostanze assegnate all'Italia, ma anche nell'attività di confronto con gli altri Stati membri a livello comunitario per la definizione delle condizioni per l'inserimento delle sostanze stesse in Allegato alla Direttiva. Si prevede un totale di 16 sostanze e 68 dossier.

Continuerà l'attività di valutazione dell'esposizione umana e ambientale e la caratterizzazione del rischio per le sostanze attive biocide anche attraverso la partecipazione alle attività del Gruppo di esperti sulla valutazione dell'esposizione alle sostanze ad attività biocida.

### **Valutazioni in materia di sicurezza alimentare, cosmetici, bonifiche e dispositivi medici**

Il CSC collabora con altre strutture dell'ISS e con il Ministero per la valutazione dell'esposizione e per la caratterizzazione del rischio correlato all'uso di sostanze e per la definizione di livelli raccomandati di sostanze in miscele, preparati, articoli, suolo ecc. di competenza di altre strutture dell'ISS quali cosmetici, sicurezza alimentare, dispositivi medici e bonifiche.

### **Attività programmata**

Gli esperti del CSC saranno impegnati in attività di valutazione per le altre strutture dell'ISS e del Ministero della Salute anche attraverso la partecipazione ai lavori del Comitato Nazionale per la Sicurezza Alimentare (CNSA) e del Gruppo di Lavoro "Metalli pesanti nei cosmetici" costituito dal Ministero della Salute e nell'attività di valutazione ai fini della certificazione dei dispositivi medici e della definizione di livelli raccomandati di sostanze non regolamentate in diverse matrici ambientali.

### **Valutazioni e supporto all'Agenzia europea ECHA e all'autorità competente nazionale Reach**

Il CSC, in base al DM 22/11/2007, ha il ruolo di interfaccia con l'Agenzia europea ECHA, in accordo con l'autorità competente, per la gestione dei dati ai fini della registrazione, delle autorizzazioni e restrizioni delle sostanze e in tale ambito:

- partecipa alle attività di sviluppo e gestione del sistema Reach-IT;
- partecipa alla formulazione delle proposte di inserimento delle sostanze prioritarie nel "Piano d'azione a rotazione" a livello europeo (CoRAP);
- gestisce la fase di transizione dall'attuale procedura di Notifica per le nuove sostanze chimiche alla registrazione prevista dal Regolamento Reach, supportando le imprese per l'aggiornamento delle informazioni scientifiche sulle sostanze;
- partecipa con propri esperti alle attività dei Comitati Tecnici dell'Agenzia europea ECHA per gli aspetti di valutazione del rischio per la salute umana e ai Comitati della Commissione europea;
- supporta l'Autorità competente Reach e CLP (Ministero della Salute) per tutte le attività tecnico-scientifiche in materia di tossicologia, ecotossicologia, stima dell'esposizione umana diretta e indiretta e di caratterizzazione del rischio previste dai due regolamenti e per tale scopo partecipa al Comitato Tecnico di Coordinamento (CTC) istituito con Decreto ministeriale del 22/11/2007.

**Attività programmata**

Il Centro sarà fortemente impegnato nel supportare l'Autorità nazionale competente Reach tramite la partecipazione al Comitato Tecnico di Coordinamento e ai relativi Gruppi di Lavoro e alle attività del Comitato europeo CARACAL (Autorità Competenti Reach e CLP). È pianificata una intensa attività di collaborazione con l'Agenzia ECHA e la partecipazione ai vari Comitati ECHA, nello specifico al Comitato degli Stati membri, al FORUM e ai vari sottogruppi, al *Risk Communication Network* e al RAC. Proseguiranno le attività per l'identificazione di sostanze estremamente pericolose (*Substance of Very High Concern*, SVHC) da sottoporre all'ECHA e la valutazione delle richieste di esenzione per sostanze destinate alla ricerca e sviluppo. È prevista la redazione di report di valutazione per la proposta di restrizioni, la valutazione delle *draft decision* dell'ECHA relativamente a *Compliance Check* (circa 30) e *Testing Proposal* (circa 60) per le sostanze registrate all'ECHA e la valutazione sulle proposte di sperimentazione e controlli di conformità. Si prevede la conclusione del dossier di proposta di classificazione armonizzata per la salute umana del metanolo. Saranno esaminate le valutazioni del pericolo per la salute umana effettuate dagli altri Stati membri per circa 30 sostanze. Saranno valutate tre sostanze assegnate all'Italia nell'ambito del Piano d'azione a rotazione triennale (CoRAP) (attività direttamente finanziata dall'ECHA).



**Centro nazionale  
Trapianti**

---

**Attività di ricerca**



## **Approccio integrato per la presa in carico delle gravi insufficienze d'organo**

Uno dei tratti più salienti del Piano nazionale della prevenzione è certamente legato all'evidenza con la quale è stato posto all'attenzione di tutti il tema della cronicità. Non vi è dubbio, infatti, che una delle sfide che oggi l'SSN deve affrontare è quella di (dover intercettare e) rispondere adeguatamente ad una domanda crescente di assistenza che si connota per alcuni elementi:

- lunga durata;
- necessità di essere erogata in ambiti molto diversi e secondo setting predefiniti;
- necessità, spesso, di essere supportata da adeguati servizi sociali.

In questo contesto di massima, particolare rilievo assumono le insufficienze d'organo che possono essere definite come l'incapacità (anatomica o funzionale) di un organo a svolgere le proprie funzioni in relazione alle esigenze fisiologiche dell'organismo.

Avuto conto che, secondo tale accezione, ogni organo o apparato del corpo umano può manifestare un'insufficienza nell'espressione della propria funzione, si segnala da subito che nel prosieguo del documento si prenderanno in considerazione esclusivamente l'insufficienza cardiaca, epatica e renale.

### **Risultati attesi nel triennio**

In una moderna visione organizzativa, l'approccio a tali patologie richiede la codifica di una rete di presa in carico sistematizzata volta a migliorare efficienza e qualità degli interventi, anche in relazione alle possibilità terapeutiche presenti e future.

Sulla scorta dell'esperienza condotta in altri settori assistenziali da alcune Regioni, il modello *hub & spoke* appare il più idoneo a fungere da riferimento per la costruzione della rete, avuto però conto che le specificità connaturate alle insufficienze di cuore, rene e polmone di per sé definiscono la necessità di ipotizzare singole filiere d'organo supportate da singole e dedicate reti di presa in carico.

Il modello *hub & spoke* si è dimostrato funzionare bene, allorché siano chiare e rispettate le relazioni, sia di tipo organizzativo che di tipo funzionale tra i nodi della rete. Condivisa l'architettura generale di sistema, le relazioni organizzative non possono che essere definite dalle Regioni all'interno della propria realtà sanitaria. Quelle funzionali, invece, vanno esplicitate attraverso appositi PDT che, per evitare disequità, non possono che essere comuni tra tutte le Regioni.

Tale atteggiamento si traduce, all'atto pratico, nell'iniziale implementazione di un progetto prototipale incentrato sulla filiera cuore, sulla base delle cui risultanze modulare l'impianto delle filiere fegato e rene.

### **Trasferibilità dei risultati**

Aumento della qualità e sicurezza dei trapianti.

## **Piano regionale sulle terapie avanzate**

La medicina rigenerativa ha per oggetto la cura delle lesioni d'organo o di tessuto attraverso una selettiva ricostituzione anatomica o funzionale della parte danneggiata ottenuta mediante la differenziazione, la proliferazione, e la ripresa funzionali di cellule staminali, specifici elementi cellulari, presenti nell'ambito della lesione o provenienti dall'esterno, tramite posizionamento *in situ*, o iniezione sistemica. Le cellule staminali che svolgono la funzione terapeutica, possono essere state oggetto di manipolazione esterna prima del trattamento, di associazione con devices artificiali o non avere subito alcuna manipolazione maggiore. Le stesse possono proliferare e/o differenziarsi prima o dopo il posizionamento, o essere indotte alla proliferazione e/o al differenziamento da *device*

artificiali introdotti *in loco*. Le cellule staminali possono agire anche mediante riattivazione funzionali di elementi cellulari differenziati, già presenti nella sede della lesione.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- identificare nell’ambito regionale o interregionale le strutture che utilizzano terapie avanzate con funzioni di carattere assistenziale o di ricerca
- costituire una rete funzionale tra tutte le strutture per garantire:
  - programmazione delle attività sul territorio regionale in base alle diverse tipologie terapeutiche e di ricerca;
  - rispetto dei requisiti di autorizzazione previsti dalle normative europee e nazionali;
  - eque modalità di accesso alle terapie assistenziali;
  - rispetto dei requisiti di qualità e sicurezza previsti dalle normative europee e nazionali;
  - valutazione dei risultati dei progetti di ricerca e dei programmi assistenziali.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Identificazione di un modello operativo per le singole Regioni.

### **Procedura operativa rischio infettivo: studio prospettico**

A seguito della decisione presa nella riunione del Tavolo Tecnico del giugno scorso è in corso la revisione delle linee guida di sicurezza per la valutazione di idoneità del potenziale donatore. In questo contesto uno dei problemi emergenti è costituito dallo sviluppo nei reparti di terapia intensiva di infezioni sostenute da batteri multi-o pan-resistenti. Epidemie nosocomiali sostenute da *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* o altri enterobatteri con profili di pan-resistenza, vengono infatti sempre più frequentemente riportate. Recentemente sono stati descritti casi di trasmissione con il trapianto d’organo di microrganismi multi- o pan-resistenti con gravi conseguenze per i riceventi.

Fatto salvo che la accertata presenza di infezioni sistemiche (batteriemie) o localizzate (polmoniti, infezioni delle vie urinarie, ecc.) sostenute da microrganismi con resistenza a tutti i farmaci antimicrobici disponibili costituisce criterio di esclusione assoluta dalla donazione, è opportuno rivolgere la massima attenzione nella valutazione di tale rischio nel potenziale donatore, effettuando contestualmente una raccolta prospettica di dati, per almeno sei mesi a partire dal 1/2/2012, che possa fornire una fotografia basata su dati oggettivi dell’attuale situazione in Italia.

La raccolta verrà coordinata dal CNT.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio risponde alle esigenze di sorveglianza e sicurezza nella donazione e trapianto che il CNT ha promosso nel 2011 anche a livello internazionale, in collaborazione con la WHO, con il progetto Notify. L’obiettivo della raccolta dati sarà la valutazione della presenza delle infezioni pan o multiresistenti nei potenziali donatori di organo.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Incremento della qualità e sicurezza nei trapianti.

### **Sicurezza ed efficacia dei protocolli di desensibilizzazione in uso in Italia**

Il trapianto d’organo rappresenta il trattamento di prima scelta per i malati con insufficienza d’organo terminale e, in quest’ambito, la soluzione ideale è rappresentata da un

organo proveniente da un donatore immunologicamente compatibile. Tuttavia, esistono diverse condizioni cliniche che possono rendere molto difficile l'accesso del malato a questo tipo di trattamento. In particolare, in Italia, il 20% dei malati in attesa di un trapianto di rene possiede anticorpi diretti contro gli antigeni di istocompatibilità (HLA) dei donatori potenziali rendendo difficile la ricerca di un organo immunologicamente compatibile. Questi malati sono detti "sensibilizzati" e attenderanno un organo per un periodo di tempo più lungo rispetto ai malati che non possiedono anticorpi anti-HLA [1,2,3]. Inoltre, circa la metà dei pazienti sensibilizzati presenta anticorpi anti-HLA diretti contro l'80% dei donatori potenziali della popolazione generale (malati con PRA $\geq$ 80%). Questi malati detti "iperimmunizzati" presentano delle chance di trapiantabilità molto basse.

#### **Risultati attesi nel triennio**

La ricerca in oggetto si propone pertanto di monitorare nel tempo gli aspetti di efficacia e di sicurezza nel malato iperimmunizzato (o con donatore vivente ABOi) trapiantato di rene. Al fine di ottenere informazioni significative ci si propone come obiettivo di condurre l'indagine su almeno 30 malati che verranno trattati con protocolli di desensibilizzazione. Un gruppo di almeno 30 malati in insufficienza renale con le medesime caratteristiche demografiche e cliniche servirà da popolazione di controllo. Lo studio sarà in parte retrospettivo e in parte prospettico su malati trapiantati sul territorio nazionale che potranno afferire a Centro trapianti appartenenti alla rete trapiantologica nazionale e rappresentanti tutti e tre i CIR

#### **Trasferibilità dei risultati**

Dall'indagine condotta ci si attende di poter ricavare delle informazioni sugli aspetti di biosicurezza dei protocolli di desensibilizzazione correntemente utilizzati nei Centri italiani che potranno fornire indicazioni importanti per una miglior gestione clinica del malato iperimmunizzato su tutto il territorio nazionale.

### **Strumenti per ottimizzare la sicurezza del trapianto e il numero dei donatori nelle rianimazioni italiane**

Il *procurement* e trapianto di organi e tessuti in Italia è notevolmente progredito in numero e in qualità dei risultati grazie alla creazione di una rete organizzata che opera con procedure e criteri condivisi; in particolare il coordinamento locale ha permesso una notevole facilitazione del processo di donazione, diventandone il perno operativo, ma costituendo anche il punto di riferimento nell'Ospedale per l'organizzazione e la cultura della donazione.

Il processo di valutazione del potenziale donatore coinvolge però in modo notevole tutto l'Ospedale e i suoi specialisti ma in particolare pesa sulla rianimazione e sui medici intensivisti, oltre che sul coordinatore. La complessità delle problematiche mediche richiede oggi una particolare preparazione tecnica in ambiti trasversali a diverse discipline classiche (infettivologia, oncologia, radiologia ecc.). Tale bagaglio culturale deve essere posseduto e utilizzato, almeno nelle sue linee essenziali, dagli operatori che direttamente valutano il potenziale donatore, coordinatori e intensivisti in particolare, anche al fine di poter assicurare un linguaggio comune e perseguire la massima qualità dell'intero processo. Questa "Medicina dei Trapianti" dovrà caratterizzare gli operatori che della donazione si occupano, in stretta correlazione con i Centri di Trapianto, i Centri Regionali e Interregionali e i medici che trattano il ricevente, affetto da una gravissima insufficienza d'organo, prima e dopo il trapianto.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- documentazione e analisi del carico di lavoro sostenuto oggi in Italia dai reparti di rianimazione, dai coordinamenti e dall'ospedale nel suo insieme, per la valutazione di idoneità in rapporto con l'età del potenziale donatore e il reale output in termini di donatori effettivi e organi utilizzati;
- monitoraggio delle situazioni problematiche e difficili, anche in assenza di eventi avversi, nell'ambito della valutazione di idoneità del potenziale donatore di organi e tessuti;
- promozione di organismi della rete nazionale e l'implementazione di un sistema esperto di supporto operativo e di comunicazione che migliori la sicurezza dell'attività di trapianto e renda omogeneo l'approccio alle situazioni problematiche, utilizzando le possibilità informatiche di consultazione e disseminazione on-line delle informazioni e delle raccomandazioni;
- definizione di contenuti e metodologia per la formazione *ad hoc* del personale delle rianimazioni e dei coordinamenti ospedalieri, Regionali e dei CIR.

**Centro nazionale  
Trapianti**

---

**Attività di controllo, valutazione, parere**



### **Controllo del processo di donazione e trapianto tramite SIT**

Il Sistema Informativo (SIT) del CNT è istituito dalla L. 91/99 e ha lo scopo di armonizzare le attività degli ospedali, l'emissione di regole comuni e condivise, la verifica del processo di donazione e trapianto, il controllo della qualità dei percorsi ospedalieri, il miglioramento della trasparenza e dell'informazione nei confronti del cittadino. Alcuni dei principali obiettivi del SIT sono:

- registrare e raccogliere le dichiarazioni di volontà di donazione di organi e tessuti da parte dei cittadini;
- raccogliere i dati relativi all'attività di prelievo e trapianto svolta sul territorio nazionale;
- raccogliere le liste di attesa standard e delle urgenze, gestire i programmi di trapianto a valenza nazionale, gestire il registro trapianti da vivente;
- permettere la condivisione di informazioni tra tutti i soggetti della "rete trapianti".

Obiettivi che si esplicano attraverso il monitoraggio:

- processo di donazione e trapianto;
- liste di attesa;
- dichiarazioni di volontà;
- programma nazionale pediatrico;
- programma nazionale intestino;
- programma nazionale iperimmuni;
- valutazione dell'outcome del trapianto.

#### **Attività programmata**

Nel triennio 2012-2014 sono previste le seguenti attività:

- Funzione "Qualità"  
Revisione della funzione per la raccolta dei follow-up dei trapianti. Si prevede un aggiornamento per le schede del rene, fegato e cuore e l'implementazione delle schede dei trapianti di pancreas, polmone e intestino.
- Lista unica  
Revisione della funzione per la raccolta delle liste di attesa. Adeguamento della scheda clinica e implementazione di protocolli SOAP (*Simple Object Access Protocol*) per la cooperazione applicativa tra il SIT e gli applicativi dei diversi gestori di lista.
- Messaggio del trapianto  
Revisione del messaggio del trapianto per renderlo compatibile alle modifiche eseguite alla funzione delle liste di attesa. Introduzione del concetto di centro competente sull'organo trapiantato.
- Algoritmo fegato pediatrico  
Modifica dell'algoritmo di fegato pediatrico sulla base delle indicazioni concordate con il gruppo di lavoro nazionale sul trapianto pediatrico.
- Eventi avversi  
Creazione di una funzione per la gestione degli eventi/reazioni avverse all'interno del SIT.
- Procreazione Medicalmente Assistita  
Sviluppo di un applicativo per la raccolta dei cicli di procreazione medicalmente assistita dai centri di PMA.

### **Controllo di qualità nazionale delle tecniche immunogenetiche**

Dal 1995 l'ISS organizza i controlli di qualità per le tecniche immunogenetiche sui laboratori che operano nel campo dei trapianti di organo e di midollo osseo. In base alla legge sui trapianti 91/99, tale attività viene svolta su delega del CNT, che ha il compito di definire i protocolli e i criteri di valutazione della qualità delle prestazioni in immunogenetica dei laboratori

partecipanti. Per svolgere tale attività, è stata richiesta la collaborazione del servizio di Immunoematologia del Policlinico Umberto I, Università Sapienza di Roma, che fornisce le sacche di sangue di donatori, necessarie per le diverse tecniche. Il CNT ha istituito una Commissione costituita dai maggiori esperti del campo, che ha il compito di fornire consulenza per definire i criteri di valutazione della qualità delle prestazioni dei laboratori e di discutere e risolvere le varie problematiche connesse con i controlli di qualità. Questi ultimi vengono effettuati ogni anno su circa 35 laboratori italiani e, dallo scorso anno, anche sul laboratorio di Zagabria, in base a recenti accordi tra la Croazia e il CNT. Le tecniche che vengono valutate sono la tipizzazione sierologica e molecolare HLA, la prova di compatibilità pre-trapianto di organi solidi (*crossmatching*) e la ricerca di anticorpi anti-HLA nei pazienti in lista di attesa di trapianto (PRA). La valutazione dei risultati segue le regole definite dalla *European Federation of Immunogenetics* (EFI) che ha come obiettivo quello di garantire l'uniformità della qualità della tipizzazione nei Paesi europei e promuovere scambi di organi tra di essi. I risultati vengono comunicati, tramite lettera, ai Direttori Generali e Sanitari delle Aziende Ospedaliere, agli Assessorati alla Sanità e ai Coordinatori regionali per i trapianti d'organo. Il controllo di qualità sulla tipizzazione HLA è strumento essenziale per: definire il livello della qualità dalla tipizzazione HLA nel nostro Paese; rendere la qualità omogenea su tutto il territorio; favorire contatti e scambi tra i laboratori; valutare l'efficienza dei prodotti commerciali e non che vengono generalmente utilizzati. In aggiunta, la partecipazione al controllo di qualità è condizione necessaria per la richiesta di accreditamento internazionale da parte dei laboratori

#### **Attività programmata**

Il controllo di qualità delle strutture preposte alle indagini immunogenetica e alle tecniche da queste adottate, come tutti i programmi di qualità, non ha scadenza. Prosegue pertanto anche per il prossimo triennio il compito di verifica del CNT svolto in collaborazione con l'ISS e in particolare con il Dipartimento EOMM.

#### **Counselling al cittadino**

In conformità all'art. 2 L 91/99 il CNT offre ai cittadini un servizio continuativo di *counselling* in tema di donazioni e trapianto di organi tessuti e cellule. In particolare il personale medico e amministrativo forniscono risposte ad interrogativi riguardanti quesiti medici o tecnico organizzativi attinenti al trapianto. Per facilitare la comunicazione con i cittadini, il CNT ha attivato un apposito indirizzo mail, accessibile da [www.trapianti.ministerosalute.it](http://www.trapianti.ministerosalute.it), al quale chiunque voglia chiedere delle informazioni può accedervi.

#### **Attività programmata**

Il CNT, continuerà, anche per il prossimo triennio, a svolgere attività di consulenza al cittadino sia telefonicamente, sia attraverso la casella di posta dedicata accessibile tramite il sito [www.trapianti.ministerosalute.it](http://www.trapianti.ministerosalute.it).

#### **Interrogazioni parlamentari**

Il CNT fornisce pareri e elementi di risposta alle interrogazioni parlamentari, *question time* sottoposte in tema di trapianti al Ministro della Salute.

Allo scopo il CNT interpella gli esperti ad esso afferenti e, a seconda delle domande postegli, compie indagini sull'intera rete trapiantologica.

#### **Attività programmata**

Continua anche per il prossimo triennio il ruolo del CNT nel fornire elementi di risposta relativamente alle problematiche legate al settore dei trapianti in collaborazione con l'Ufficio Legislativo del Ministero della Salute.

## Ispezioni banche dei tessuti, centri di CSE e centri PMA

Il CNT effettua da anni, in applicazione dell'art. 7 DL.vo 191/2007, un programma di attività di verifica e ispezioni finalizzato alla certificazione degli Istituti dei tessuti (Banche tessuti, centri di CSE – Cellule Staminali Ematopoietiche – e centri PMA) presenti in Italia per la conformità ai requisiti di qualità e sicurezza previsti dai DL.vi 191/2007 e 16/2010.

Al fine di poter provvedere alle ispezioni, il CNT ha costituito un team di esperti selezionati in base a competenze ed esperienze maturate nell'ambito dei tessuti e appositamente formati da corsi nazionali.

A partire dal 2007 è iniziato un percorso di verifica presso le Unità di processazione e di raccolta di CSE, che afferiscono ai programmi trapianto, in collaborazione con il CNS e con il Jacie (*Joint Accreditation* ISCT - EBMT). Più recentemente (luglio 2011), tali verifiche sono state estese anche alle Banche di sangue cordonale afferenti alla rete nazionale (*Italian Cord Blood Network*, ITCBN). Anche per questa tipologia di verifiche sono stati costituiti team di esperti nazionali, adeguatamente formati e che seguono corsi di aggiornamento periodico.

Inoltre nell'ambito del processo dell'attività di gestione delle raccolte e impiego delle CSE da cordone ombelicale, è stata istituita dal 2009 una Commissione di esperti con competenze professionali specifiche in varie discipline, come previsto dall'art. 2, comma 7, del DL.vo 18/11/2009, che ha il compito di valutare le richieste di raccolta di unità cordonali a scopo dedicato, la cui indicazione clinica non rientra tra quelle per quali l'uso di CSE risulta sufficientemente provato. Dal 2010 tale attività viene svolta attraverso un software dedicato, denominato "DediCo" che permette di avere una finestra di dialogo aperta a tutte le banche cordonali della ITCBN.

Il programma di verifiche è stato esteso dal 2011 anche al settore della procreazione medicalmente assistita, dove il CNT supporta le Regioni in questa attività. Sono stati formati certificatori, esperti del settore cellule e tessuti nominati da ogni Regione, e il team comprende sempre almeno un ispettore CNT e uno regionale.

Oltre alle attività di ispezione gli esperti del CNT forniscono pareri e alberano periodicamente i dati delle attività delle banche dei tessuti.

### Attività programmata

Nel triennio 2012-2014 sono previste le seguenti attività:

- unità di processazione e di raccolta CSE: ispezioni;
- banche del cordone ombelicale: percorso di verifica delle Banche cordonali;
- banche dei tessuti e centri PMA: si prosegue con l'attività di verifiche ispettive, da farsi con cadenza biennale;
- audit Registri regionali e Centri donatori afferenti a IBMDR;
- organizzazione della rete di centri di CSE, banche tessuti e centri di PMA: coordinamento e gestione della rete dei programmi trapianto;
- stesura di Linee guida del settore;
- formazione: promozione di iniziative (corsi di formazione) per l'aggiornamento dei professionisti coinvolti nei percorsi di verifica.

## Pareri

Tra le varie funzioni che l'art. 8 della Legge 91/99 affida al CNT è insita quella di orientamento e consulenza sia per le unità operative della rete trapiantologica, sia per le Istituzioni nazionali, regionali e locali. Le consulenze e/o pareri generalmente riguardano l'insieme delle problematiche tecniche e normative che interessano il sistema trapiantologico relativamente agli aspetti gestionali e procedurali delle attività. Ma, possono riguardare anche specifiche tematiche scientifiche o anche legali a cui il CNT riesce a dare risposte

avvalendosi di professionisti esterni che a vario titolo collaborano con il CNT. In sostanza, il sistema è pensato per dare risposte e interpretazioni tempestive alle diverse problematiche che direttamente o indirettamente interessano il mondo dei trapianti.

#### **Attività programmata**

Prosegue anche per il prossimo triennio (2009-2011) l'attività di pareristica del CNT.

### **Programmi di trapianto Cellule Staminali Ematopoietiche**

Il CNT, al fine di rispondere ai propri compiti istituzionali e in particolare allo scopo di raccogliere ed elaborare i dati epidemiologici dei dati relativi ai trapianti di organi e tessuti effettuati in ambito nazionale, ha attivato una collaborazione con l'IBMDR. L'IBMDR è l'unica struttura riconosciuta a livello nazionale dalla L. 6/3/2001, n. 52 quale registro nazionale donatori midollo osseo. Attraverso tale collaborazione il CNT provvede alla elaborazione epidemiologica dei dati relativi alla donazione e al trapianto di cellule staminali emopoietiche.

In tema di cellule staminali il CNT collabora attivamente con tutte le banche che sul territorio italiano provvedono all'imbankaggio del sangue cordonale.

Il CNT, inoltre, intrattiene rapporti di collaborazione con il Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO).

#### **Attività programmata**

Si prevede la programmazione e realizzazione di incontri dedicati al coordinamento e alla gestione della rete dei Programmi trapianto delle Banche cordonali e di CSE. Al fine di migliorare la qualità dei dati è prevista la realizzazione di uno strumento informatico per la gestione di eventi/reazione avverse gravi. Verrà, inoltre, proseguito il lavoro di gestione dei flussi dati relativi all'attività trapiantologica a livello nazionale e internazionale. Proseguirà il supporto alla gestione dei rapporti con la commissione DediCo.

### **Valutazione dei requisiti delle strutture idonee ad effettuare trapianti di organi e tessuti**

In base all'accordo Conferenza Permanente tra il Ministro della Salute, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano del 14/2/2002 e del 29 aprile 2004, riguardanti rispettivamente i requisiti delle strutture idonee a effettuare trapianti di organi e tessuti e le linee guida per l'idoneità e il funzionamento dei centri individuati dalle Regioni come strutture idonee ad effettuare trapianti di organi e tessuti, il CNT ha il compito di verifica e controllo sull'osservanza di tali procedure da parte delle Regioni.

Tale attività si esplica attraverso un parere emesso dopo:

- verifica della regolarità dei documenti trasmessi dalle Regioni;
- verifica tecnica dei requisiti logistici e strumentali effettuata avvalendosi delle competenze dell'ISS.

#### **Attività programmata**

Per il triennio 2012-2014 il CNT fornirà il proprio supporto alle regioni nel procedimento di valutazione delle strutture deputate ai trapianti coordinando le procedure di controllo tecnico con quelle di natura burocratica. A questo scopo è intenzione del CNT promuovere un corso di formazione per gli assessorati e i centri regionali trapianti che controllano sulla regolarità delle procedure di autorizzazione.

**Centro  
per la ricerca e la valutazione dei prodotti  
immunobiologici**

---

**Attività di ricerca**



### **Collaborative study for the standardization of the Ph.Eur Hepatitis B Immunoglobulin BRP (BSP103)**

Il progetto, organizzato dall'EDQM nell'ambito del *Biological Standardization Programme* (BSP) della Farmacopea Europea, si propone di identificare il nuovo candidato a *Biological Reference Preparation* (BRP) per le immunoglobuline anti-HBs, calibrata sul secondo standard internazionale della WHO, da utilizzare per tutti i saggi di determinazione della *potency* di immunoglobuline anti-Epatite B. Il progetto si articola in una prima fase di testing per assegnare un valore preliminare di *potency* al materiale candidato e per verificare eventuali *bias* dovuti all'utilizzo di metodi differenti. La seconda fase, invece, coinvolgerà circa 20 laboratori (OMCL e produttori di immunoglobuline) e avrà come oggetto il testing di tre preparazioni candidate in cieco e a confronto con il primo standard internazionale WHO. Al termine del testing, verrà verificata l'idoneità del materiale candidato testato e ad esso verrà assegnato un valore di *potency*, risultato dalla elaborazione statistica dei dati ricevuti dai partecipanti. Se considerato idoneo, esso verrà ufficialmente adottato come 2° BRP per le immunoglobuline anti-HBs dallo *Steering Committee* del BSP dell'EDQM. Al termine della seconda fase verrà prodotto un Report che, in caso di adozione del BRP da parte dello *Steering Committee*, verrà pubblicato sulla rivista periodica della Farmacopea Europea PharmaEuropa.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il risultato atteso del progetto è la definizione del primo BRP europeo per la standardizzazione dei saggi di *potency* di immunoglobuline umane anti-Epatite B. Tale BRP verrà distribuito dall'EDQM ad uso degli OMCL europei che svolgono attività di *Official Control Authority Batch Release* (OCABR) e dei produttori di immunoglobuline anti-Epatite B da plasma umano.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto, già iniziato e finanziato, terminerà verosimilmente per la fine del 2012. La partecipazione a questo studio consente al CRIVIB di contribuire, con la sua *expertise*, al BSP della Farmacopea Europea, programma volto alla definizione degli standard di riferimento utilizzati da OMCL e produttori di farmaci. Nel caso del progetto BSP103, il BRP che verrà definito verrà utilizzato come standard di riferimento, calibrato sul secondo standard internazionale WHO, per la misura della *potency* di immunoglobuline specifiche anti-HBs. Alla fine del progetto, i risultati dello studio verranno pubblicati sulla rivista periodica della Farmacopea Europea PharmaEuropa. La partecipazione a questo studio potrà tra l'altro contribuire, in futuro, all'assegnazione al CRIVIB di nuovi progetti nell'ambito del BSP della Farmacopea Europea.

### **La qualità delle tecniche sierologiche e di amplificazione genomica finalizzate alla qualificazione biologica dei prodotti ad uso trasfusionale: organizzazione di Programmi VEQ e allestimento Preparazioni di Riferimento**

Il laboratorio, che esegue le indagini sierologiche e molecolari per la qualificazione biologica delle unità di sangue ed emocomponenti, deve definire e applicare procedure operative finalizzate ad ottenere risultati che rispettino standard di precisione, accuratezza e ripetibilità. Il laboratorio adotta le seguenti strategie: il "controllo di qualità interno" che comprende l'utilizzo di Preparazioni di Riferimento o Standard al fine di intercettare un qualunque evento che possa pregiudicare l'accuratezza del metodo analitico utilizzato; il "controllo di qualità esterno" che si concretizza principalmente mediante la partecipazione del laboratorio a Confronti Interlaboratorio, quali i VEQ.

Il presente progetto, in collaborazione con il CNS, si articolerà nel seguente modo:

- organizzazione di Programmi VEQ per i saggi di amplificazione genica (NAT) per la ricerca di HCV RNA, HIV RNA, HBV DNA e WNV RNA;
- organizzazione di Programmi VEQ per i saggi immunometrici per la ricerca di anti-HCV, anti-HIV1-2, HBsAg e anti-treponema;
- sviluppo di Preparazioni di Riferimento nazionali per HCV, HIV HBV e WNV da impiegare nei saggi NAT.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il presente progetto ha lo scopo di fornire ai Laboratori afferenti ai Servizi Trasfusionali un valido strumento per monitorare la qualità delle prestazioni analitiche e della competenza degli operatori. Inoltre le Strutture Trasfusionali verranno coinvolte in un lavoro di gruppo dal quale vengono generati dati analitici che verranno elaborati in un report che verrà distribuito ai partecipanti.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Dalla partecipazione ad un Programma VEQ ciascun laboratorio potrà:

- confrontare l'affidabilità delle proprie prestazioni analitiche con quelle di altri laboratori;
- prendere confidenza con la tecnologia in uso, e in particolare di conoscere i limiti delle metodiche NAT e immunometriche impiegate;
- individuare nel processo analitico elementi di criticità.

Il singolo laboratorio può quindi misurare la propria prestazione confrontandola con quella degli altri partecipanti ed effettuare così una propria autovalutazione al fine di poter riesaminare le proprie procedure operative ed eventualmente attivare le misure correttive più appropriate.

### **Allergeni, contaminanti chimici e ambientali in asili nido e scuole elementari: proposta di un approccio integrato per la valutazione del rischio correlato ai principali inquinanti**

L'impatto della Qualità dell'Aria Indoor (*Indoor Air Quality*, IAQ) sulle attività umane è supportata da numerose prove. I neonati, i bambini, gli anziani e i soggetti con malattie croniche sono generalmente più sensibili ai contaminanti indoor.

In particolare, i bambini sono i più vulnerabili agli inquinanti indoor per varie ragioni, tra cui l'im maturità dei loro organi e il sistema immunitario ancora in via di sviluppo. Inoltre, i bambini trascorrono buona parte del loro tempo nelle aule scolastiche. In tal modo sono spesso esposti a livelli variabili di inquinanti indoor incluse muffe, agenti contagiosi e/o allergenici, fumi chimici e gas, e odori.

Per quanto riguarda gli inquinanti chimici, l'esposizione agli inquinanti indoor sarà definito come la media giornaliera dei livelli di PM 10, PM 2.5, conteggio di particelle ultrafini, IPA, composti organici volatili (COV), ossidi di azoto (NOx), solventi aromatici (BTEX), formaldeide, amianto, metalli e metalloidi, ecc. contemporaneamente saranno misurate, umidità relativa, temperatura e CO<sub>2</sub>. Inoltre, verranno determinati i livelli di contaminanti microbiologici, quali muffe, acari e batteri. Saranno inoltre misurate le concentrazioni degli allergeni indoor come acari, gatto, cane, rivolgendo particolare attenzione alle muffe. Per quanto riguarda queste ultime, verrà utilizzato un approccio integrato per dosare gli allergeni nella polvere sedimentata e anche la presenza di muffe e spore nell'aria. Questo potrebbe consentire di comprendere meglio la reale esposizione a questi microrganismi e ai loro allergeni.

### **Risultati attesi nel triennio**

Lo scopo di questo studio è quello di valutare la IAQ misurando i livelli dei composti chimici, degli agenti microbiologici e degli allergeni negli asili nido, in scuole materne ed elementari.

L'analisi di questi tre diversi tipi di inquinanti verranno effettuate attraverso l'applicazione di un protocollo multi-metodo per meglio comprendere la qualità dell'ambiente indoor. Questo studio produrrà valori di background e un modello da seguire per parametri specifici degli ambienti residenziali in esame. Il modello sarà una preziosa guida per il monitoraggio e il controllo dell'aria indoor negli asili e nelle scuole materne ed elementari e inoltre sarà un utile strumento per migliorare la prevenzione e la sorveglianza.

Le conclusioni derivanti da questi studi potrebbero consentire all'SSN di elaborare linee guida focalizzate sulla sicurezza nelle strutture scolastiche al fine di prevenire o ridurre i rischi associati con i problemi di qualità dell'aria indoor.

Queste raccomandazioni potrebbero suggerire nuovi principi di progettazione e requisiti per scuole ad "alta performance". Caratteristiche specifiche, come una qualità superiore dell'aria indoor, l'uso di materiali e prodotti specifici, facili da mantenere, l'uso di materiali da costruzione atossici, appropriate procedure di pulizia e comportamenti adeguati potrebbero promuovere la salute e la produttività dei bambini e degli insegnanti in modo, anche economicamente, semplice.

### **Trasferibilità dei risultati**

Noi proponiamo di standardizzare un nuovo approccio integrato per valutare differenti inquinanti indoor (allergeni, agenti chimici e microbiologici), negli asili nido, scuole materne ed elementari.

Tali protocolli standardizzati possono fornire all'SSN nuove informazioni circa i vari inquinanti che possono essere presenti, negli asili, materne ed elementari del Lazio. Misurando il livello degli inquinanti indoor possiamo valutare parallelamente l'influenza dell'ambiente outdoor (localizzazione della scuola, possibile diffusione interna di inquinanti esterni da porte e finestre). Ciò potrebbe consentire di effettuare meglio gli studi futuri su questi argomenti, proponendo un approccio ad altri ricercatori che studiano le relazioni tra inquinanti e salute. Un approccio più standardizzato può offrire una valutazione più affidabile sulle sostanze inquinanti e un potenziale strumento per migliorare le linee guida disponibili.

### **Asma grave: coorti epidemiologiche e cliniche seguite tramite registro e questionari; appropriatezza terapeutica e valutazione dei risultati secondo la linea guida GINA (AGAVE)**

L'asma è una malattia polmonare infiammatoria cronica, caratterizzata da una ostruzione di entità variabile che limita il flusso dell'aria. La prevalenza di tale patologia nel mondo è in aumento (in Italia si stima che sia del 6-9%). Sebbene questo sia un disordine comune, talvolta i medici sottovalutano i sintomi respiratori dei loro pazienti oppure non li individuano correttamente effettuando così una diagnosi sbagliata, tale fattore comporta che l'inizio del trattamento non avviene in maniera tempestiva. Una carenza nella diagnosi e nel trattamento avviene soprattutto con i soggetti anziani poiché la patologia viene spesso confusa con l'asma senile, che è una condizione eterogenea che comprende entrambe le forme, ad esordio precoce e tardivo. Quest'ultima può essere confusa inoltre con la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO o *Chronic Obstructory Pulmonary Disease*, COPD). Un valore aggiunto del progetto AGAVE è la raccolta di dati relativi all'alfa synuclein della proteina (SNCA) (asma grave/non controllato) in una coorte di bambini

seguiti dalla nascita grazie ad un progetto precedente. Il progetto AGAVE si propone di migliorare le conoscenze relative alle caratteristiche (incluse le modalità di trattamento, ricoveri ospedalieri e gli accessi al pronto soccorso) dei bambini con SNCA rispetto a bambini con asma lieve, fornendo suggerimenti importanti per l'implementazione delle indicazioni per il trattamento in gioventù.

#### **Risultati attesi nel triennio**

L'obiettivo primario è quello di valutare l'efficacia delle strategie terapeutiche per SNCA, definite secondo le linee guida GINA, nella popolazione generale e nei campioni clinici, mediante l'implementazione del registro RITA (online).

Gli obiettivi secondari e i relativi risultati attesi sono i seguenti:

- ottenere indicatori clinici di appropriatezza diagnostico/terapeutica associate alla SNCA;
- valutazione costi diretti e indiretti della malattia, sia farmacologici che non farmacologici e appropriatezza del trattamento;
- utilizzo di biomarcatori diversi per il monitoraggio e il controllo dell'asma e per l'individuazione di modelli diversi di infiammazione delle vie aeree;
- valutazione del beneficio clinico della chirurgia sinusale nei pazienti con sinusite, poliposi nasale e asma grave;
- ottenere dati epidemiologici nazionali relativi all'incidenza, prevalenza, controllo, gestione, uso di farmaci, e costi della SNCA in campioni di popolazione generale;
- effettuare un monitoraggio attivo e continuo dei soggetti con SNCA, selezionati attraverso il registro RITA da campioni di popolazione generale e da casi clinici di diversi gruppi di età e differenti aree geografiche;
- implementazione del registro RITA attraverso i centri clinici di tutta Italia.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I dati che verranno prodotti dalla realizzazione del progetto possono avere un impatto primario e molto rilevante sull'SSN in termini di valutazione di costi diretti e indiretti della malattia, di appropriatezza farmacologica, di gestione non farmacologica dei pazienti seguiti. Tutto questo comporta la possibilità di mantenere un controllo dell'asma utilizzando diverse strategie di trattamento. In conclusione, ma non di minore importanza, è la possibilità di ottenere un miglioramento nella gestione della malattia, che può condurre ad un uso razionale delle risorse, fattore questo che potrebbe costituire un vantaggio relativamente all'attività dell'AIFA.

#### **Biological standardization programme for whole cell pertussis vaccine serology**

L'ISS è responsabile del progetto per la messa a punto e convalida del saggio di attività biologica della componente pertossica cellulare (wP) presente in vaccini per uso umano, mediante lo studio collaborativo (BSP104) organizzato dall'EDQM (Strasburgo, Francia). I vaccini wP sono utilizzati nei paesi del terzo mondo dato il loro costo più basso rispetto a quelli acellulari. I vaccini vengono controllati per la loro attività biologica sia dal produttore che da un'autorità di controllo. L'attività si determina, secondo il metodo ufficiale della Farmacopea Europea (Kendrick's test), confrontando la dose di vaccino necessaria a proteggere i topi dagli effetti di una dose letale di *Bordetella pertussis*, somministrata per via intracerebrale, con la quantità di una preparazione di riferimento, necessaria per ottenere la stessa protezione. Lo scopo di questo studio è quello di sostituire la seconda parte del saggio di attività (*challenge* intracranico) con un metodo sierologico mediante il quale determinare gli anticorpi anti *B. pertussis* in ELISA (wC-PSPT).

Lo studio è rilevante in quanto dimostra che ISS è sensibile alla problematica di *refine, reduce or replace* l'uso degli animali nel controllo dei farmaci (nel caso specifico di vaccini anti wP) come richiesto dalla convenzione Europea, dalle Direttive 86/609/EEC, 2010/63/EU e dalla Farmacopea Europea.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Lo studio è diviso in tre fasi dipendenti dall'esito positivo della precedente. La prima fase prevede che ISS insieme al *Netherland Vaccine Institute* inoculi in cavia e topi varie tipologie di vaccini anti wP (conformi e non conformi alle specifiche di rilascio per l'attività biologica di wP; vaccini wP combinati con difterite, tetano, glicoconiugato di *Haemophilus influenzae* tipo b, epatite B, IPV, ecc.), e dosi in ELISA, sul siero della singola cavia, gli anticorpi anti *B. pertussis*. Il risultato atteso è che il metodo sia in grado di discriminare tra lotti di vaccini potenti e subpotenti. Dall'esito di questa fase si passerà alla fase 2 in cui quattro OMCL coinvolti nel *batch release* di vaccini wP e quattro ditte produttrici di vaccini wP ripeteranno il saggio in cavia/topo. Questa fase serve a dimostrare la riproducibilità del metodo. La terza fase prevede la distribuzione di sieri provenienti dalla fase 2 da saggiare in ELISA da parte di circa 30 partecipanti secondo un protocollo standard. Questa fase serve a convalidare il metodo di dosaggio in ELISA.

Per ogni fase verranno stilati protocolli *ad hoc* e *data sheet form* per la raccolta dei dati che verranno analizzati da statistici.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La partecipazione allo studio di diversi laboratori sia afferenti al Network degli OMCL che dei produttori di vaccini, servirà a valutare la sensibilità del metodo alternativo, la sua ripetibilità e riproducibilità. Se i dati saranno soddisfacenti, il metodo verrà proposto per l'inserimento in Farmacopea in alternativa al Kendrick test e pubblicato in *Pharmaeuropa Bio&Scientific Notes*.

### **Epidemiologia molecolare di rotavirus in età pediatrica in Italia. Creazione di una rete di sorveglianza per monitorare la diffusione e l'evoluzione di genotipi virali**

I rotavirus (RV) sono diffusi in tutto il mondo e sono la principale causa di gastroenterite acuta nell'infanzia con oltre 600.000 morti/anno, concentrati quasi completamente nei Paesi in via di sviluppo. Nei Paesi industrializzati, come l'Italia, la mortalità è bassa, nell'ordine di poche decine di morti/anno, mentre la morbilità è molto elevata. L'obiettivo del presente progetto è il monitoraggio dei rotavirus circolanti in Italia nel periodo precedente l'introduzione della vaccinazione di massa. La sorveglianza rappresenta l'unico mezzo per giudicare la congruità delle formule vaccinali, valutare gli effetti della vaccinazione di massa sul pool di sierotipi di RV circolanti e predisporre eventuali modifiche delle formule antigeniche come per i vaccini influenzali. Il progetto si propone di monitorare i ceppi di rotavirus presenti nelle feci dei bambini da zero a cinque anni ospedalizzati per gastroenterite acuta. È stata creata una rete di sorveglianza nazionale coordinata dall'ISS e dal Ministero della Salute (CCM), costituita da Centri regionali di Referenza nel Nord, Centro e Sud Italia e ospedali pediatrici per la ricerca attiva di soggetti con gastroenterite (GE) acuta. Gli ospedali effettueranno la diagnostica di primo livello, con kit commerciali, mentre la genotipizzazione dei ceppi di rotavirus sarà eseguita presso l'ISS e alcuni Laboratori Regionali accreditati. I dati epidemiologici e di genotipizzazione saranno elaborati e raccolti in un database presso l'ISS.

### **Risultati attesi nel triennio**

Creazione in Italia di un network di laboratori regionali accreditati per la sorveglianza dell'infezione da rotavirus, e ruolo dell'ISS quale centro di riferimento nazionale per il Ministero della Salute e la WHO. Monitoraggio dei tipi di rotavirus circolanti nel periodo precedente le campagne vaccinali. Verifica della diversità genomica ed evoluzione di ceppi virali di identico G e/o P tipo in periodi e/o zone geografiche differenti. Verifica dell'eventuale emergenza di nuove varianti antigeniche virali e valutazione del rischio ad esse associato nello sviluppo della malattia. Analisi delle notifiche di GE in Italia e dei risultati delle indagini epidemiologiche e virologiche. Verifica del livello di cross-protezione fornito dai diversi vaccini e predisposizione di eventuali modificazioni delle formule antigeniche vaccinali. Aggiornamento tecnico-scientifico dei laboratori afferenti alla rete di sorveglianza.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati del progetto saranno trasferiti alla comunità scientifica nazionale e internazionale attraverso articoli scientifici, linee guida e documenti ufficiali, e forniranno informazioni sulla vaccinazione antirotavirus al Ministero della Salute e delle Politiche Sociali, all'AIFA, all'SSN e alla WHO. L'attività della rete sarà presentata e discussa attraverso workshop con i partecipanti alle attività, finalizzati alla messa a fuoco delle problematiche epidemiologiche e di laboratorio critiche per la prosecuzione e il miglioramento delle attività in coordinamento con il Ministero della Salute e la WHO.

### **Establishment of Recombinant Major Allergens Bet v 1 and Phl p 5a as European Pharmacopoeia BRPs and Validation of ELISA Methods for their Measurement (BSP090)**

La Comunità Europea ha precedentemente finanziato un progetto di ricerca multidisciplinare (CREATE: *Development of Certified Reference Materials for Allergenic Products and Validation of Methods for their Quantification*), terminato nel 2005. Lo scopo di questo progetto è stato quello di introdurre l'analisi quantitativa degli allergeni maggiori per la standardizzazione degli estratti allergenici e identificare delle preparazioni di riferimento appropriate. Tale scopo è stato raggiunto attraverso la convalida di sistemi ELISA per il dosaggio degli allergeni maggiori negli estratti, utilizzando come standard delle preparazioni di riferimento definite. Durante il progetto CREATE non sono stati ultimati né la convalida dei saggi ELISA né la produzione di lotti, su vasta scala, di materiale di riferimento poiché esulava dallo scopo del progetto. Nel corso di un incontro della *International Union of Immunological Societies (IUIS)*, sulla base dei risultati ottenuti nel progetto CREATE, è stato stabilito che gli allergeni più promettenti per una ulteriore convalida erano gli allergeni Bet v 1 del polline di *Betula verrucosa* e Phl p 5a del polline di *Phleum pratense*, con i relativi sistemi ELISA delle ditte Allergopharma (Phl p 5 a), ALK-Abelló (Bet v 1 and Phl p 5a) e Stallergènes (Bet v 1). In relazione a quanto stabilito dalla IUIS, nel gennaio 2006 il Comitato Direttivo del "Programma di Standardizzazione dei Prodotti Biologici" ha approvato il progetto BSP090.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto BSP090, promosso dal Programma di Standardizzazione dei Prodotti Biologici dell'EDQM, ha lo scopo di stabilire BRP su ampia scala dei due allergeni ricombinanti Bet v 1 e Phl p 5a, e di convalidare metodi ELISA per il dosaggio di tali allergeni negli estratti allergenici utilizzati per la diagnosi e l'immunoterapia delle patologie allergiche. Il progetto sarà gestito in tre fasi: una prima valutazione di fattibilità (fase 1) è stata già effettuata nel

laboratorio del responsabile del progetto, uno studio di fattibilità più esteso che coinvolge tre laboratori partecipanti (fase 2) e uno studio collaborativo internazionale (fase 3).

Durante la fase iniziale del progetto, sono stati selezionati alcuni sistemi ELISA basati sull'uso di anticorpi monoclonali che saranno utilizzati nella fase 2 del progetto: due sistemi per Bet v 1 e uno per Phl p 5a. L'obiettivo dello studio in fase 2 è quello di valutare come i sistemi ELISA possono essere trasferiti ad altri laboratori e, se possibile, selezionare un solo sistema ELISA Bet v 1 per la fase 3. Se i due diversi sistemi ELISA per Bet v 1 risultassero validi, questi potranno essere entrambi utilizzati nella fase successiva. Inoltre, l'appropriatezza di rBet v 1 e rPhl p 5 come preparazioni di riferimento sarà oggetto di indagine.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Nel settore delle malattie allergiche, i dati riportati in diversi articoli hanno dimostrato che gli estratti allergenici, utilizzati per la diagnosi *in vivo* e per l'immunoterapia, presentano molti problemi di standardizzazione e di scarsa qualità. Di conseguenza l'appropriatezza della diagnosi e della immunoterapia possono essere fortemente influenzate da questi problemi. Pertanto, gli studi collaborativi volti a stabilire metodi e materiali di riferimento internazionali, per la misurazione degli allergeni principali sono di primaria importanza per il miglioramento della standardizzazione e della qualità degli estratti allergenici. I risultati ottenuti da questo studio saranno fondamentali per stabilire preparazioni biologiche di riferimento, su larga scala, secondo la Farmacopea Europea, per i due allergeni principali del polline di *Betula verrucosa* (Bet v 1) e del polline di *Phleum pratense* (Phl p 5a), così come per convalidare metodi ELISA per la loro analisi quantitativa.

#### **Evaluation and assessment of serological immunity methods and External Quality Assurance (EQA) scheme of diphtheria**

Lo studio costituisce il *workpackage* 3 del Progetto *European Diphtheria Surveillance Network* (EDSN) finanziato dall'ECDC.

Il dosaggio di anticorpi anti difterite viene eseguito normalmente nei *trial* clinici di nuovi vaccini per uso umano, sul siero del personale di un laboratorio batteriologico (la ricerca degli anticorpi anti difterite è obbligatorio in numerosi laboratori della UE per il personale che effettua ricerca/diagnostica per corinebatteri, per verifica del titolo anticorpale prima di effettuare una rivaccinazione, un *booster*, ecc.)

I laboratori di diagnostica operano in un sistema di assicurazione di qualità (UNI CEI EN ISO/IEC 9000 e 17025) che prevede prove di valutazione esterne di qualità, EQA da effettuarsi periodicamente. L'obiettivo del WP3 è quello di organizzare un EQA. A tal fine deve essere preparato un panel di 150 sieri umani positivi, equivoci e negativi per anticorpi anti tossina difterica. Si raccoglieranno quindi circa 200 campioni di sangue da un centro trasfusionale con indicazione solo del sesso e dell'età. Da ogni campione verrà recuperato solo il siero, che verrà saggiato per la presenza di anticorpi anti tossina difterica presso ISS e diviso in un numero di aliquote pari al numero di partecipanti e congelato. Oltre al panel verrà inviato anche il *candidate WHO International Standard (Diphtheria Antitoxin Human - coded 10/262)* preparato dal *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC, UK).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Al progetto partecipano i centri di riferimento per Corinebatteri di diversi Paesi europei (Bulgaria, Cipro, Francia, Germania, Grecia, Norvegia, Olanda, Polonia, Portogallo, Romania, Slovacchia, Slovenia, UK, Lettonia). Ogni partecipante doserà il livello di anticorpi anti tossina difterica con il metodo in uso. I metodi disponibili sono numerosi e

tutti verranno confrontati con il metodo di riferimento di neutralizzazione *in vitro* (*Vero cell assay*). I dati dovranno essere forniti al coordinatore del WP3 tramite apposito foglio di calcolo. La rielaborazione dei dati verrà effettuata dal Coordinatore del WP3 e riportati in un report che andrà al coordinatore del progetto, all'ECDC e ad ogni partecipante.

Ogni partecipante dovrà, inoltre, calcolare il titolo dei sieri anche in riferimento al *candidate standard*.

Questo permetterà di valutare la performance dei vari metodi in modo comparativo essendo tutti i titoli dei sieri ricavati usando lo stesso standard.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Lo studio di EQA permetterà a ogni partecipante di valutare la propria performance. Nel caso in cui più laboratori useranno lo stesso metodo, e avendo a disposizione uno standard identico in tutti i laboratori, si potrà anche valutare la qualità degli stessi in termini di precisione, specificità, sensibilità e riproducibilità.

### **Banca dati delle sostanze chimiche sensibilizzanti**

La Banca Dati su Sostanze chimiche potenzialmente sensibilizzanti (BDS) è predisposta e aggiornata dal CRIVIB e dal Reparto Valutazione del pericolo di sostanze chimiche del CSC dell'ISS, con il supporto del Settore I – Informatica del SIDBAE e di esperti. La BDS include sostanze classificate come sensibilizzanti dalla UE (nell'ambito del Regolamento 1272/2008), sostanze classificate come tali da enti con competenza di valutazione del rischio per l'ambiente di lavoro (es. *American Conference of Industrial Hygienists* – ACGIH e *Deutsche Forschungsgemeinschaft* – DFG) o anche in generale sostanze esaminate da istituzioni sia governative (*US National Toxicology Program*, NTP) che di settore (*Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments Manufacturers* – ETAD, Holding Energia Risorse Ambiente – HERA). La BDS è una banca relazionale e fattuale. Infatti, i dati in essa contenuti sono utilizzabili immediatamente e presentati in forma sintetica. Le informazioni, corredate da riferimenti bibliografici, pur essendo complete in sé consentono di risalire alla fonte originale e in alcuni casi di collegarsi direttamente ad essa mediante la rete. La BDS è consultabile all'indirizzo web: <http://www.iss.it/site/BancaDatiSensibilizzanti/>.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Le sostanze per le quali non è disponibile una classificazione armonizzata secondo il Reg. 1272/2008 (ma che rispondono ai criteri di detto Regolamento) ricadono in regime di autotrasmissione da parte dei responsabili della loro immissione in commercio. Il Testo Unico in materia di salute e sicurezza nei luoghi di lavoro (DL.vo n. 81 del 9/4/2008) fa riferimento, non solo alle sostanze con classificazione armonizzata ma anche a quelle classificabili come tali sulla base dei criteri di classificazione stabiliti dalla UE nell'ambito del Reg. 1272/2008.

Considerando ciò, la BDS oltre a includere tutte le sostanze classificate ufficialmente dalla UE come sensibilizzanti, si propone di offrire ampie informazioni sulle sostanze potenzialmente tali, in supporto alla classificazione provvisoria e a criteri di prevenzione.

La BDS presenta classificazioni e valutazioni formulate da Istituzioni pubbliche e private che a livello internazionale si occupano di identificare e classificare, in aggiunta agli altri rischi, anche il potenziale sensibilizzante di agenti, sia in ambienti di lavoro che di vita.

Il principale risultato di ciò è quindi la fruibilità della Banca Dati sul sito web dell'ISS e la relativa disponibilità delle informazioni presenti nella Banca Dati stessa sia per la comunità scientifica che per le industrie.

### **Trasferibilità dei risultati**

La BDS si prefigge di presentare in modo sintetico e in lingua italiana tutte le classificazioni di rilievo relative al potenziale sensibilizzante, formulate dagli Enti competenti che operano a livello internazionale e nazionale in tale ambito, in forma integrata. Ne consegue che la disponibilità di valutazioni diverse formulate da Enti accreditati consente di colmare generalmente il gap nell'informazione relativa alla valutazione del potenziale di sensibilizzazione sia per le sostanze per le quali non è ancora disponibile una classificazione armonizzata ma potenzialmente classificabili, sia per quelle che esulano dal campo di applicazione del Reg. 1272/2008. Pertanto, la consultazione della BDS offre una panoramica ampia della problematica e un esteso supporto agli utenti. La trasferibilità dei risultati prodotti dalla BDS incide a livello di SSN e per le industrie fornendo informazioni per il personale esposto a rischio professionale.

### **Laboratory support for virological investigation on acute flaccid paralysis (AFP) cases in: Italy, Albania, Bosnia, Bulgaria, Greece, Kosovo, Serbia & Montenegro, Macedonia, Malta and Montecarlo**

Il progetto prevede il coordinamento della sorveglianza attiva delle AFP in Italia e il supporto virologico a nove Paesi del sud-est europeo, quale centro di referenza regionale del WHO polio LabNet europeo, per verificare l'assenza di casi di polio paralitica da virus selvaggi. Lo studio sarà condotto secondo le caratteristiche di efficienza e sensibilità richieste dalla WHO per Paesi industrializzati e sarà armonizzato con le altre reti di sorveglianza AFP europee. Per il raggiungimento degli obiettivi verranno implementate e armonizzate le tecniche di ricerca attiva dei casi, le tecniche di indagine clinico-epidemiologiche, la segnalazione e la raccolta dei dati, la raccolta tempestiva dei campioni clinici e l'analisi virologica di laboratorio. Sarà inoltre prioritario perfezionare il raccordo tra il centro di coordinamento presso l'ISS, i centri collaboranti e la WHO attraverso un sistema computerizzato per la gestione, l'analisi e la trasmissione dei dati epidemiologici e dei risultati virologici. Questo aspetto è necessario per l'individuazione immediata degli *hot case* e per prevenire la diffusione di eventuali polio selvaggi individuati. Lo studio comporta standard elevati nelle indagini virologiche e sierologiche da raggiungersi attraverso l'utilizzo di protocolli standard, linee cellulari e reagenti di riferimento, indicatori di performance e proficiency test.

### **Risultati attesi nel triennio**

Valutazione dell'incidenza delle AFP in Italia e in nove paesi del Sud-Est europeo  
Identificazione e immediata segnalazione al Ministero della Salute e alla WHO di tutti i casi di paralisi flaccida ad insorgenza acuta in soggetti di età compresa tra zero e 14 anni.  
Definizione del ruolo di poliovirus selvaggi o vaccino-derivati o di altri enterovirus (Echo e Coxsackievirus) nell'eziologia delle AFP. Tipizzazione e caratterizzazione molecolare dei ceppi virali isolati. Studio dell'eziologia delle malattie simil-poliomielitiche quali la sindrome di Guillain-Barré, causa più comune di paralisi neuromuscolare acuta nei Paesi industrializzati, la mielite trasversa, ecc. Attività di training sui metodi per isolamento e tipizzazione di poliovirus e altri enterovirus da campioni clinici e ambientali. Organizzazione di incontri con i responsabili regionali della sorveglianza delle AFP e con esperti del Ministero della Sanità e WHO. Partecipazione a saggi di competenza Proficiency test proposti dalla WHO, consistenti nell'isolamento, identificazione e caratterizzazione di enterovirus presenti in campioni clinici preparati *ad hoc*. Organizzazione di Proficiency test per i laboratori di referenza sub-nazionali e nazionali afferenti alla rete di sorveglianza. Visite ispettive per l'accreditamento annuale dei laboratori sub- nazionali collaboranti.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati del progetto saranno trasferiti alla comunità scientifica nazionale e internazionale attraverso articoli scientifici, linee guida e documenti ufficiali, e saranno utilizzati per la richiesta di certificazione *polio-free* dell'Italia e dei Paesi legati all'Italia alla WHO. L'attività della rete sarà presentata e discussa attraverso workshop con i partecipanti alle attività, finalizzati alla messa a fuoco delle problematiche epidemiologiche e di laboratorio critiche per la prosecuzione e il miglioramento delle attività della rete, anche in coordinamento con la WHO.

### **Progetto di gestione clinica e follow-up dei casi di AFP in Italia e di implementazione della sorveglianza delle AFP nel Veneto**

Il progetto ha come obiettivo la sorveglianza, il follow-up e la verifica degli esiti dei casi di AFP già segnalati nel Veneto dal 1996 al 2009. Viene svolto attraverso la gestione clinica delle AFP e il trattamento riabilitativo, predisponendo dei protocolli per il trattamento delle paralisi e per la formazione del personale medico, infermieristico, fisioterapistico e degli specialisti. Altro obiettivo è quello del potenziamento della rete di sorveglianza delle paralisi flaccide acute con particolare riferimento alla Regione Veneto. Sarà valutata l'incidenza delle AFP nella Regione Veneto attraverso il consolidamento della rete di ospedali a cui afferiscono i casi (Reparti di Pediatria, Neurologia e Malattie Infettive) con nomina di un referente per ogni Reparto che dovrà effettuare le segnalazioni e avere contatti con il Referente regionale per la Sorveglianza AFP nominato dal Ministero. Saranno identificati e immediatamente segnalati tutti i casi di paralisi flaccida ad insorgenza acuta in soggetti di età compresa tra 0 e 14 anni da parte del Referente regionale, al Ministero della Salute e all'ISS e dovranno essere raccolti dei dati anagrafici, clinici ed epidemiologici sul caso attraverso scheda di notifica predisposta dall'ISS. I campioni di feci, siero o altri materiali biologici saranno inviati all'ISS e utilizzati per l'isolamento di virus e per la determinazione del titolo anticorpale antipolio o verso altri enterovirus.

### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- potenziamento della rete di sorveglianza delle paralisi flaccide acute con particolare riferimento al Veneto;
- verifica della circolazione di poliovirus selvaggi o vaccinali retro mutati in individui immunodeficienti, attraverso l'arruolamento di soggetti con agammaglobulinemia (XLA) in collaborazione con l'Associazione Immunodeficienze Primitive (AIP);
- verifica della circolazione ambientale dei poliovirus selvaggi o vaccino-derivati e di altri enterovirus attraverso studi pilota nel Veneto e in zone di particolare interesse individuate dall'ISS;
- trattamento dei soggetti con paralisi flaccida o altre neuropatie in fase acuta, anche dal punto di vista chirurgico ortopedico "in sede", quando necessario, e la costruzione di un percorso riabilitativo adeguato che conduca al più alto grado di recupero di autonomia funzionale per i pazienti;
- implementazione di un centro di alta specializzazione in Italia che possa essere di riferimento per tale patologia nel Paese.

### **Trasferibilità dei risultati**

I risultati del progetto saranno trasferiti alla comunità scientifica nazionale e internazionale attraverso articoli scientifici, linee guida e documenti ufficiali, che forniranno informazioni sulla sorveglianza del poliovirus e di altri enterovirus nei pazienti con paralisi in Italia (come richiesto dalla WHO nell'*Expanded Program on Immunization*, EPI).

Verranno stabilite delle linee guida per il miglioramento dell'approccio medico, infermieristico, chirurgico ortopedico e riabilitativo per i casi di paralisi flaccida in tutta Italia con la contestuale formazione del personale sanitario e lo sviluppo di campagne educazionali di livello nazionale in merito a tale problematica.

**Esposizione ad inquinanti indoor: linee guida per la valutazione dei fattori di rischio in ambiente scolastico e definizione delle misure per la tutela della salute respiratoria degli scolari e degli adolescenti (*Indoor-School*) programma CCM**

L'inquinamento degli ambienti confinati (indoor) è un determinante importante per la salute della popolazione generale, specialmente per gruppi di popolazione suscettibili, quali bambini e adolescenti che trascorrono la maggior parte del tempo in ambienti confinati. L'ambiente indoor contribuisce in maniera determinante all'esposizione totale agli inquinanti, molti dei quali hanno concentrazione maggiore all'interno.

Tra le fonti di inquinamento, gli allergeni indoor sono una delle principali cause di sensibilizzazione nonché di esacerbazione e scatenamento di attacchi acuti di asma. In particolare, gli ambienti scolastici sono luoghi ad alta densità di popolazione in cui possono essere introdotte diverse tipologie di allergeni che possono permanere a lungo nel luogo in cui sono stati introdotti se non si interviene con una bonifica ambientale adeguata.

L'esposizione ad inquinanti indoor può interferire con la normale crescita della funzione respiratoria e può determinare effetti infiammatori a livello delle vie aeree. Malattie allergiche respiratorie come l'asma e la rinite hanno mostrato negli ultimi anni un incremento parallelo all'aumento dell'urbanizzazione. Recenti studi hanno dimostrato che gli effetti avversi della scarsa qualità dell'aria indoor si manifestano anche in termini di ridotto rendimento lavorativo o scolastico e una rilevante carica allergenica in ambienti indoor può condizionare la presenza di patologie respiratorie allergiche.

**Risultati attesi nel triennio**

Studi precedenti hanno evidenziato non soltanto la cattiva IAQ delle scuole italiane ma anche come sia possibile valutare la scarsa consapevolezza del problema da parte delle autorità scolastiche. Da questi presupposti la progettualità esposta mira a verificare il grado di efficacia dell'incremento del livello di consapevolezza in termini di miglioramento sia dell'IAQ scolastica sia delle condizioni di salute dei ragazzi, analizzando realtà locali di sette Regioni d'Italia (due nel Nord, due nel Centro, uno nel Sud e le due isole maggiori). Dalla elaborazione dei risultati di tale studio si intende ottenere dati utili all'implementazione delle linee guida sul controllo dei rischi dell'esposizione a una cattiva qualità dell'aria indoor per malattie respiratorie e allergiche nelle scuole primarie e secondarie di primo grado.

**Trasferibilità dei risultati**

Recenti studi hanno dimostrato che gli effetti avversi della scarsa qualità dell'aria indoor si manifestano anche in termini di ridotto rendimento lavorativo o scolastico, mentre una rilevante carica allergenica negli ambienti indoor può condizionare la presenza di patologie respiratorie allergiche. La prevenzione e il controllo delle patologie correlate agli ambienti indoor sono obiettivi prioritari della Strategia per l'ambiente e salute dell'UE: l'iniziativa "SCALE" identifica come prioritaria, per lo sviluppo umano ed economico, la protezione della salute dei bambini dalle minacce dell'ambiente, compresi gli ambienti indoor.

Risulta pertanto evidente come questa problematica possa avere una grande rilevanza e un impatto diretto sia per le autorità scolastiche che devono garantire un ambiente idoneo a favorire il maggior rendimento scolastico possibile, sia a livello dell'SSN per ciò che riguarda la prevenzione delle malattie respiratorie.

### **Quality Control Tests for Human Vaccines and Sera**

Nell'ambito delle procedure definite di *twinning* per i Paesi che sono in predicato per accedere alla UE è stato lanciato un bando di progetto focalizzato sul trasferimento di metodi analitici da un OMCL dell'UE all'equivalente Laboratorio turco. Il settore in cui tali metodi analitici dovevano operare era quello del controllo di sieri e vaccini ad uso umano, settore che costituisce missione principale del CRIVIB, che infatti sottopone al controllo lotti di tali prodotti, impegnando diversi saggi analitici, al fine di accertare che la qualità dichiarata dal produttore sia realmente presente nei lotti stessi. Il progetto è stato articolato al termine di una complessa fase di avvio che, in particolare, ha contemplato la definizione dei metodi da trasferire dall'ISS ai colleghi turchi, con un elenco dettagliato degli stessi e delle tempistiche di massima da rispettare. Vista la grande eterogeneità dei metodi da trasferire, alcuni molto particolari e non disponibili in ISS, è stato avviato un approccio intermedio che puntava alla ricerca di un junior partner che potesse affiancare l'Istituto e completare l'elenco delle metodiche richieste e mancanti. Tale partner è stato identificato nel *National Center of Infectious and Parasitic Diseases* di Sofia, con il quale è stato proposto un progetto divenuto definitivo nel corso del 2011 e che verrà avviato nel corso del 2012.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto è basato sulla necessità di trasferire metodi disponibili in Italia e in Bulgaria, adeguati al controllo di una serie di prodotti quali vaccini e sieri. Pertanto i risultati attesi saranno prevalentemente legati alla pianificazione e attuazione del trasferimento di 42 metodi, accompagnato dal trasferimento di un sistema di procedure per la gestione tali metodi, nel rispetto dei requisiti della norma ISO 17025. Il trasferimento dovrà avvenire in una certa sequenza largamente concordata, con tempi certi e attività pianificate. Alcuni metodi prevedono la attenta analisi presso i Laboratori di Ankara circa le strutture necessarie, e dunque il primo risultato sarà rappresentato dalla definitiva pianificazione dell'intervento di trasferimento. Il secondo risultato sarà il trasferimento del metodo in senso operativo, con l'esecuzione dei saggi presso Ankara, a seguito anche di un periodo di formazione teorica che gli esperti italiani e bulgari andranno a sviluppare in Turchia. Infine, il terzo risultato si baserà sulla acquisizione *in situ* della metodica, che potrà essere eseguita autonomamente da personale locale. Al termine di queste varie fasi, il risultato finale sarà costituito dalla possibilità per tutto il sistema sviluppato di essere sottoposto ad audit contro le ISO 17025 da parte delle autorità di Strasburgo (EDQM) e da parte dell'ente accreditante turco (Turkak).

#### **Trasferibilità dei risultati**

Come descritto nel progetto stesso, al termine dei due anni sono previsti una serie di *deliverable* che sono costituiti essenzialmente da metodi analitici, che devono essere trasferiti dall'Italia e dalla Bulgaria in funzione di un piano approvato. Il trasferimento dei metodi deve essere accompagnato da una fase preparatoria, che costruisca attorno ai metodi da trasferire un idoneo sistema procedurale, basato sulla creazione di un Sistema di Assicurazione della Qualità che dovrà essere pronto per la fine del progetto, ed essere sottoposto ad audit da parte degli organismi europei di Strasburgo e dell'ente accreditante turco secondo le norme ISO 17025. Il progetto è estremamente applicativo e i risultati prodotti saranno costituiti proprio dai metodi trasferiti e dalla organizzazione dell'audit secondo il progetto stesso.

**Studi di messa a punto del saggio *Single Radial Diffusion* (SRD) per determinare la concentrazione di antigene HA nei vaccini influenzali, finalizzati al miglioramento dell'accuratezza e precisione del metodo**

Un parametro critico nella valutazione di un lotto di vaccino influenzale da parte dell'Autorità di controllo prima della sua immissione in commercio (*Batch Release*) è il contenuto di antigene HA (*potency*), effettuata mediante un saggio di immunodiffusione radiale (SRD). L'SRD è attualmente il metodo accettato dalle principali Farmacopee mondiali, a seguito di numerosi studi collaborativi volti a migliorare la riproducibilità del metodo e quindi la standardizzazione dei vaccini. L'esperienza della pandemia influenzale del 2009 ha evidenziato tuttavia alcune criticità che fino ad allora non erano emerse in modo evidente: i) la necessità di una più accurata calibrazione degli antigeni di riferimento mediante metodiche di tipo fisico-chimico meno soggette a variabilità (es. spettrometria di massa); ii) la necessità di definire meglio la robustezza del metodo in sede di convalida, valutando l'influenza di parametri finora trascurati (es. il tempo di incubazione antigene/detergente o la sostituzione degli antisieri); iii) il fatto che i protocolli SRD possono differire in modo significativo da laboratorio a laboratorio. Tali fattori hanno determinato in alcuni casi un'oggettiva difficoltà a determinare il contenuto di antigene nei vaccini, come evidenziato anche dalla WHO. Questo progetto si propone di contribuire al miglioramento dell'accuratezza del saggio SRD, anche attraverso la partecipazione a studi collaborativi con altri OMCL sia europei che di altri Paesi.

**Risultati attesi nel triennio**

Si prevede che, alla fine del triennio, si arrivi: i) a una maggiore precisione nella calibrazione degli antigeni di riferimento; ii) ad una migliore valutazione della robustezza del metodo che tenga conto dell'influenza di parametri quali, per es., il tempo di incubazione antigene/detergente, lotti diversi dello stesso antisiero, ecc.; iii) alla definizione di un protocollo SRD universale. Questi risultati saranno ottenuti grazie anche a studi collaborativi con altri laboratori, europei ed extraeuropei, coinvolti nel *Batch Release* dei vaccini influenzali. Obiettivo ultimo sarà la messa a punto di reagenti di riferimento e protocolli di convalida volti a una più accurata standardizzazione del contenuto di antigene HA nei vari vaccini in commercio e una loro maggiore confrontabilità anche in relazione all'immunogenicità.

**Trasferibilità dei risultati**

I reagenti di riferimento e i protocolli (di convalida e di saggio) dell'SRD così modificati potranno essere trasferiti ad altri laboratori nazionali di controllo nonché alle ditte vaccinogene, per arrivare ad una migliore standardizzazione e concordanza del contenuto antigenico.

**Valutazione di possibili metodiche alternative al saggio SRD per determinare la concentrazione di antigene HA nei vaccini influenzali**

Un parametro critico nella valutazione di un vaccino influenzale da parte dell'Autorità di Controllo prima della sua immissione in commercio è il contenuto di antigene HA (*potency*), effettuata mediante un saggio di immunodiffusione radiale (SRD). L'SRD è attualmente il metodo accettato in Farmacopea Europea. Si tratta di un test laborioso e lungo, richiede la produzione annuale di antigeni e anticorpi specifici di riferimento ed è caratterizzato da una spesso elevata variabilità. L'esperienza della pandemia influenzale del 2009 ha evidenziato la necessità di ridurre drasticamente i tempi richiesti per la produzione di un vaccino influenzale. È quindi necessario sviluppare metodi di misurazione del contenuto di HA più rapidi e precisi di quello attuale. Sono stati recentemente riportati studi preliminari per la

quantificazione dell'HA mediante metodi alternativi, tra i quali HPLC, capture ELISA, risonanza plasmonica di superficie (*Surface Plasmon Resonance*, SPR), spettrometria di massa (MS) ecc. Affinché questi nuovi approcci possano essere considerati una valida alternativa al test SRD, occorre verificarne l'utilizzo su molteplici ceppi e vaccini virali, e valutarne la correlazione con l'efficacia vaccinale. Scopo di questo progetto è la messa a punto e il confronto di metodiche anticorpo-dipendenti (es. capture ELISA e SPR, e anticorpo- indipendenti – HPLC e/o MS) per misurare la concentrazione di HA nei vaccini influenzali e valutarne la potenzialità come saggi di *potency* dei vaccini influenzali.

#### **Risultati attesi nel triennio**

La messa a punto di metodiche quali capture ELISA, SPR, HPLC e MS per la quantificazione dell'HA dei vaccini influenzali permetterà di:

- valutare l'utilizzabilità del saggio su ceppi influenzali di tipi e sottotipi diversi (in particolare A/H1, H3, H5, H7, e B);
- verificare la sensibilità e la riproducibilità del test in confronto al saggio SRD, tramite studi collaborativi inter-laboratorio;
- valutare il vantaggio in termini di riduzione dei tempi di esecuzione, di accuratezza nella quantificazione, e di abbattimento dei tempi necessari per la produzione dei reagenti di referenza e quindi del rilascio dei lotti di vaccino sul mercato.

#### **Trasferibilità dei risultati**

I protocolli elaborati per l'esecuzione di saggi per la determinazione della concentrazione di antigene HA nei vaccini anti influenzali basati su metodiche alternative al test SRD, da utilizzarsi durante la fase di *Batch Release* di un vaccino da parte del network degli OMCL potranno essere trasferiti anche ad altri OMCL per una valutazione/validazione interlaboratorio e per giungere ad una necessaria armonizzazione dei metodi di valutazione della *potency* dei vaccini influenzali.

### **Studio dell'eziologia e dell'incidenza delle paralisi flaccide acute in Italia. Ricerca di poliovirus in soggetti con immunodeficienza e nell'ambiente**

Con la risoluzione WHA 41.28 5/1988, la WHO ha incluso nel suo *Expanded Program on Immunization* l'eradicazione mondiale della poliomielite. Tale obiettivo poggia su tre requisiti: i) aumento dei livelli di immunizzazione tramite vaccinazione; ii) miglioramento della sorveglianza dei casi di AFP; iii) sorveglianza dei poliovirus selvaggi nell'ambiente. La sorveglianza delle AFP è considerata dalla WHO il sistema più affidabile per accertare l'eradicazione e dovrà continuare in ogni Paese fino al raggiungimento della certificazione dell'eradicazione del poliovirus selvaggio e della poliomielite a livello mondiale. L'Italia è un Paese a rischio di importazione di questi virus da aree dove persistono focolai epidemici di polio selvaggio e da paesi in cui continua la vaccinazione con vaccino Sabin. La WHO ha stabilito indicatori di qualità della sorveglianza della polio e delle AFP e della performance di laboratorio, il cui raggiungimento è indicativo dell'efficienza del sistema di sorveglianza delle malattie infettive e delle infrastrutture sanitarie. Il progetto include il monitoraggio ambientale in alcune città attraverso la raccolta di liquami per verificare la circolazione residua di virus selvaggi o vaccinali neurovirulenti e lo studio di individui immunodeficienti, nei quali i poliovirus possono attecchire e permanere per lungo tempo nell'intestino creando potenziali *reservoir* di virus.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto consentirà il consolidamento e lo sviluppo operativo della rete di sorveglianza delle AFP già operante in Italia dal 1997 e coordinata dall'ISS e dal Ministero della Salute, indispensabile al fine di controllare e contrastare il rischio di reintroduzione di poliovirus

neurovirulenti, selvaggi o vaccino-derivati. A tali fini, verranno incrementate le attività di sorveglianza dei casi di AFP su base clinica, attraverso il coinvolgimento di medici dei reparti di neurologia, pediatria e malattie infettive. L'ISS effettuerà corsi di addestramento per operatori di laboratori virologici in grado di condurre indagini virologiche di primo livello sui casi di AFP. Verrà inoltre implementato il sistema di ricerca attiva e notifica dei casi di AFP. Saranno introdotte tecniche innovative per la caratterizzazione rapida dei ceppi di poliovirus e altri enterovirus in linea con gli sviluppi tecnologici in ambito WHO. Saranno acquisiti i risultati dell'isolamento e della caratterizzazione di polio e altri enterovirus per lo studio eziopatogenetico delle paralisi non-polio, in particolare le Guillain-Barré. Verrà infine estesa l'attività di ricerca di poliovirus nell'ambiente e lo studio *ad hoc* di soggetti con immunodeficienze, finalizzato all'individuazione di potenziali soggetti *long term excretors*.

**Trasferibilità dei risultati**

I risultati del progetto saranno trasferiti alla comunità scientifica nazionale e internazionale attraverso articoli scientifici, linee guida e documenti ufficiali, e saranno utilizzati per la richiesta di certificazione *polio-free* dell'Italia alla WHO. L'attività della rete sarà presentata e discussa attraverso workshop con i partecipanti alle attività, finalizzati alla messa a fuoco delle problematiche epidemiologiche e di laboratorio critiche per la prosecuzione e il miglioramento delle attività della rete, anche in coordinamento con la WHO.



**Centro  
per la ricerca e la valutazione  
dei prodotti immunobiologici**

---

**Attività di controllo, valutazione, parere**



### **Ammissibilità della sperimentazione clinica di Fase 1 ai sensi del DPR 21/9/2001, n. 439 e del DL.vo 200/2007 in attuazione della direttiva 2005/28/CE**

L'ISS è autorità competente per l'autorizzazione della sperimentazione di farmaci di nuova istituzione e per tutte le sperimentazioni cliniche di fase 1, comprendendo di conseguenza anche le *No First in Human*. Il quadro normativo allo stato attuale è regolato dal DM del 21/12/2007. Tale attività comporta la valutazione dei Dossier (*Investigational Medicinal Product Dossier*, IMPD), presentati da gruppi di ricerca italiani e stranieri, per ottenere l'autorizzazione ad avviare protocolli di sperimentazione clinica con farmaci nuovi.

Secondo il DPR 439 "La sperimentazione clinica di fase 1 comprende un insieme di studi sul volontario sano o ammalato, che riguarda la determinazione del profilo di tollerabilità e quello farmacocinetico-metabolico di un farmaco".

Come conseguenza di ciò, la sperimentazione clinica di fase 1 è il primo gradino nello sviluppo di un nuovo farmaco.

Gli esperti del CRIVIB sono chiamati a formulare parere nell'ambito delle competenze del Centro stesso, cioè su farmaci biologici e biotecnologici di nuova istituzione.

#### **Attività programmata**

Gli esperti del CRIVIB, che dovranno esprimere pareri per le richieste riguardo l'ammissibilità alla sperimentazione clinica di fase 1 ai sensi del DPR 21/9/2001, n. 439 e del DL.vo 200/2007, vengono nominati dal Presidente dell'ISS in base alle loro competenze specifiche.

Questi esperti svolgeranno la loro attività su richiesta della Segreteria Tecnico-Scientifica Comma C dell'ISS che invierà i Dossier da valutare, presentati per ottenere l'autorizzazione alla sperimentazione clinica di fase 1 con nuovi farmaci.

In particolare, gli esperti saranno chiamati ad esprimere parere sulla documentazione relativa ai farmaci biotecnologici e biologici quali gli anticorpi monoclonali, i vaccini, le molecole ricombinanti con potenziale applicazione clinica in vari ambiti quali le malattie infettive, l'oncologia, le malattie allergiche, ecc.

Gli esperti del CRIVIB dovranno valutare, in continuità con già quanto svolto in passato, la qualità dei farmaci (schemi sperimentali di produzione) e la sicurezza virale.

### **Attività di controllo e Sistema di Assicurazione della Qualità (SAQ)**

Il CRIVIB valuta la qualità dei prodotti (farmaci) immunobiologici al fine di garantirne la sicurezza d'uso per l'uomo. Tra i farmaci immunobiologici sono compresi: vaccini batterici e virali per uso umano, emoderivati, plasma pool, anticorpi monoclonali, allergeni. Il CRIVIB valuta altresì la qualità di altri farmaci non-immunobiologici ottenuti mediante l'impiego della tecnologia del DNA ricombinante.

#### – Attività di controllo

- Controllo di Stato (*Batch-Release*), di ciascun lotto, prima dell'immissione in commercio dei prodotti immunobiologici e *Plasma Pool Testing*. Il CRIVIB è il laboratorio ufficiale di controllo dei medicinali (OMCL) dei prodotti immunobiologici e partecipa alla Rete europea dei laboratori di controllo dei farmaci (*OMCL Network*) di tutti gli Stati membri dell'UE coordinato dall'EDQM di Strasburgo. L'emissione di un certificato di *Batch Release* consente la libera circolazione del prodotto in tutti gli Stati membri dell'UE.
- Sorveglianza *post-marketing* della qualità di campioni di farmaci Immunobiologici prelevati dal mercato nazionale, dal mercato europeo nell'ambito dei programmi di *Mutual Recognition Procedure* e *Centrally Authorized Products* (EDQM e EMA).

- Farmacovigilanza di farmaci immunobiologici difettosi: viene eseguito il controllo della qualità su campioni specifici in seguito a segnalazioni di difettosità e di presenza di corpi estranei.
- Attività analitica/sperimentale: comprende lo sviluppo di metodi innovativi alla caratterizzazione e standardizzazione dei farmaci immunobiologici, la partecipazione a studi collaborativi per la valutazione dei saggi analitici e la definizione degli standard di riferimento per la Farmacopea Europea e per la WHO.
- Assicurazione della Qualità (SAQ).  
Il SAQ di CRIVIB è l'insieme di azioni pianificate e sistematiche atte a garantire che le attività soddisfino i requisiti di qualità prestabiliti. Attraverso il SAQ, realizzato in accordo con le Norme ISO 9001:2008 e ISO 17025:2005 per i laboratori di taratura e di prova, il CRIVIB assicura la costanza delle procedure, la utilizzazione di metodiche analitiche opportunamente convalidate, l'uso di apparecchiature opportunamente utilizzate e mantenute e la registrazione di tutte le operazioni effettuate, e fornisce una evidenza esterna della qualità del dato analitico. Il SAQ del CRIVIB è stato ripetutamente sottoposto a visite ispettive da parte di organismi internazionali quali WHO, EMA ed EDQM con esito favorevole.

#### **Attività programmata**

Proseguirà l'attività di controllo sui prodotti immunobiologici attualmente presenti sul mercato ed eventualmente sui nuovi prodotti da registrare e con metodiche che verranno continuamente aggiornate secondo le corrispondenti linee-guida. Il SAQ del CRIVIB, essendo per sua natura un sistema dinamico, verrà aggiornato di continuo per mantenere elevato il livello della qualità del dato analitico. Il SAQ, essendo in continua evoluzione e aggiornamento, permette il miglioramento continuo e una pronta rispondenza ad eventuali nuove esigenze.

#### **Attività di farmacovigilanza (DL.vo 24/4/2006, n. 219)**

L'AIFA dopo aver ricevuto segnalazioni di reazioni avverse, difetti o corpi estranei in campioni di medicinale, da parte di medici, operatori sanitari, e titolari di AIC, richiede all'ISS, quale Laboratorio di Controllo ai fini della "Farmacovigilanza attiva", di eseguire gli accertamenti opportuni, a seconda del quesito e/o del problema riscontrato sul medicinale o sull'effetto da esso provocato.

L'AIFA quindi invia all'ISS la richiesta di eseguire i controlli del caso sul medicinale sul quale sono stati riscontrati difetti di qualità, presenza di corpi estranei, reazione avversa dopo sua somministrazione.

Incarica quindi il Comando Carabinieri per la tutela della Salute di inviare i campioni direttamente all'ISS.

I campioni ricevuti vengono esaminati e controllati dagli esperti del CRIVIB utilizzando i metodi di analisi opportuni al fine dell'emissione del parere.

#### **Attività programmata**

Continuerà l'attività di farmacovigilanza sui prodotti immunobiologici per il prossimo triennio. Sulla base dell'esperienza pregressa, si prevede un carico di lavoro superiore al triennio precedente.

#### **Attività di parere e valutazione di dossier (DL.vo 24/4/2006, n. 219)**

L'attività di valutazione e parere si focalizza sulla valutazione dei dossier di registrazione per gli aspetti di qualità dei farmaci immunobiologici per uso umano quali vaccini,

emoderivati, anticorpi monoclonali e allergeni. Esperti del Centro sono anche responsabili della valutazione dei *Plasma Master File* centralizzati. Infine l'attività di valutazione e parere si esplica anche mediante la partecipazione ai lavori di organismi nazionali e internazionali (EMA, EDQM, WHO, Magistratura, Consiglio di Stato, ecc.).

Il Reparto Prodotti biologici esprime parere, per la parte di competenza (qualità), sui dossier di registrazione di specialità medicinali emoderivati, siano essi di valenza nazionale o europea. Svolge attività di consulenza e parere su problematiche inerenti al plasma e ai suoi derivati. Partecipa, inoltre, con i propri esperti a gruppi di lavoro internazionali quali il *Biologics Working Party* dell'EMA e il Gruppo 6B della Farmacopea Europea.

Il Reparto Vaccini batterici esprime parere, per la parte di competenza (qualità) sui dossier di registrazione di Vaccini batterici. Svolge attività di consulenza e parere su problematiche inerenti ai vaccini batterici e altri medicinali contenenti sostanze di origine batterica. Partecipa, inoltre, con i propri esperti a gruppi di lavoro internazionali quali il Gruppo 15 della Farmacopea Europea.

Il Reparto Vaccini virali (Poliovirus e Rotavirus) esprime parere, per la parte di competenza (qualità), sui dossier di registrazione di questi vaccini e svolge attività di consulenza e parere su problematiche inerenti i vaccini antiPoliovirus, antiRotavirus e anti papillomavirus. Partecipa, inoltre, con i propri esperti a gruppi di lavoro internazionali con l'EDQM e la WHO.

L'Unità Scientifica – Sezione Influenza (USSI) esprime parere, per la parte di competenza (qualità), sui dossier di registrazione di vaccini antinfluenzali, e svolge attività di consulenza e parere su problematiche che riguardano i vaccini antinfluenzali. Esperti dell'USSI hanno anche partecipato e partecipano a gruppi di lavoro internazionali.

L'Unità Scientifica – Sezione Allergeni e Biotecnologici (USSAB) della Segreteria Scientifica svolge attività di consulenza ed esprime parere, per la parte di competenza (qualità), sui dossier di registrazione di specialità medicinali, quali ad esempio allergeni, prodotti ottenuti mediante biotecnologie e anticorpi monoclonali. Relativamente alle problematiche allergologiche, la Sezione gestisce la Banca Dati delle sostanze chimiche sensibilizzanti in collaborazione con il CSC e con il Servizio SIDBAE – Settore informatico, dell'ISS. L'USSAB partecipa, inoltre, con i propri esperti a gruppi di lavoro internazionali.

#### **Attività programmata**

L'attività di parere e valutazione descritta per il CRIVIB proseguirà per tutto il triennio 2012-2014, con un carico di lavoro superiore a quello svolto nel triennio precedente. Tutti i Reparti/Unità continueranno a svolgere la loro attività di valutazione e parere nei loro rispettivi settori.

È prevedibile un incremento delle attività di valutazione di procedure centralizzate e di *scientific advice*, limitate, in precedenza, all'influenza nel contesto della pandemia; tale incremento avverrà nel settore delle molecole ricombinanti, siano esse anticorpi monoclonali che proteine di fusione.

Verranno riproposte dall'AIFA procedure relative a vaccini in generale (influenza e vaccini per altre patologie causate da batteri o virus). Per quanto concerne gli *scientific advice*, le valutazioni che coinvolgeranno gli esperti del CRIVIB sono legate alla comparabilità nei farmaci biosimilari e alle questioni di *Quality by Design*.

È prevista una intensa attività di valutazione di dossier di allergeni. Gli esperti di tale Unità continueranno a partecipare ad un gruppo di lavoro, costituito dall'AIFA, che si occuperà della valutazione dei dossier di registrazione al fine di regolarizzare i prodotti allergenici attualmente in commercio, in ottemperanza alle vigenti norme sull'autorizzazione all'immissione in commercio dei medicinali.

### **Attività di valutazione di dossier di *Plasma Master File (PMF)* centralizzati**

La certificazione di *Plasma Master File (PMF)* mediante procedura centralizzata (EMA) prevede la valutazione dei dossier relativi alla certificazione iniziale, agli aggiornamenti annuali, alle variazioni di tipo IB e di tipo II nonché ai *grouping* di variazioni.

Questa attività ricade nelle competenze del *Biologics Working Party (BWP)* per cui il *Coordinator* previsto per ogni Paese membro è il delegato BWP di quel Paese.

Su richiesta del *Coordinator*, può essere nominato un *Contact Point* che assume i compiti previsti da questa attività che principalmente sono la stesura, secondo una tempistica ben definita, di *Evaluation Report (ER)* per i PMF assegnati dall'EMA e la partecipazione a teleconferenze organizzate dall'EMA prima dell'adozione degli ER da parte del BWP.

Il CRIVIB gestisce questa attività di valutazione in quanto il *Coordinator* è il Direttore del CRIVIB mentre il *Contact Point* afferisce al Reparto Prodotti biologici del CRIVIB.

#### **Attività programmata**

Questa attività di valutazione proseguirà per tutto il triennio. Si prevede un carico di lavoro superiore a quello svolto nel triennio precedente.

### **Attività di valutazione per procedure di *Scientific Advice/Protocol Assistance***

Nel contesto europeo, le procedure di *Scientific Advice/Protocol Assistance* hanno lo scopo di fornire alle aziende produttrici di medicinali indicazioni tecniche e procedurali su aspetti specifici del processo di sviluppo di un farmaco. La procedura, gestita centralmente dall'EMA, inizia quando una Ditta, in una fase precedente alla presentazione di domanda per l'autorizzazione alla commercializzazione, pone specifiche domande rispetto al processo di sviluppo di un farmaco, fornendo documentazione a supporto. Le domande possono riguardare aspetti relativi a qualità/sicurezza da agenti avventizi, allo sviluppo pre-clinico o alla sperimentazione clinica. La procedura viene quindi assegnata a due Paesi membri, a cui viene affidato il ruolo di *coordinator*. Per le procedure di *scientific advice/protocol assistance* assegnate all'Italia, il CRIVIB, dietro richiesta dell'AIFA, svolge attività di parere tecnico per quanto concerne tutte le problematiche di qualità e quelle legate alla sicurezza da agenti avventizi per i farmaci biologici, in particolare vaccini, anticorpi monoclonali e proteine terapeutiche prodotte mediante tecnologia del DNA ricombinante. Il parere emesso consiste in un report in cui le domande vengono singolarmente discusse, sulla base della documentazione a supporto fornita dalla Ditta richiedente. Il parere viene quindi inviato all'AIFA, che lo integra successivamente in un unico report, inclusivo anche delle valutazioni di pre-clinica e clinica eseguite da altri esperti, e lo invia all'EMA. I report dei due paesi *Coordinator* verranno quindi integrati in un unico documento che sarà oggetto di discussione e approvazione al *Biologics Working Party (BWP)* dell'EMA per quanto concerne gli aspetti di qualità/sicurezza da agenti avventizi. Il documento così prodotto sarà infine discusso e approvato presso il *Committee for Human Medicinal Products (CHMP)* dell'EMA a conclusione della procedura, prima dell'invio delle risposte alla Ditta richiedente.

L'attività di parere tecnico da parte del CRIVIB nell'ambito delle procedure di *scientific advice/protocol assistance* richiede e allo stesso tempo facilita il continuo aggiornamento rispetto alle varie problematiche concernenti i processi di produzione di farmaci biologici da parte degli esperti del CRIVIB, nonché relativamente ad altri aspetti quali le problematiche dei farmaci biosimilari e di quelli prodotti in *Quality by Design*. Le richieste di parere da parte dell'AIFA sono frequenti, dal momento che attualmente numerosi farmaci biologici sono in corso di sviluppo da parte delle aziende farmaceutiche.

### **Attività programmata**

Il CRIVIB non dispone di dati certi da cui prevedere quanti pareri relativi al procedure di *scientific advice/protocol assistance* verranno richiesti da parte dell'AIFA. Recentemente, però è stato registrato un incremento di tali procedure che hanno come oggetto aspetti di qualità/sicurezza virale, per cui verosimilmente l'attività di parere per procedure di *scientific advice/protocol assistance* subirà un deciso incremento. È intenzione del CRIVIB proseguire con questo tipo di attività per l'impatto significativo che essa ha nelle interazioni col sistema Europa (e in particolare relativamente alle attività svolte presso il BWP dell'EMA), nell'aggiornamento continuo sullo stato dell'arte dei processi produttivi di farmaci biologici e nell'approfondimento di problematiche specifiche relative allo sviluppo di farmaci biologici. Tutti questi aspetti avranno una ricaduta positiva a largo spettro su tutte le attività svolte dal CRIVIB.

### **Controllo di stato dei vaccini antinfluenzali (Decreto 31 marzo 2008)**

L'USSI effettua attività di Controllo di Stato (*Batch Release*) di tutti i vaccini antinfluenzali, sia stagionali che pandemici, prodotti in Italia, sia per il mercato nazionale che europeo ed extraeuropeo. Le procedure di *Batch Release*, secondo le linee guida dell'EDQM, prevedono l'esame dei protocolli di produzione e controllo relativi ad ogni singolo lotto, nonché un'attività sperimentale finalizzata a verificare la rispondenza del vaccino, in termini di qualità e sicurezza, ai requisiti stabiliti dalle Farmacopee Italiana ed Europea. Su ciascun lotto di vaccino vengono quindi eseguiti saggi per la determinazione del contenuto antigenico (*potency test*) di ciascuno dei ceppi virali che lo compongono, un saggio per la determinazione del contenuto di endotossina (*LAL test*), un saggio di *appearance* e, nel caso di vaccini sub-virionici ("a subunità"), un saggio di purezza (*purify test*). In parallelo, vengono valutati i protocolli di produzione e controllo della Ditta produttrice, relativi a ciascun *batch*.

Negli ultimi anni il numero dei lotti inviati al controllo è progressivamente aumentato, in risposta ad una campagna di promozione della vaccinazione, svolta congiuntamente dall'ISS e dal Ministero della Salute. Inoltre il verificarsi della pandemia influenzale nel 2009 ha determinato un aumento di tre volte del numero di lotti sottoposti a controllo, negli anni 2009-2010, al fine di fare fronte alle richieste di vaccinazione su vasta scala sia in Italia che in Europa.

### **Attività programmata**

Proseguiranno le attività di controllo e valutazione dei vaccini influenzali stagionali, secondo quanto previsto dai decreti legislativi. Si prevede che saranno sottoposti al controllo di Stato circa 170 lotti di vaccino/anno.

Inoltre, in seguito alla recente registrazione in ambito europeo (EMA) di vaccini pandemici e pre-pandemici, saranno messe a punto le procedure e i saggi necessari per l'eventuale valutazione e rilascio dei relativi lotti, al fine di essere preparati a fronteggiare eventuali nuove emergenze pandemiche.

### **Controllo di Stato dei vaccini antipolio e anti-rotavirus (Decreto 31 marzo 2008)**

Il Reparto Vaccini virali (RVV) effettua attività di controllo (*Batch Release*) per i vaccini poliovirus e attività *post-marketing* per il vaccino polio inattivato di Salk e i vaccini contro i Rotavirus e il Papilloma.

- Vaccino polio Sabin

L'RVV controlla i vaccini antipolio orali (*Oral Polio Vaccine*, OPV) prodotti in Italia per il mercato estero. Sulle madri di vaccino monovalente (sierotipi 1, 2 e 3) si esegue

il saggio di neurovirulenza su scimmia (*Monkey NeuroVirulence Test*, MNVT), esaminando preparati istologici dell'SNC. Per limitare l'uso di primati, sono stati sviluppati metodi alternativi per il saggio di neurovirulenza: una PCR quantitativa per stabilire la frazione di virus retromutanti, potenzialmente neurovirulenti, presenti nel vaccino (*Mutant analysis by PCR and restriction enzyme cleavage*, MAPREC) e un saggio di neurovirulenza *in vivo* su topi transgenici per il recettore di poliovirus. Sul prodotto finito, tOPV (*Trivalent oral polio vaccine*), mOPV (*Monovalent oral polio vaccines*) e bOPV (*Bivalent oral polio vaccine*), si eseguono pre-marketing saggi *in vitro* di identità, potenza e stabilità termica. Il *Batch Release* comprende, inoltre, l'esame dei protocolli di produzione e controllo forniti dalla Ditta.

– Vaccino polio Salk

In Italia, la vaccinazione obbligatoria viene effettuata (Decreto 18/6/2002, Ministero della Salute) somministrando quattro dosi di vaccino inattivato di Salk (*Inactivated Poliovirus Vaccine*, IPV), in forma singola o combinata con altri vaccini. L'ISS effettua il controllo post-marketing su alcuni lotti di vaccino IPV, importati da altri Paesi europei attraverso la titolazione dell'antigene D dei tre sierotipi di poliovirus, usando un saggio (ELISA).

– Vaccini contro i rotavirus

Il rotavirus è il principale agente causale di enterite acuta nell'infanzia sia nei Paesi in via di sviluppo che in quelli industrializzati. In Italia sono stati registrati e commercializzati due vaccini contro l'infezione da rotavirus (il Rotarix® che è *Human-derived monovalent (G1, P[8]), live, attenuated* e il RotaTeq® *Bovine-human reassortant, pentavalent (contains G1, G2, G3, G4, P[8] antigens) live, attenuated*). L'RVV effettua il controllo post-marketing su alcuni lotti di vaccino con metodiche convenzionali o molecolari.

– Vaccini contro il papilloma virus (HPV)

Può essere causa di infezioni genitali femminili e del tumore della cervice uterina. L'RVV effettua il controllo post-marketing su alcuni lotti di vaccino HPV, importati da altri Paesi europei che prevede la titolazione degli antigeni con un saggio (ELISA).

### **Attività programmata**

Per l'attività di *Batch Release* del vaccino antipolio attenuato di Sabin OPV si prevede nei prossimi tre anni il controllo annuale di circa dieci sospensioni madri (*Bulks*) e per il prodotto finito, di circa 130 lotti (50 trivalenti, 30 monovalenti, 50 bivalenti). È previsto il controllo della neurovirulenza su topi transgenici per le sospensioni madri (*Bulks*) di tipo 1 e 3 e l'esecuzione presso l'ISS del MAPREC sia per il sierotipo 3 che 1. Per i vaccini antirotavirus e anti-papilloma è prevista la sorveglianza post-marketing su alcuni lotti importati da altri Paesi europei e commercializzati in Italia. Tale controllo prevede la titolazione degli antigeni e il saggio di identità con metodi convenzionali o di biologia molecolare.

### **Controllo di Stato dei vaccini batterici (Decreto 31 marzo 2008)**

Il Reparto Vaccini batterici (RVB) effettua il controllo di stato dei vaccini batterici (Decreto 31/3/2008, Ministero della Salute, Prescrizioni e procedure tecniche per l'esecuzione dei lotti di medicinali immunologici e di medicinali derivati dal sangue e dal plasma umani) eseguendo analisi di revisione su vaccini batterici, a singolo o multi-componenti, per uso umano in accordo con le linee guida della Direzione europea della qualità dei medicinali (EDQM, Strasburgo, Francia) nel caso di vaccini per il mercato europeo o in accordo con le linee guida della WHO nel caso di vaccini per il mercato non

europeo. Il controllo porta alla emissione di un certificato di *Batch Release* a valenza internazionale.

Sui vaccini batterici viene svolta anche un'attività di controllo, in collaborazione con AIFA, secondo il "Programma di controllo annuale della composizione dei medicinali – e farmacovigilanza" (programma di controllo post-marketing) (DL.vo 24/4/2006, n. 219).

L'RVB esegue anche analisi di propria competenza su vaccini nel caso di reazioni avverse o presenza di difetti.

In particolare l'RVB controlla ai fini dell'emissione del certificato di *Batch Release* i vaccini anti tetano, anti difterite, anti *Haemophilus influenzae* tipo b e anti pertosse. Per un problema di mutuo riconoscimento del certificato di *Batch Release* tra i vari Paesi membri del Network europeo degli OMCL, le analisi che vengono eseguite sui vaccini sono stabilite dal Network in accordo con EDQM. Le analisi che si eseguono comprendono saggi di tipo chimico, fisico o immunochimico, tranne il saggio di attività biologica per i vaccini anti tetano, anti difterite e anti pertosse che prevede l'uso di cavie e topi.

#### **Attività programmata**

L'RVB continuerà l'attività di *Batch Release* dei vaccini anti difterite, anti tetano, anti *Haemophilus influenzae* per il mercato italiano e per i Paesi non UE. È prevista la sorveglianza post-marketing dei vaccini che vengono immessi sul mercato italiano con un certificato di *Batch Release* emesso da altro OMCL del Network. Tale controllo prevede una analisi dell'aspetto del vaccino, ispezione del confezionamento e relative data di scadenza, determinazione del pH, contenuto di endotossine, identità e di altri parametri variabili da prodotto a prodotto.

Al fine di ampliare lo spettro di prodotti controllabili durante la sorveglianza post-marketing si procederà a mettere a punto altri metodi di analisi. La difficoltà odierna è presentata dal fatto che un metodo non è applicabile a tutti i prodotti, ma necessità di una convalida prodotto specifica.

RVB parteciperà agli studi collaborativi che verranno organizzati da EDQM o WHO per la qualificazione di nuovi standard internazionali per difterite, tetano, polisaccaridi/glicoconiugati o altre sostanze di riferimento per il controllo dei vaccini. RVB parteciperà agli eventuali studi di valutazione esterna di qualità indicati per la propria attività, al fine di valutare la propria performance, come richiesto dalla norma UNI CEI ISO/IEC 17025.

#### **Controllo di Stato dei vaccini virali anti-Morbillo-Parotite-Rosolia (MPaR), Varicella, Epatite (DM 31/3/2008)**

Tra le attività del CRIVIB è incluso il controllo di vaccini virali quali il morbillo, la parotite, la rosolia, la varicella e altri. Poiché al momento attuale non è stato possibile ancora trasferire la capacità analitica dal Dipartimento MIPI a CRIVIB, quest'ultimo ha stipulato con il Dipartimento MIPI, in particolare con il Reparto Malattie virali e vaccini attenuati (RMVVA) e il Reparto Epatiti virali (REV), un accordo per l'espletamento di attività per il controllo dei vaccini virali anti-varicella, anti-morbillo-parotite-rosolia (MPaR), anti-epatite, ai fini dell'attività di controllo per il *Batch Release*, la sorveglianza post-marketing e la farmacovigilanza per i medicinali difettosi.

In particolare, il Reparto MVVA effettua attività di controllo per il *Batch Release* dei vaccini MPaR, monovalenti e polivalenti.

Per il vaccino anti-varicella, l'Italia ha il ruolo di *Reference Member State* ed effettua attività di controllo per il *Batch Release* per il mercato EUROPEO.

### **Attività programmata**

Continuerà anche per il prossimo triennio l'attività per il controllo dei vaccini virali MPaR, anti-epatite, ai fini dell'attività di controllo per il *Batch Release*, la sorveglianza post-marketing e la farmacovigilanza per i medicinali difettosi, sulla base delle richieste che perverranno al CRIVIB. Tuttavia il processo di trasferimento di altre attività da MIPI a CRIVIB procederà in funzione degli sviluppi della situazione corrente, portando potenzialmente a diminuire il numero dei controlli effettuati dal Dipartimento MIPI e ad aumentare quelli svolti autonomamente dal CRIVIB.

### **Controllo di stato delle immunoglobuline normali e specifiche (DM 31/3/2008; Legge 21/10/2005, n. 219; DL.vo 24/4/2006, n. 219)**

Per ogni lotto di prodotto sottoposto a controllo di stato il Reparto Prodotti biologici verifica, mediante saggi di Farmacopea Europea o saggi opportunamente messi a punto e convalidati, la concentrazione e composizione proteica, la distribuzione dei pesi molecolari, il tempo di solubilizzazione, l'attività specifica e il contenuto di anticorpi anti-D nelle immunoglobuline endovenose (controlli di fase 1). Se necessario, si procede anche alla verifica di uno o più dei seguenti parametri: attività anticomplementare, integrità del frammento Fc, attivatore della precallicreina, osmolalità, sterilità e pirogeni (controlli di fase 2). Tale controllo si concretizza con l'emissione, quando tutti i test effettuati hanno avuto esito favorevole, di un certificato di *Batch Release* che consente la libera circolazione del prodotto in tutti gli Stati membri dell'UE. In caso di esito non favorevole anche di uno solo dei parametri saggiati, verrà emesso un certificato di non-Compliance che sarà notificato a tutti gli OMCL dell'UE.

Il consuntivo dei controlli effettuati è oggetto di un rapporto annuale presentato agli OMCL. Questa attività, a cui fa da supporto una banca-dati collegata alla banca-dati OCABR dell'EDQM, viene svolta in un sistema di assicurazione della qualità conforme alla Norma UNI/CEI/EN/ISO/IEC 17025:2005 che prevede il continuo aggiornamento e la convalida delle metodiche analitiche impiegate.

### **Attività programmata**

Sulla base dell'esperienza pregressa, si prevede il controllo di circa 150-180 lotti di immunoglobuline per anno, per un totale di 450-550 lotti nel triennio 2012-2014.

### **Coordinamento relativo alla attività del Gruppo di Biotecnologia/Farmaci dell'Agenzia europea EMA**

Presso l'Agenzia europea per la valutazione dei medicinali, ora Agenzia europea per i medicinali (EMA) operano, a supporto del Comitato per le specialità medicinali (CHMP) numerosi gruppi di lavoro con compiti precisi. Tra questi il Gruppo di Biotecnologie/Farmaci, ora Gruppo per i Biologici (BWP), riveste un ruolo fondamentale in quanto nel suo ambito vengono valutati aspetti generali e particolari afferenti alle problematiche dei farmaci biologici, biotecnologici, immunologici e medicinali per terapie innovative.

Una delle principali attività qualificanti di tale gruppo è la produzione di Linee Guida relative a varie problematiche tutte di estrema attualità. La partecipazione ai lavori del Gruppo si concretizza, oltre che con la partecipazione alle riunioni mensili a Londra, anche nel produrre contributi e pareri sia in fase di stesura che di valutazione delle varie Linee Guida.

Inoltre, presso il BWP vengono regolarmente esaminati i moduli relativi alla qualità (modulo 3) delle varie domande di registrazione centralizzata per farmaci afferenti all'EMA. In tal senso, le attività svolte hanno aumentato la partecipazione dell'Italia anche a livello di gestione in qualità di *rapporteur* e *co-rapporteur* in procedure che hanno riguardato

anticorpi monoclonali e vaccini, nonché di procedure per i Plasma Master File centralizzati, una tipologia di registrazione centralizzata recentemente introdotta. Il Direttore del CRIVIB è membro al BWP per l'Italia.

Per quanto riguarda le attività in ambito dell'EDQM, significativo è il coinvolgimento degli esperti del CRIVIB a vario livello. In particolare, il Direttore del CRIVIB riveste attualmente il ruolo di chairman del Gruppo di esperti sugli allergeni, e altri esperti del CRIVIB appartengono a gruppi della Farmacopea quali il Gruppo 6B emoderivati e il gruppo 15, nonché a gruppi di lavoro tematici quali quello sugli emoderivati e quello sui vaccini. Inoltre il Direttore del CRIVIB è membro dell'*Advisory Group* della rete degli OMCL relativo alle attività di controllo dei Medicinali Biologici (AdG-OCABR ) con risvolti in particolare a livello delle problematiche di *Batch Release*. Il Direttore del CRIVIB è anche delegato per l'Italia nella commissione di Farmacopea Europea

#### **Attività programmata**

Nell'ambito della attività EMA tutte le attività previste continueranno e aumenteranno di intensità con impatto sui carichi di lavoro degli esperti del CRIVIB. Tutte le attività svolte si prolungheranno nel periodo 2012-2014 con un aumento considerevole. Il maggiore interesse sarà rivolto ai prodotti biosimilari, quelli per *trial* clinici e quelli derivati da plasma umano. L'esperienza maturata a livello di BWP continuerà ad essere di supporto alla elaborazione di pareri per l'AIFA. Tale attività verrà pertanto ovviamente continuata per tutto il triennio cui il presente progetto si riferisce.

Nell'ambito delle attività dell'EDQM tutte le attività menzionate verranno mantenute nel triennio 2012-2014 e vedranno il sempre maggiore coinvolgimento di tutti gli esperti del CRIVIB.

#### **Esame di richieste di autorizzazione alla sperimentazione animale, in deroga ai sensi degli art. 8-9 del DL.vo 116 del 27/1/1992**

Espressione del parere relativo ad autorizzazione alla sperimentazione animale, in deroga agli art. 8-9 DL.vo 116 del 27/1/1992, da parte di esperti del CRIVIB nell'ambito delle competenze del Centro stesso. Tale attività si esplica valutando l'opportunità e quindi la necessità di impiegare modelli animali in protocolli sperimentali, proposti da gruppi di ricerca pubblici e privati italiani, per lo studio di patologie immunologiche, comprese le malattie allergiche.

#### **Attività programmata**

L'attività verrà svolta, come nel passato, dagli esperti del CRIVIB, nominati dal Direttore del CRIVIB sulla base delle competenze individuali, sempre nell'ambito della missione del CRIVIB, su richiesta di parere da parte del Direttore del Servizio Biologico e per la Gestione della Sperimentazione Animale (SBGSA).

#### **Partecipazione a studi di proficiency e/o a studi collaborativi internazionali nell'ambito dell'attività di controllo**

Il monitoraggio della performance di un laboratorio che opera in un sistema di assicurazione della qualità è un prerequisito fondamentale per assicurare l'affidabilità delle metodiche analitiche utilizzate.

La Farmacopea Europea infatti sottolinea che la partecipazione a programmi di VEQ è una importante procedura di *quality assurance* in particolare delle metodiche PCR e, pertanto gli OMCL, in quanto enti certificanti, partecipano regolarmente agli studi di *proficiency* organizzati dall'EDQM.

Il Reparto Prodotti biologici partecipa agli studi di *proficiency* (PTS) e di studi di standardizzazione biologica (BSP), organizzati dall'EDQM. Inoltre partecipa agli studi collaborativi organizzati da WHO per la messa a punto di metodiche analitiche o per la definizione di standard internazionali.

Il Reparto Vaccini batterici partecipa ai PTS e BSP, organizzati dall'EDQM. Inoltre partecipa agli studi collaborativi organizzati da WHO per la messa a punto di metodiche analitiche o per la definizione di standard internazionali.

L'RVV partecipa ai PTS e BSP, organizzati dall'EDQM e dalla WHO per i vaccini per polio e rotavirus; partecipa agli studi collaborativi organizzati dalla WHO per la messa a punto di metodiche analitiche *in vivo* e *in vitro* o per la definizione di standard internazionali.

L'USSI partecipa ai PTS e BSP, organizzati dall'EDQM e agli studi collaborativi organizzati dalla WHO per la messa a punto di metodiche analitiche o per la definizione di standard internazionali per i vaccini influenzali.

L'USSAB partecipa agli studi collaborativi organizzati dall'EDQM nell'ambito del programma BSP 090. Tale programma prevede lo sviluppo di standard di riferimento di Farmacopea Europea e la convalida di metodiche ELISA da utilizzare per il dosaggio degli allergeni maggiori nelle preparazioni allergeniche per diagnosi e immunoterapia delle patologie allergiche.

#### **Attività programmata**

Il CRIVIB continuerà la partecipazione regolare ai PTS e BSP organizzati annualmente dall'EDQM o da altri organismi internazionali, quali la WHO.

#### **Plasma pool testing (Farmacopea Europea "Human plasma for fractionation"; DM 29/3/1999)**

Su ogni *pool* di plasma per frazionamento inviato al controllo, il Reparto Prodotti biologici esegue la ricerca dei seguenti marcatori virali: anticorpi anti-HIV 1/2, antigene di superficie dell'HBV (HBsAg) e HCV RNA mediante tecnica di amplificazione genica (NAT). Inoltre, come previsto dalla Farmacopea Europea, sui plasma *pool* utilizzati per la produzione di immunoglobuline anti-D viene eseguita anche la determinazione quantitativa del parvovirus B19 DNA, mentre i *pool* destinati alla produzione di plasma virus-inattivato sono sottoposti sia alla ricerca di parvovirus B19 DNA che di HAV RNA.

In caso di esito favorevole delle analisi è prevista l'emissione di un certificato di approvazione dei plasma *pool* riconosciuto da tutti OMCL dell'UE. In caso contrario, l'esito non favorevole comporta il blocco di tutti gli emoderivati (immunoglobuline, albumine, fattori della coagulazione, ecc.) nella cui produzione è implicato il plasma *pool* esaminato.

Per mantenere elevato il livello di tale attività è indispensabile utilizzare metodiche sottoposte a continuo aggiornamento e opportuna convalida e operare in un sistema di assicurazione della qualità, come richiesto dalle linee-guida europee.

#### **Attività programmata**

Sulla base dell'esperienza pregressa, si prevede il controllo di 400-500 plasma *pool* per anno, per un totale di 1.200-1.500 plasma *pool*.

#### **Programma di controllo annuale della composizione dei medicinali (DL.vo 24/4/2006, n. 219)**

L'AIFA, su proposta dell'ISS, sentita la CUF e il CSS, predispone annualmente un programma di controllo sorveglianza (*post-marketing*) della composizione di alcune specialità medicinali, la cui attuazione è affidata all'Istituto.

In questo ambito il Reparto Prodotti biologici effettua controlli *post-marketing* sulle immunoglobuline per uso terapeutico. Durante il loro periodo di validità potrebbero verificarsi situazioni in cui l'attività biologica e/o le caratteristiche chimico-fisiche subiscano un'alterazione tale da renderle non più idonee alla somministrazione.

Il Reparto Vaccini batterici effettua controlli *post-marketing* sui vaccini batterici e sui vaccini combinati batterici-virali. Durante il loro periodo di validità potrebbero verificarsi situazioni in cui l'attività biologica e/o le caratteristiche chimico-fisiche subiscano un'alterazione tale da non renderli più idonei alla somministrazione. Esegue inoltre il dosaggio del contenuto di antibiotico nei farmaci mediante un saggio di attività biologica.

Il Reparto Vaccini virali effettua i controlli *post-marketing* del vaccino anti-polio inattivato di Salk, adottato in Italia per la vaccinazione obbligatoria (Decreto 18/6/2002 del Ministero della Salute). Il vaccino somministrato in forma singola o combinata con altri vaccini, è importato da altri Paesi europei e commercializzato in Italia secondo le procedure di mutuo riconoscimento. Viene eseguito il saggio di potenza e identità per i vaccini usati sia per l'immunizzazione primaria (vaccini per la prima infanzia) che per i richiami in età pediatrica e adulta, per verificare che le caratteristiche biologiche dei vaccini in uso non subiscano un'alterazione tale da renderle non più idonee alla somministrazione.

L'USSI esegue controlli di sorveglianza *post-marketing* su lotti di vaccino antinfluenzale già immessi sul mercato, per lo più importati da altri Paesi europei e commercializzati secondo le procedure di mutuo riconoscimento. Come per gli altri prodotti, durante il loro periodo di validità potrebbero verificarsi situazioni in cui l'attività biologica e/o le caratteristiche chimico-fisiche subiscano un'alterazione tale da renderle non più idonee alla somministrazione, in particolare per quanto riguarda il contenuto antigenico. Per tale motivo, sui lotti viene effettuato il saggio di *potency*.

#### **Attività programmata**

Si prevede che tale attività comporterà il controllo di circa 100 lotti di immunoglobuline e potrebbe essere estesa anche ad altri prodotti immunologici, nonché il controllo di circa 40 lotti di vaccini. Si prevede inoltre anche il dosaggio del contenuto di antibiotico nei farmaci mediante un saggio di attività biologica.

Per l'attività di sorveglianza *post-marketing* per il vaccino IPV di Salk è previsto il controllo dei vaccini maggiormente in uso nel nostro Paese (circa tre lotti). È prevista l'attività *post-marketing* su alcuni lotti di vaccino contro il rotavirus e i virus del papilloma attraverso la titolazione degli antigeni con metodiche convenzionali o molecolari.

La partecipazione all'attività di sorveglianza *post-marketing* sarà definita annualmente in base ai prodotti identificati dall'AIFA. L'assegnazione dell'incarico nell'ambito della programmazione annuale AIFA/ISS prevederà la messa a punto e la relativa convalida dei metodi di analisi previsti per il controllo.

#### **Sorveglianza *post-marketing* a livello europeo di prodotti medicinali autorizzati centralmente (CAP) o con procedura di Mutuo Riconoscimento (MRP) (Direttiva europea n. 2001/83/EC; Direttiva europea n. 2004/27/EC amending Directive 2001/83/EC)**

La sorveglianza *post-marketing* dei prodotti autorizzati centralmente (CAP) è un'attività annuale coordinata a livello europeo da EMA, EDQM e OMCL.

L'EMA ha la responsabilità generale di questa attività: ogni anno identifica un gruppo di CAP da sottoporre a sorveglianza. La lista dei prodotti identificati e dei saggi da eseguire su ogni prodotto viene approvata dal CHMP.

L'EDQM è responsabile della scelta degli OMCL che eseguiranno il campionamento dei CAP nonché degli OMCL che eseguiranno i saggi. Inoltre, provvede all'invio dei prodotti e della relativa documentazione agli OMCL.

Gli OMCL sono responsabili dell'esecuzione dei saggi previsti dal CHMP per il prodotto in esame.

La sorveglianza post-marketing dei prodotti autorizzati attraverso procedura di mutuo riconoscimento (MRP) è coordinata dall'EDQM e consente di saggiare prodotti campionati da altri OMCL che normalmente verrebbero saggiati nell'ambito del programma nazionale di sorveglianza post-marketing.

A partire dal 2005 il Reparto Prodotti biologici partecipa al programma di sorveglianza CAP per i prodotti biotecnologici e dal 2006 al programma MRP per le immunoglobuline.

#### **Attività programmata**

La partecipazione all'attività di sorveglianza post-marketing CAP e/o MRP sarà definita annualmente in base ai prodotti identificati a livello europeo. L'assegnazione dell'incarico nell'ambito della programmazione annuale EMA/EDQM prevederà la messa a punto e la relativa convalida o trasferibilità dei metodi di analisi previsti per il controllo.

### **Valutazione e controllo Presidi Medico Chirurgici (PMC)/Biocidi**

L'autorizzazione all'immissione in commercio di nuovi PMC da parte del Ministero della Salute è soggetta alla valutazione di diversi parametri, tra cui l'efficacia, da parte dell'ISS. Dal 2008 un esperto del CRIVIB fa parte del Gruppo di Lavoro MIPI-CRIVIB che ha il compito di esprimere pareri tecnici relativamente all'attività battericida, fungicida e virucida, sui prodotti disinfettanti per i quali viene fatta richiesta di registrazione come PMC.

Dal maggio 2010, essendo terminato il periodo di transizione concesso dalla Direttiva europea 98/8/CE relativa all'immissione in commercio dei prodotti biocidi, recepita in Italia con il DL.vo n. 174/2000, i PMC sono diventati biocidi di gruppo 1. Poiché l'Istituto è incaricato dell'attività istruttoria di valutazione sui prodotti biocidi per conto del Ministero della Salute, nel settembre 2010 è stato creato in Istituto il Gruppo di Lavoro sui biocidi, coordinato dal CSC, nel quale è entrato a far parte l'esperto del CRIVIB.

A scopo di registrazione e/o di revisione di prodotti esistenti, nel periodo considerato sono stati valutati presso il CRIVIB dossier di prodotti disinfettanti con attività virucida, per uso umano, animale e industriale.

L'esperto del CRIVIB per i disinfettanti partecipa inoltre, come rappresentante con funzioni di esperto per l'attività virucida e *convenor* del *Virus Task Group* (VTG), ai lavori del Comitato europeo di normazione (CEN) – *Technical Committee 216/ Disinfectants* che produce le norme europee per la regolamentazione della dimostrazione di efficacia di tali prodotti.

#### **Attività programmata**

Partecipazione dell'esperto CRIVIB ai lavori del Gruppo di Lavoro sui biocidi per tutte le attività di competenza inerenti alla tematica biocidi.

Continuazione dell'attività di valutazione dei dossier per l'efficacia dei disinfettanti, per la registrazione come PMC/biocidi, a seconda delle richieste pervenute dal Ministero della Salute.

L'esperto CRIVIB continuerà la propria attività per il *Technical Committee 216/ Disinfectants* del CEN, relativamente ai prodotti virucidi e come *convenor* del VTG. Inoltre attenderà alla stesura di un nuovo standard europeo per la valutazione dell'azione virucida dei prodotti disinfettanti su superficie, utilizzando i dati ottenuti attraverso il *Ring Trial ad hoc* coordinato nel 2011, cofinanziato dall'*European Free Trade Association* (EFTA) e dal CEN.

**Organismo notificato  
per i dispositivi medici e la valutazione dei cosmetici**

---

Attività di ricerca



### **Elaborazione di linee guida per la progettazione, lavorazione e utilizzo di glucometri e autoiniettori di medicinali**

Studio dei sistemi di autodiagnosi e di autosomministrazione per la terapia di malattie croniche quali ad esempio diabete e sclerosi multipla.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Linee guida che possano essere di supporto per i fabbricanti dei sistemi di autodiagnosi e autosomministrazioni, per la classe medica e per i pazienti quali utilizzatori finali.

### **Formazione e addestramento di personale per verifiche ispettive sui DM e ispezioni per sorveglianza e vigilanza presso i fabbricanti di DM di classe I e di DM su misura**

Mediante questa convenzione l'ISS si propone per l'effettuazione di attività di formazione e addestramento per personale ispettivo e per lo svolgimento di verifiche ispettive di sorveglianza e vigilanza presso i fabbricanti di dispositivi medici di classe I e DM su misura

#### **Risultati attesi nel triennio**

Reclutamento personale ispettivo e amministrativo, formazione del personale e svolgimento delle verifiche ispettive.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Acquisizione di ulteriori informazioni da utilizzare anche nell'ambito delle attività di Organismo Notificato ai sensi delle direttive sui DM.

### **Formazione e addestramento di personale per verifiche ispettive sui DM e ispezioni per sorveglianza e vigilanza presso i fabbricanti di DM di classe IIa**

Mediante questa convenzione l'ISS si propone per l'effettuazione di attività di formazione e addestramento per personale ispettivo e per lo svolgimento di verifiche ispettive di sorveglianza e vigilanza presso i fabbricanti di DM di classe II.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Verbali di verifica ispettiva e relazioni tecnico-statistiche per la valutazione dei dati e delle evidenze ottenuti dall'attività di verifica.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Acquisizione di ulteriori informazioni da utilizzare anche nell'ambito delle attività di Organismo Notificato ai sensi delle direttive sui DM.

### **Formazione e addestramento di personale per verifiche ispettive sui DM e ispezioni per sorveglianza e vigilanza presso i fabbricanti di DM di classe IIb**

Mediante questa convenzione l'ISS si propone per l'effettuazione di attività di formazione e addestramento per personale ispettivo e per lo svolgimento di verifiche ispettive di sorveglianza e vigilanza presso i fabbricanti di DM di classe IIb.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Verbali di verifica ispettiva e relazioni tecnico-statistiche per la valutazione dei dati e delle evidenze ottenuti dall'attività di verifica.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Acquisizione di ulteriori informazioni da utilizzare anche nell'ambito delle attività di Organismo Notificato ai sensi delle direttive sui DM.

### **Implementazione di un piano di formazione per personale che utilizza DM in centri estetici e centri benessere**

Addestramento al corretto utilizzo di DM da parte di personale che esercita attività parasanitarie in centri estetici, di benessere ecc.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Individuazione delle professionalità maggiormente interessate ed esecuzione di corsi di addestramento.

Formazione del personale.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Acquisizione di ulteriori informazioni da utilizzare anche nell'ambito delle attività di Organismo Notificato ai sensi delle direttive sui DM.

### **Indagine sulle normative vigenti in Paesi extraeuropei relative al settore dei DM**

Approfondimento delle normative relative al settore dei DM in Paesi al di fuori dell'area europea al fine di agevolare lo scambio con gli altri Paesi.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Acquisizione e approfondimento delle conoscenze normative del settore dei DM.

### **Ispezioni per sorveglianza e vigilanza presso i fabbricanti di DM di classe III**

Impiego di personale ispettivo esperto per lo svolgimento delle verifiche ispettive.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Verbali di verifica ispettiva e relazioni tecnico-statistiche per la valutazione dei dati e delle evidenze ottenuti dall'attività di verifica.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Acquisizione di ulteriori informazioni da utilizzare anche nell'ambito delle attività di Organismo Notificato ai sensi delle direttive sui DM.

### **Linee guida per la valutazione di gas medicali classificabili come DM**

Definire le diverse applicazioni di gas che a seconda della destinazione d'uso possono essere considerati farmaci, DM o prodotti di libera vendita.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Elaborazione di linee guida per la corretta produzione, distribuzione e impiego dei gas.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Acquisizione di ulteriori informazioni da utilizzare anche nell'ambito delle attività di Organismo Notificato ai sensi delle direttive sui DM.

### **Progetto relativo alla linea di demarcazione tra medicinali vegetali, prodotti erboristici e altre categorie merceologiche a base di piante o di derivati di piante**

Studio delle situazioni borderline tra DM e altre categorie merceologiche a base di piante o di derivati di piante: specialità medicinali, cosmetici, integratori e prodotti di libera vendita.

**Risultati attesi nel triennio**

Proseguimento della valutazione dei requisiti essenziali da applicare ai dispositivi contenenti derivati di piante o di loro parti.

**Trasferibilità dei risultati**

Acquisizione di ulteriori informazioni da utilizzare anche nell'ambito delle attività di Organismo Notificato ai sensi delle direttive sui DM.

**Studio dei rischi connessi alle pratiche di utilizzo dei tatuaggi come DM**

Definire la natura dei materiali, la formazione del personale che effettua la pratica del tatuaggio e le caratteristiche degli ambienti dove vengono eseguiti i trattamenti.

**Risultati attesi nel triennio**

Elaborazione di linee guida per la corretta esecuzione dei tatuaggi come DM.

**Trasferibilità dei risultati**

Acquisizione di ulteriori informazioni da utilizzare anche nell'ambito delle attività di Organismo Notificato ai sensi delle direttive sui DM.

**Studio del fenomeno della contraffazione nel settore dei DM**

Analisi del fenomeno della contraffazione nel settore delle specialità medicinali e dei cosmetici.

**Risultati attesi nel triennio**

Individuazione delle possibili situazioni di rischio di tipo igienico-sanitario e dei conseguenti possibili danni al paziente.

**Trasferibilità dei risultati**

Acquisizione di ulteriori informazioni da utilizzare anche nell'ambito delle attività di Organismo Notificato ai sensi delle direttive sui DM.

**Valutazione dell'effetto barriera esercitato da prodotti classificabili come DM**

Definizione di metodologie atte a definire l'effetto barriera di componenti utilizzati nella formulazione di prodotti classificabili come DM. Accertamento di eventuali situazioni di *borderline* con farmaci e cosmetici.

Attività sperimentale su tessuti di origine animale e su modelli realizzati in laboratorio.

**Risultati attesi nel triennio**

Elaborazione di linee guida per la definizione di situazioni di *borderline*.

**Trasferibilità dei risultati**

Acquisizione di ulteriori informazioni da utilizzare anche nell'ambito delle attività di Organismo Notificato ai sensi delle direttive sui DM.



**Organismo notificato  
per i dispositivi medici e la valutazione dei cosmetici**

---

**Attività di controllo, valutazione, parere**



### **Dispositivi medici, cosmetici e prodotti di interesse per la salute pubblica**

La Sezione dell'Organismo Notificato 0373 presso l'Organismo notificato per i DM e la valutazione dei cosmetici (ONDICO) valuta le richieste relative alla certificazione CE di DM presentate dai fabbricanti di tali prodotti. L'attività di valutazione delle richieste di cui sopra consiste nella valutazione di documentazione tecnica di prodotto e nell'effettuazione di verifiche ispettive presso i fabbricanti di DM. L'attività di verifica ispettiva viene svolta sia ai fini del rilascio di nuove certificazioni CE che ai fini della sorveglianza dei sistemi di gestione della qualità dei fabbricanti che hanno già ottenuto la certificazione CE presso questa Sezione dell'Organismo Notificato.

Viene fornito supporto tecnico-scientifico e valutativo al Ministero della Salute per l'attività di sorveglianza e vigilanza nel settore dei DM.

Viene svolta attività di formazione in vari settori che comportano l'utilizzo di DM, cosmetici e altri prodotti di interesse sanitario quali tatuaggi e piercing.

Vengono elaborate linee guida da fornire al Ministero della Salute per l'elaborazione di normative su prodotti di interesse sanitario non ancora regolamentati.

Attraverso l'attività di tipo valutativo di competenza dell'UNIVACO le Aziende del settore cosmetico vengono sensibilizzate ad adottare sistemi di qualità così come previsto dal nuovo regolamento sui cosmetici che entrerà in vigore nel 2013.

#### **Attività programmata**

L'ONDICO svolgerà attività nell'ambito di:

- certificazione di DM ai sensi della direttiva 93/42/CEE;
- supporto al Ministero della Salute nell'attività di vigilanza e sorveglianza;
- attività di formazione per operatori sanitari nel settore dei DM;
- approfondimento delle problematiche legate ai prodotti *borderline* fra DM e altre categorie di prodotti;
- valutazione tecnico/scientifica delle officine cosmetiche e relativi prodotti;
- valutazione di problematiche connesse a tipologie di prodotti di interesse sanitario, in particolare in settori di grande rilevanza non ancora oggetto di specifici regolamenti, quali: tatuaggi, piercing, prodotti per innesti sottocutanei, prodotti utilizzati presso centri estetici e centri per la cura del corpo;
- supporto al Ministero della Salute in merito a problematiche riguardanti prodotti quali cosmetici, e dispositivi utilizzati anche nel settore veterinario.



**Servizio biologico  
e per la gestione della sperimentazione animale**

---

**Attività di ricerca**



### **Correlazione e possibile interdipendenza dei geni implicati nell'*uptake* dello zinco (Zn) e i geni per la superossido dismutasi nel ceppo patogeno *Escherichia coli* O157:H7**

Lo Zn è essenziale nella fisiologia della cellula; la sua importanza risiede nel ruolo che ricopre quale elemento strutturale di diversi domini proteici e come cofattore di enzimi. Lo Zn è in grado di prevenire l'ossidazione lipidica delle membrane cellulari. Studi recenti hanno dimostrato l'importanza dell'integrità del sistema di omeostasi dello Zn per la sopravvivenza dei batteri e per l'invasione delle cellule ospiti. Nell'ultimo anno del progetto precedente il nostro gruppo è riuscito a dimostrare che i geni *znuA* e *zinT*, in *E. coli* O157:H7, sono necessari per l'efficacia dell'adesione batterica alla cellula ospite. In caso d'infezione, la cellula infettata mette in azione, quale meccanismo di difesa, il "burst ossidativo" che viene contrastato dal batterio attraverso l'azione della superossido dismutasi (SOD) e di altri enzimi antiossidanti. Il ceppo O157:H7 possiede, oltre al gene *sodC* cromosomale-omologo nella maggior parte delle specie batteriche, altre due copie profagiche aggiuntive con struttura e proprietà chimico-fisiche diverse dal gene cromosomale. Poiché è stato dimostrato in *Salmonella* un legame tra l'espressione del gene *sodC* e l'integrità del gene *znuA* e una minore resistenza allo stress ossidativo dei mutanti deleti del gene *znuA* in un ceppo uropatogeno di *E. coli*, l'obiettivo di questo progetto è quello di studiare in *E. coli* O157:H7 la correlazione e una eventuale possibile interdipendenza tra i geni dell'*uptake* dello Zn e i tre geni per la SOD.

#### **Risultati attesi nel triennio**

La costruzione di cloni recanti un epitopo (Flag) attaccato al C-terminale delle proteine SodC cromosomale e SodC fagiche permetterà di rilevare la loro espressione in mutanti deleti in *znuA* o in *zinT* con l'uso di anticorpi anti-Flag e di capire come la deprivazione da Zn possa influenzare tali geni nonché se l'origine fagica delle SodC possa riflettersi in un diverso comportamento nell'espressione. Nel corso degli studi saranno formati mutanti in grado di esprimere le proteine ZnuA e ZinT flaggate in assenza del gene *sodC* cromosomale o dei geni profagici e verrà valutata la resistenza allo stress ossidativo indotta da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nei ceppi mancanti dei geni *znuA* o in *zinT* rispetto al *wild type* in condizioni di carenza di Zn. Uno studio preliminare sulla capacità di formare biofilm, intrapreso sui mutanti deleti di *znuA* o di *zinT*, ha mostrato un maggiore coinvolgimento da parte di ZnuA. Tali esperimenti saranno estesi al ceppo mancante di entrambi i geni *znuA* e *zinT* e ai doppi mutanti deleti sia di *sodC* che di *znuA* o di *zinT* ed effettuati sia in condizioni basali che in carenza di Zn o in condizioni di stress ossidativo. Contemporaneamente, studi di microscopia elettronica permetteranno di valutare eventuali differenze nell'organizzazione strutturale del biofilm nei diversi mutanti. In base ai risultati ottenuti, successivi studi d'infezione su una linea intestinale umana (Caco-2) potranno chiarire le basi molecolari del processo di infezione e sopravvivenza nella cellula ospite.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Questo progetto potrebbe portare alla conoscenza di nuove strategie terapeutiche da utilizzare al fine di inibire la formazione dei biofilm qualora fossero strettamente coinvolti nei processi di infezione batterica.



**Servizio biologico  
e per la gestione della sperimentazione animale**

---

**Attività di controllo, valutazione, parere**



### **Attività istruttorie concernenti AIC di specialità medicinali**

L'attività di valutazione viene svolta dal Settore Biologico su richiesta dell'AIFA e dei Dipartimenti dell'ISS. Questa attività consiste nella valutazione dell'adeguatezza delle informazioni contenute nei dossier inviati all'AIFA dalle Ditte produttrici di farmaci per la richiesta, il rinnovo o la modifica dell'Autorizzazione all'Immissione in Commercio (AIC). Gli aspetti di competenza valutati riguardano in particolare le produzioni in asepsi, l'esecuzione del saggio di sterilità, del saggio per la ricerca delle endotossine batteriche e del saggio per la verifica dell'assenza dei pirogeni. Nel corso della verifica vengono valutate le procedure operative, le convalide delle apparecchiature utilizzate nonché i dati analitici ottenuti dai laboratori aziendali nel corso della qualifica delle metodiche e dei processi di produzione applicati.

#### **Attività programmata**

Nel corso del triennio 2012-2014 verranno esaminati i documenti ricevuti e verrà emesso parere per gli aspetti di competenza. La programmazione prevede di inserire questa attività di controllo scientifico-documentale nel Sistema di Qualità dell'ISS al fine di migliorare la gestione, sia in termini di tracciabilità che di archiviazione, della documentazione. Le verifiche effettuate nel corso di questa attività, oltre a fornire parere scientifico agli Uffici Autorizzativi AIC dell'AIFA, così come descritto nel progetto AIFA/ISS, miglioreranno le conoscenze degli ispettori dell'SB che nel corso dell'attività ispettiva alle Officine produttrici di farmaci e di principi farmacologicamente attivi (API) verificano la congruenza tra i processi di produzione e le AIC autorizzate.

### **Autorizzazione all'immissione in commercio di specialità medicinali costituite da emoderivati**

L'attività di valutazione viene svolta dall'SB su richiesta dei Dipartimenti dell'ISS che si occupano delle autorizzazioni all'immissione in commercio di specialità medicinali costituite da emoderivati (attività di *batch release*). L'attività consiste nella verifica degli aspetti di competenza (produzione sterile, controlli *in process*, controllo di qualità) contenuti nei dossier inviati all'AIFA per la richiesta o il rinnovo dell'AIC delle suddette specialità medicinali.

#### **Attività programmata**

L'attività di valutazione verrà svolta dall'SB a seguito di richiesta dell'AIFA e dei Dipartimenti dell'ISS. Importante sarà la verifica della documentazione generata a seguito dell'attività ispettiva svolta sia dagli ispettori nazionali che da team di ispettori europei. Nel caso dell'attività di *batch release* effettuata dall'ISS, verranno valutate le problematiche relative alle produzioni in asepsi anche mediante verifica analitica dei campioni ricevuti che verranno sottoposti a saggio di sterilità, saggio per la verifica dell'assenza dei pirogeni e saggio per la ricerca delle endotossine batteriche.

### **Controlli biologici su farmaci e DM**

L'attività di controllo consiste nell'esecuzione del saggio di sterilità, del saggio per la ricerca delle endotossine batteriche e del saggio per la verifica dell'assenza dei pirogeni su farmaci e DM eseguiti secondo i protocolli stabiliti dalla Farmacopea Europea. Questi controlli vengono svolti dall'SB su richiesta dell'AIFA, del Ministero della Salute e dell'autorità giudiziaria a fronte di interventi su territorio nazionale sia di farmacovigilanza e di post-marketing *surveillance* che di ispezioni ad industrie produttrici di farmaci e a seguito

di segnalazioni degli organi competenti. Tali competenze dell'SB sono state stabilite dal DM n. 528 del 21/11/1987 e mantenute nel regolamento dell'ISS.

#### **Attività programmata**

Nel corso del triennio 2012-2014, grazie all'acquisizione della certificazione di conformità alla norma internazionale UNI/EN ISO 17025, prevista per i laboratori di prova, e alla prosecuzione del progetto in collaborazione con l'AIFA per il controllo della sterilità e del contenuto in endotossine batteriche e sostanze pirogene nei farmaci e nei DM, l'SB proseguirà la propria attività di controllo analitico così come previsto dagli accordi di mutuo riconoscimento Canada-Europa.

Tali accordi vedono, ancora una volta, l'ISS e l'AIFA attivamente coinvolti nello svolgimento dei controlli finalizzati a garantire la sicurezza dei farmaci e la tutela della salute pubblica. Nel corso del 2012, le attività analitiche verranno sottoposte a riqualifica da parte dell'EDQM al fine di verificare il mantenimento degli standard di qualità raggiunti.

### **Convenzione per il bando delle armi biologiche e tossiniche**

L'SB partecipa ai lavori della Commissione interministeriale, coordinata dal MAE, incaricata di recepire su territorio nazionale la Convenzione per il Bando delle armi biologiche e tossiniche. Tra le attività previste si inserisce la trasmissione annuale dei dati sulle attività svolte dall'ISS che prevedono l'impiego di agenti biologici.

#### **Attività programmata**

Nel corso del triennio gli adempimenti previsti dal recepimento della Convenzione prevedono che vengano redatte le linee guida essenziali per implementare sul territorio degli Stati. Parte quelle azioni di verifica e di controllo necessarie a garantire trasparenza e tracciabilità nelle attività di produzione e di ricerca che utilizzano agenti biologici. Nel programma di controllo sono previste visite di verifica alle aree classificate secondo gli standard internazionali di sicurezza e il controllo di quella strumentazione tecnico-scientifica che potrebbe prevedere un impiego *dual-use*. Nel corso del 2011 il "Gruppo di lavoro sulla biosicurezza e il bioterrorismo" della Presidenza del Consiglio dei Ministri ha emesso i "Codici di Condotta per la Biosicurezza". A fronte dell'iniziativa dell'UE è stato lanciato il progetto UE "Strumento di Stabilità – Centri di Eccellenza per la Riduzione dei rischi Chimici, Biologici, Radiologici e Nucleari (CBRN)" con l'obiettivo di costituire una rete di esperti, organizzazioni e rappresentanti dei Paesi aderenti all'iniziativa per sviluppare un approccio comune che contribuisca alla riduzione della minaccia CBRN. L'ISS parteciperà alle riunioni presso il MAE, punto di contatto italiano per l'iniziativa.

### **Elaborazione di monografie per i farmaci in ambito europeo**

L'attività viene svolta dall'SB, per gli aspetti di competenza, su richiesta dei Dipartimenti dell'ISS e della Segreteria Tecnica per la Farmacopea Ufficiale che si occupa di adeguare al progresso tecnico i protocolli di verifica e controllo delle specialità medicinali.

#### **Attività programmata**

L'attività di stesura e revisione delle monografie in ambito europeo è puntualmente effettuata dai gruppi di revisione europei e dalle autorità nazionali. L'SB, tramite una unità di personale, è inserito in uno di questi gruppi di lavoro europei (endotossine). Nel corso del triennio 2012-2014 proseguirà e verrà potenziata l'attività di collaborazione per la revisione di quelle monografie che impattano sui saggi di competenza.

## **Elaborazione procedure generali e operative per il sistema di assicurazione della qualità per le attività dell'ISS**

Questa attività dell'SB confluisce in due settori di intervento. Il primo relativo all'esecuzione dei controlli su farmaci e su DM, il secondo nella realizzazione del SAQ dell'ISS. In entrambi i casi, la stesura e l'applicazione delle procedure sia generali che operative permettono di garantire la qualità del risultato (dati analitici, pareri e certificazioni) prodotto dall'ISS nell'ambito dello svolgimento dell'attività istituzionale di controllo. A seguito degli accordi di mutuo riconoscimento Canada-Europa, l'SB è stato sottoposto ad ispezioni da parte di un team ispettivo europeo, un team ispettivo canadese e sia nel 2008 che nel 2010 dall'EDQM. A seguito di esito favorevole, il sistema di qualità dell'SB è stato dichiarato in *compliance* con quanto previsto per i laboratori di prova (norme UNI/EN/ISO 17025). L'attività di controllo effettuata secondo tali norme garantisce, a livello internazionale, la qualità del risultato.

### **Attività programmata**

A fronte dei risultati ottenuti nel corso degli anni precedenti (mutuo riconoscimento Canada-Europa, certificazione da parte dell'EDQM quale laboratorio del network degli OMCL per l'esecuzione del saggio di sterilità, per il saggio delle endotossine batteriche e per il saggio di verifica dell'assenza dei pirogeni), l'SB è oggi quanto mai interessato a mantenere tali standard di qualità che testimoniano l'alto livello raggiunto dall'ISS nelle attività analitiche di controllo istituzionale. Il mantenimento di questo standard deve però essere periodicamente confermato tramite visite ispettive interne ed esterne effettuate da team composti anche da ispettori provenienti da ispettorati europei e internazionali. A questo scopo ogni anno viene programmata l'attività che dovrà essere svolta per mantenere il livello di qualità previsto dalle norme internazionali UNI/EN/ISO 17025 per i laboratori di prova. Poiché nel triennio 2012-2014 sono state programmate le visite ispettive dell'EDQM per la ricalifica periodica del sistema di qualità dell'SB, tale programmazione prevede di intensificare quelle attività di redazione ed emissione delle procedure necessarie al raggiungimento di questo obiettivo.

## **Ispezione agli stabilimenti di produzione farmaci**

L'attività ispettiva viene svolta dagli ispettori dell'SB, su richiesta dell'AIFA e della Presidenza dell'ISS, per valutare la conformità alle GMP delle Officine farmaceutiche produttrici di principi farmacologicamente attivi e di farmaci destinati ad uso umano. Presso il Settore sono in ruolo tre ispettori senior. Il controllo di tutta la filiera produttiva permette di ottenere informazioni dettagliate sulla qualità e, di conseguenza, sulla sicurezza del prodotto finito distribuito sia su territorio nazionale che internazionale. Le ispezioni vengono condotte anche in quei Paesi terzi (India, Cina e Giappone) dove vengono prodotti molti API utilizzati come materie prime nella produzione di farmaci.

### **Attività programmata**

La programmazione del triennio 2012-2014 prevede il proseguimento delle attività ispettive incluse nel progetto speciale coordinato dal CRIVIB dell'ISS. Tale programmazione prevede visite di verifica non solo presso le Officine produttrici di farmaci e di principi farmacologicamente attivi, ma anche presso i laboratori (*cell-factory*) situati nei Centri di Ricerca autorizzati e negli ospedali nazionali che svolgono attività di produzione di farmaci destinati all'utilizzazione nella sperimentazione clinica e nelle terapie avanzate (cellulare e genica). In questo ambito l'ISS collabora attivamente con l'AIFA, non solo nella valutazione e nell'autorizzazione dei protocolli da applicare, ma anche nella verifica delle

aree destinate alla produzione che devono risultare in *compliance* con quanto previsto dalle GMP europee.

### **Ispezione campi sperimentali autorizzati al rilascio deliberato di OGM**

L'SB partecipa ai lavori della Commissione interministeriale di coordinamento per le biotecnologie, istituita presso il Ministero della Sanità, fin dal 1993, anno di recepimento nel nostro ordinamento della Direttiva Comunitaria 90/220. Successivamente, con il recepimento, nel DL.vo 224/03, della nuova Direttiva Comunitaria (2001/18/CE), l'Autorità nazionale competente è stata istituita presso il Ministero dell'Ambiente. L'ISS continua a far parte della suddetta Commissione partecipando con i suoi rappresentanti come esperto. L'attività della Commissione consiste nel fornire l'autorizzazione (previa valutazione dei dossier di notifica) alle operazioni di rilascio deliberato di OGM su territorio nazionale, sia a fini sperimentali che commerciali, e nell'effettuare l'attività di controllo dei campi utilizzati per la semina delle piante geneticamente modificate al fine di verificare la congruenza tra quanto realizzato e quanto descritto nei protocolli sperimentali autorizzati.

#### **Attività programmata**

Nel triennio 2012-2014 l'ISS, tramite la partecipazione degli esperti dell'SB ai lavori della Commissione interministeriale di valutazione, collaborerà alla verifica della documentazione presentata dai notificanti e, tramite ispezione, controllerà sul territorio l'adeguatezza e la sicurezza delle prove sperimentali realizzate per il rilascio deliberato nell'ambiente di Piante e Organismi Geneticamente Modificati (PGM e OGM).

### **Parere concernente l'emissione deliberata di OGM**

L'SB partecipa ai lavori della Commissione interministeriale di coordinamento per le biotecnologie, istituita presso il Ministero della Sanità, fin dal 1993, anno di recepimento nel nostro ordinamento della Direttiva Comunitaria 90/220. Successivamente, con il recepimento nel DL.vo 224/03 della nuova Direttiva Comunitaria (2001/18/CE), l'Autorità nazionale competente è stata istituita presso il Ministero dell'Ambiente. L'ISS continua a far parte della suddetta Commissione partecipando con i suoi rappresentanti come esperto. L'attività della Commissione consiste nel fornire l'autorizzazione (previa valutazione dei dossier di notifica) alle operazioni di rilascio deliberato di OGM su territorio nazionale, sia a fini sperimentali che commerciali.

#### **Attività programmata**

Nel triennio di programmazione l'ISS, tramite la partecipazione dei suoi rappresentanti alla Commissione interministeriale di coordinamento per le biotecnologie, esprimerà pareri tecnico-scientifici sui dossier presentati dai notificanti, sia a fini sperimentali che commerciali e contribuirà alla stesura e all'approfondimento di quelle norme settoriali redatte in ambito comunitario al fine di garantire l'uniformità della sperimentazione e la sicurezza nell'impiego e nella commercializzazione dei prodotti contenenti o costituiti da OGM. Fermo restando il parere dello Stato membro per l'autorizzazione alla circolazione su proprio territorio, i pareri emessi dall'Autorità nazionale competente verranno trasmessi all'EFSA che fornirà il parere definitivo per l'utilizzazione di questi prodotti in territorio europeo.

### **Parere concernente l'impiego confinato di Microrganismi Geneticamente Modificati (MOGM)**

L'SB dell'ISS partecipa come membro ai lavori della Commissione interministeriale di valutazione per l'impiego confinato di MOGM. In particolare, nell'ambito del DL.vo 206/01, le attività che prevedono l'utilizzazione di MOGM ai fini di ricerca e sviluppo devono essere autorizzate sia per le aree dove queste attività vengono svolte che per i protocolli sperimentali applicati. L'Autorità nazionale competente per il recepimento e l'attuazione della norma comunitaria di riferimento su territorio nazionale è il Ministero della Salute.

#### **Attività programmata**

Nel triennio di programmazione l'ISS, tramite la partecipazione dei suoi rappresentanti alla Commissione interministeriale di valutazione (AC italiana), a seguito di valutazione tecnico-scientifica, esprimerà pareri sia sui protocolli sperimentali presentati dai notificanti, al fine di ottenere l'autorizzazione alla sperimentazione in laboratorio, sia sui *layout* delle aree dove queste operazioni vengono effettuate. Questa attività di controllo permette all'Autorità competente di essere a conoscenza delle sperimentazioni con MOGM effettuate in ambiente confinato (laboratori di ricerca sia pubblici che privati) sul territorio nazionale, di valutarne la congruità e di definirne la sicurezza per l'uomo, gli animali e l'ambiente.

Fondamentale per la tutela della salute pubblica è l'attività di verifica eseguita dalla Commissione sui laboratori autorizzati e sulle attività di ricerca applicata svolte al fine di identificare nuovi medicinali e strategie di cura farmacologica da utilizzare in terapia cellulare e genica nonché nelle terapie sperimentali di fase I e II.

### **Valutazione dei rischi derivanti da agenti biologici**

L'SB collabora con il Servizio Prevenzione e Protezione (SPP) dell'ISS per le problematiche inerenti il rischio biologico. Nell'ambito di questa collaborazione vengono richieste valutazioni sia su alcune attività svolte dal personale dell'ISS che su apparecchiature e documenti afferenti a tale argomento. Nello stesso ambito vengono svolte attività formative sia per il personale interno dell'ISS che su richiesta del Ministero della Salute e dell'INAIL (ex ISPESL). Nel corso del 2011 è stata intrapresa un'attività di collaborazione con il CNT per gli aspetti formativi inerenti il controllo microbiologico delle aree sottoposte alle visite di controllo svolte dal CNT stesso sulle Banche dei Tessuti presenti su territorio nazionale.

#### **Attività programmata**

La programmazione triennale delle attività del Settore prevede di continuare a fornire il proprio contributo tecnico-scientifico sia con l'emissione di pareri che con l'adesione alle diverse attività formative che l'SPP, i Dipartimenti dell'ISS e il CNT richiederanno relativamente agli aspetti di competenza (controllo microbiologico delle aree e rischio biologico).



**Servizio informatico, documentazione, biblioteca  
ed attività editoriali**

---

**Attività di ricerca**



## **Bibliosan web 2.0**

Analisi dell'attuale sito web del Sistema Bibliosan e, contestualmente, analisi delle applicazioni web 2.0. In particolare andranno esaminate le varie piattaforme wiki disponibili e i siti di *social bookmarking* per scegliere quelli più idonei all'implementazione del sito. Tempo previsto: sei mesi.

Implementazione del sito web del Sistema Bibliosan:

- recupero materiale relativo alle attività di formazione e relativa pubblicazione online;
- individuazione e recupero *tutorial* disponibili ed eventuale realizzazione se non disponibili;
- eventuale traduzione in italiano di *tutorial*;
- selezione delle risorse online da distribuire attraverso lo strumento di *social bookmarking* individuato;
- inserimento dei *feed*;
- integrazione del sito con una piattaforma wiki.

Tempo previsto: sei mesi.

Realizzate le attività di cui sopra, si prevede la presentazione del sito aggiornato a tutte le istituzioni afferenti al Sistema Bibliosan.

Nel secondo e terzo anno di attuazione del progetto si prevedono corsi di formazione, sulle risorse web 2.0 utilizzate, per tutte le istituzioni afferenti al Sistema Bibliosan, una verifica periodica dello stato del sito nelle sue varie aree e l'attività propria del borsista che sarà quella di mantenere sempre aggiornate le varie sezioni. Questo non esclude l'analisi e l'eventuale utilizzo, in corso d'opera, di nuovi strumenti del web 2.0 essendo questi degli strumenti in costante in continua evoluzione.

### **Risultati attesi nel triennio**

Implementazione del sito web del Sistema Bibliosan utilizzando le applicazioni del web 2.0.

In dettaglio:

- Area Formazione – inserimento di podcast e slide (con eventuale apertura di un account Bibliosan su Slideshare) relativi ai corsi di formazione organizzati.
- Area Risorse Online – inserimento di *tutorial*, podcast e slide (scaricati dai siti delle risorse e, ove non disponibili, realizzati dal personale Bibliosan).
- Utilizzo dei *Really Simple Syndication (RSS) feed* per una migliore distribuzione delle informazioni.
- Utilizzo delle piattaforme wiki per facilitare la collaborazione e il confronto dei diversi gruppi di lavoro ed, eventualmente, dei referenti Bibliosan.
- Creazione di un'area di link utili attraverso strumenti di *social bookmarking*, ad esempio *Delicious*, attraverso la quale distribuire risorse online (siti, citazioni bibliografiche o, dove possibile, articoli) utili sia ai bibliotecari che agli utenti finali.

### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto si propone l'utilizzo delle applicazioni del web 2.0 nell'ottica di implementare il sito web di Bibliosan per una maggiore condivisione e disseminazione dell'informazione e delle attività svolte all'interno del Sistema Bibliosan, sia per i bibliotecari che per gli utenti finali, con particolare attenzione alla formazione per entrambi.

L'idea è quella di far diventare il sito Bibliosan ancor di più un luogo virtuale di aggregazione dove i bibliotecari avranno la possibilità di trovare sia informazioni per un costante aggiornamento professionale sia un luogo di incontro dove confrontare idee, condividere progetti di lavoro.

Gli utenti finali potranno invece trovare *tutorial* per l'utilizzo delle numerose risorse online messe a disposizione dal Sistema Bibliosan oltre a risorse online rese disponibili attraverso strumenti di *social bookmarking*.

### **Gestione e sviluppo dell'archivio istituzionale DSpace ISS**

La finalità del progetto è di potenziare le funzionalità dell'archivio digitale DSpace ISS (<http://dspace.iss.it/dspace/>) in adesione alla logica del movimento open access che prevede la libera disponibilità in rete dei prodotti della ricerca finanziata da fondi pubblici. DSpace ISS raccoglie attualmente oltre 30.000 documenti che costituiscono la letteratura scientifica prodotta dall'ISS. In misura crescente è previsto l'inserimento di lavori a testo completo (oggi circa il 10% del materiale in archivio), nel rispetto della normativa sul copyright. È prevista l'attuazione di procedure informatiche automatizzate (con aggiornamento in tempo reale) volte a gestire tutte le fasi del processo di transito dei documenti, dall'ambiente intranet/internet (database bibliografico ISS già integrato con applicativi interni quali anagrafico ISS, consultazione e indicizzazione con termini MeSH e registrazione delle pubblicazioni in Infoweb) fino alla visualizzazione dei documenti sulla piattaforma DSpace ISS. La realizzazione a regime di tale servizio dovrà coincidere con una gestione dell'archivio digitale in linea con i parametri di interoperabilità con altri sistemi di ricerca in rete basati sull'adozione di schemi condivisi per lo scambio di metadati e con standard europei di accesso alla letteratura di ricerca. È allo studio l'idea di proseguire con la gestione dei dati di pubblicazione acquisiti da comunità di ricerca di enti simili (IRCCS, IZS) e membri della rete Bibliosan.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Rendere disponibile la produzione di letteratura scientifica ISS, in una infrastruttura di rete stabile e interoperabile, ai fini di massimizzare la diffusione dei risultati della ricerca condotta dall'Ente. Si tratta di ottimizzare la gestione del flusso di dati garantendo meccanismi di controllo di qualità (es. gestione delle omonimie e duplicazioni di pubblicazioni) nell'applicativo interno (database bibliografico ISS) e attività di manutenzione ordinaria e di assistenza tecnica anche per il puntuale processo di migrazione dei dati sulla piattaforma DSpace ISS. È attesa la codifica dell'*handle* dei singoli oggetti digitali presenti nell'archivio ed è prevista la riconfigurazione del sito web di DSpace ISS, in adesione alle specifiche di coordinato di immagine dell'ISS, in relazione alle nuove *release* del DSpace e necessarie personalizzazioni. Si prevede di concordare con gli enti del circuito Bibliosan le modalità di adesione all'archivio virtuale ISS per mantenere costante l'acquisizione di dati sulla ricerca biomedica italiana. Si prevede di misurare il grado di soddisfazione dell'utenza interna ISS circa il servizio offerto e di raccogliere suggerimenti per migliorarne le caratteristiche.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'accesso alle pubblicazioni indicizzate in DSpace ISS è la premessa per la valutazione dell'output di ricerca, per la rendicontazione annuale delle attività ISS, e per procedure concorsuali del personale offrendo disponibilità immediata e tempestiva ai lavori pubblicati. La piena funzionalità dell'archivio come fonte aggiornata di risorse online e di servizi di gestione delle pubblicazioni consentirà ai singoli ricercatori ISS di generare statistiche e report relativi agli accessi e ai download dei propri lavori e di fruire di funzioni di alert e help nella ricerca dei dati e visualizzazione dei risultati. Altro risultato è costituito dalla possibilità di individuare l'evoluzione della rete di collaborazioni scientifiche nazionali e internazionali tra i ricercatori ISS e altre comunità di ricerca in Italia e all'estero come base

di studio sulle linee di ricerca ISS e prospettive di scambio e condivisione dei risultati per il miglioramento delle politiche di sanità pubblica.

### **Health literacy and health education fostering participation and improving women's and men's health**

Le recenti iniziative del Parlamento europeo sono volte a promuovere la cultura della salute in tutti gli Stati membri. L'alfabetizzazione e l'educazione sanitaria migliorano infatti le capacità di comunicazione consapevole con gli operatori sanitari da parte di pazienti e cittadini, consentendo una partecipazione più attiva alle decisioni in materia di assistenza sanitaria. L'educazione alla salute svolge di conseguenza un ruolo chiave nel superamento delle disuguaglianze nell'accesso ai servizi sanitari causate da determinanti sociali. Il progetto si propone di promuovere la cultura della salute come una parte importante della formazione continua degli adulti.

In particolare il partenariato intende:

- entrare in contatto con le organizzazioni europee che si occupano della formazione degli adulti, le Organizzazioni non Governative (ONG) e le istituzioni pubbliche con esperienza nel campo dell'alfabetizzazione sanitaria;
- discutere i diversi approcci, strategie e politiche volte a promuovere la cultura della salute nei Paesi europei;
- condividere competenze, esperienze e idee;
- confrontare gli obiettivi nazionali e gli specifici programmi di formazione per migliorare la cultura della salute;
- rafforzare la collaborazione tra le organizzazioni europee impegnate nell'educazione degli adulti allo scopo di migliorare l'alfabetizzazione sanitaria tra i cittadini.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Realizzazione di quattro incontri da effettuare tra il 2011 e il 2013 sul tema dell'alfabetizzazione nel campo della salute e dell'educazione alla salute. I meeting si svolgeranno nelle sedi dei quattro partner del progetto. Per quanto riguarda l'ISS dovranno essere effettuate almeno dodici mobilità.

Stesura di un rapporto finale da pubblicare sui siti web delle istituzioni dei partecipanti al progetto. Diffusione dei risultati del progetto su più ampia scala tramite pubblicazioni e via internet.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il partenariato di apprendimento offre un'opportunità unica per conoscere e collaborare con il personale delle organizzazioni europee, le ONG e istituzioni pubbliche coinvolte nella formazione degli adulti, allo scopo di costruire alleanze per incentivare l'alfabetizzazione sanitaria a livello nazionale ed europeo. La collaborazione con altri paesi europei offrirà nuovi impulsi alle attività svolte a livello nazionale e consentirà di far conoscere le attività svolte dall'ISS.

Il partenariato offre inoltre la possibilità di conoscere diversi approcci, strategie e modelli di buona pratica.

### **SIBIL: sistema informativo per la bioetica in linea**

Nella prima fase del progetto l'obiettivo primario è stato quello di realizzare una rete documentaria integrata nel settore della bioetica. A questo scopo è stato predisposto un sito ([www.sibil.iss.it](http://www.sibil.iss.it)), unico in Italia, con funzione di accesso alla documentazione in bioetica, con rassegna stampa aggiornata quotidianamente e notizie sempre attuali su convegni e corsi

di formazione nel settore. Inoltre è stata realizzata una base dati di bioetica ([www.bioetica.iss.it](http://www.bioetica.iss.it)), prima in Italia e a tutt'oggi unica nel suo genere per numero di documenti e accuratezza nell'organizzazione interna, che considera tutta la letteratura scientifica italiana pubblicata nel campo a partire dal 1995.

Gli obiettivi specifici delle fasi ancora da sviluppare del progetto sono indirizzati a:

- diffondere tra gli operatori dell'SSN, i ricercatori, i cittadini la conoscenza delle problematiche emergenti in bioetica;
- mantenere, aggiornare, ampliare il sito e la banca dati per la bioetica, attraverso la ricerca di documentazione sempre attuale;
- revisionare e aggiornare le note d'ambito (definizioni dei termini) del Tesaurus italiano di Bioetica; revisionare e aggiornare il Tesaurus stesso; inserirlo nell'ambito di progetti di thesauri multilingue, dato che il Tesaurus è stato tradotto in inglese;
- proseguire con l'integrazione dei dati italiani nel sistema europeo integrato di diffusione e ricerca dell'informazione nel campo della bioetica (Ethicsweb [www.ethicsweb.eu](http://www.ethicsweb.eu)).

### **Risultati attesi nel triennio**

Tra i risultati attesi ci sono:

- mantenimento del sito web tematico, della rassegna stampa, del calendario dei corsi e convegni e della banca dati già presenti sul sito dell'Istituto ([www.iss.it/sibi](http://www.iss.it/sibi));
- studio di nuovi software open source da utilizzare per la gestione della banca dati, allo scopo di ottenere un risparmio dei costi di gestione e di migliorare la fruibilità del prodotto;
- ricerca delle fonti più autorevoli e accreditate, produttrici di informazione nel campo della bioetica e della normativa in vigore;
- raccolta del materiale; catalogazione, descrizione e analisi del contenuto di ogni documento o risorsa Internet;
- assegnazione di parole chiave estratte dal Tesaurus italiano di Bioetica e di termini equivalenti in lingua inglese;
- collegamento ipertestuale al testo completo del documento, ove possibile;
- aggiornamento e mantenimento della banca dati di documentazione in bioetica. Inserimento della stessa all'interno del sito europeo Ethicsweb.

### **Trasferibilità dei risultati**

Il sistema informativo integrato realizzato dall'Istituto continuerà a proporsi come punto di riferimento:

- per gli operatori dell'SSN, per i comitati etici, per i ricercatori;
- per il cittadino (informazione su tematiche al centro del dibattito in bioetica);
- per le associazioni dei pazienti (bisogni informativi, informazione su legislazione).

## **Storie e memorie dell'ISS**

Questo progetto intende ricercare e selezionare e diffondere testimonianze e materiale documentario utile a comprendere l'evoluzione storico-scientifica e culturale dell'ISS e della società stessa del secolo scorso. Verranno utilizzate fonti di varia natura: documentazione scritta, memorie orali, strumentazione scientifica, beni artistici e fotografie possedute dall'ISS, o facenti parte di collezioni private, di archivi istituzionali o di altri enti che hanno collaborato con l'Istituto.

La storia sarà anche ricostruita in particolare attraverso interviste a persone di rilievo nella vita dell'ente, che abbiano avuto un ruolo capofila per determinate attività, non necessariamente di rilevanza scientifica, ma anche solo di supporto alla ricerca o alla

struttura organizzativa dell'ente. La ricerca di strumentazione scientifica non più utilizzata ai fini di ricerca rappresenterà una parte importante dell'attività di recupero e valorizzazione del patrimonio storico-culturale dell'ente. Sarà data anche attenzione al recupero degli arredi di interesse storico.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Si prevede la realizzazione di uno o due convegni della serie "Storie e memorie dell'Istituto Superiore di Sanità" per presentare i prodotti realizzati nell'ambito del progetto: volumi a stampa su tematiche specifiche nella collana "I beni storico-scientifici dell'Istituto Superiore di Sanità", video interviste, mostre di strumentazione scientifica.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Considerando la natura dell'ISS, il principale ente di ricerca sanitaria in Italia – nato nel 1934 con l'obiettivo di tutelare e promuovere la sanità pubblica, e che ha ospitato al suo interno, nel corso degli anni, ricercatori di grande fama e premi Nobel –, l'iniziativa di recuperare la memoria di fatti inediti, vissuti in prima persona dai suoi dipendenti, ma mai emersi nella letteratura scientifica, avrà rilevanza nazionale e internazionale, essendo di interesse non solo per fini storico-sanitari, ma anche socio-culturali.

La storia dell'ente, infatti, verrà raccontata anche dai suoi protagonisti silenziosi, attraverso testimonianze originali, curiosità, e punti di vista finora inesplorati. Per questo motivo il progetto potrà avere un forte impatto dimensionale e potrà essere considerato un utile strumento didattico nelle scuole secondarie e nelle università; inoltre, potrà avere anche una diffusione a livello di grandi media.

### **Strategie di disseminazione di conoscenze scientifiche relazionate ad argomenti di salute pubblica attraverso un network internazionale di istituzioni accademiche e di ricerca**

Il progetto è finalizzato alla diffusione di risultati della ricerca attraverso una strategia di comunicazione che coinvolga target diversi e utilizzi i nuovi modelli di comunicazione ad accesso aperto. L'attività sarà svolta in collaborazione con istituzioni accademiche e di ricerca in salute pubblica, in particolare in Europa e in America Latina. Il progetto si sviluppa sulla base dell'esperienza del Progetto europeo NECOBELAC (FP7, *Science in Society*) coordinato dall'ISS e attivo per gli anni 2009-2012, che ha già sviluppato una rete di collaborazione tra paesi europei e latino americani per la diffusione di conoscenze in scrittura scientifica e nuovi modelli di pubblicazione. Si prevede di estendere la rete NECOBELAC e di potenziare le attività di cooperazione e disseminazione delle informazioni scientifiche a target diversi (ricercatori, bibliotecari, insegnanti, studenti, grande pubblico, decisori politici, ecc.) sviluppando nuove collaborazioni che consentano un più ampio confronto sulle necessità di informazione e le strategie di comunicazione. Gli argomenti di salute pubblica oggetto della strategia di comunicazione riguarderanno le attività istituzionali dell'ISS (dalle malattie infettive, all'ambiente, agli stili di vita, ecc.) per le quali è possibile avvalersi di competenze interne

#### **Risultati attesi nel triennio**

L'obiettivo è sensibilizzare diverse fasce di popolazione su temi di salute pubblica di interesse generale coinvolgendo esperti del settore (ricercatori di istituzioni scientifiche e accademiche) al fine di promuovere una comunicazione semplificata ed efficace diretta a target diversi. Si prevede una strategia di ricerca che metta a confronto e valuti opportunamente le diverse esigenze ed esperienze dei Paesi coinvolti nel progetto (in particolare europei e latino-americani) per arrivare alla definizione di un piano di attività che preveda l'organizzazione di una serie di incontri *vis à vis* a livello locale e la produzione di

materiale di divulgazione e didattico, a stampa e multimediale, considerando anche le potenzialità dei nuovi mezzi di comunicazione.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La natura stessa del progetto, basato su una forte attività di cooperazione internazionale, prevede la realizzazione di risultati trasferibili finalizzati alla disseminazione di informazioni scientifiche in ambiti diversi, secondo una logica di condivisione e adattamento alle realtà locali di contenuti di comprovata evidenza scientifica.

### **Traduzione italiana dei *Medical Subject Headings* (MeSH) della *National Library of Medicine* (USA) e partecipazione allo *Unified Medical Language System* (UMLS)**

I MeSH costituiscono il vocabolario di oltre 26.500 termini, prodotto e gestito dalla *National Library of Medicine* (NLM). La traduzione italiana del thesaurus MeSH è stata realizzata nell'ambito di una collaborazione tra l'ISS e la NLM di Bethesda, USA, che cura la produzione e l'aggiornamento di questo vocabolario medico, conosciuto a livello internazionale soprattutto come strumento per l'indicizzazione e la ricerca di articoli presenti nella base dati PubMed. La traduzione dei MeSH in italiano nasce nell'ambito del progetto UMLS della NLM, avviato nel 1986 per la creazione di un linguaggio medico accessibile universalmente attraverso i sistemi informativi computerizzati. Il Settore Documentazione (SD), in collaborazione con il Settore Informatico (SI), ha iniziato la traduzione nel 1998, e l'ha completata nel 2001. Da allora effettua regolarmente la revisione e l'aggiornamento dei dati, nonché la traduzione dei sinonimi dei descrittori principali, in collaborazione con la Biblioteca dell'ISS.

I MeSH sono attualmente utilizzati dalla Biblioteca dell'ISS per la catalogazione semantica delle pubblicazioni e il loro utilizzo è suggerito da vari editori per l'assegnazione delle parole chiave ai lavori scientifici; inoltre sono utilizzati in ISS per l'attribuzione di parole chiave alle attività svolte da Dipartimenti, Centri e Servizi in fase di rendicontazione annuale e per la presentazione di progetti.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I termini controllati MeSH sono revisionati e aggiornati annualmente sulla base dell'evoluzione delle scienze biomediche e i nuovi termini sono esaminati e definiti all'interno del contesto già esistente da un'apposita commissione, che ne valuta l'eventuale inserimento nel thesaurus. Ogni anno è pubblicata una versione aggiornata dei MeSH: i nuovi descrittori inseriti nell'anno 2011 sono 454, a cui vanno aggiunti i descrittori modificati o cancellati. Il sito ISS MeSH italiani deve essere aggiornato annualmente con l'inserimento dei nuovi descrittori e della relativa traduzione. Deve continuare anche l'attività di traduzione dei sinonimi (in totale oltre 120.000) per consentire un migliore recupero dell'informazione, attraverso una pluralità di punti di accesso. Inoltre deve essere effettuata la revisione di vaste aree tematiche, come ad esempio l'odontoiatria, in collaborazione con ricercatori dell'ISS. Dal 2004 la traduzione italiana dei MeSH è consultabile gratuitamente sul sito dell'ISS ([www.iss.it/site/mesh](http://www.iss.it/site/mesh)), attraverso un'interfaccia web appositamente creata. Dal 2009 l'interfaccia consente anche la ricerca e visualizzazione dei sinonimi del descrittore principale già tradotti (oltre 20.000).

#### **Trasferibilità dei risultati**

Per l'utenza esterna all'ISS, l'impiego della traduzione italiana all'interno di applicazioni informatiche è consentito previo pagamento di una tariffa regolamentata dal decreto "Tariffe servizi resi a terzi" del 14/5/2010; la tariffa è differenziata per diverse modalità di utilizzo e tipologie di utenza. Alcuni repertori internazionali di risorse Internet (ad esempio

[http://www.hon.ch/HONsearch/Patients/honselect\\_it.html](http://www.hon.ch/HONsearch/Patients/honselect_it.html)) e cataloghi di biblioteche biomediche usufruiscono di questo strumento di standardizzazione del linguaggio biomedico per rendere più facilmente fruibili al pubblico i risultati della ricerca. La traduzione italiana dei MeSH si inserisce anche a pieno titolo tra le iniziative di educazione sanitaria e di aggiornamento del medico: infatti si prevede come risultato la possibilità di interrogare il PubMed anche in lingua italiana. In collaborazione con il *Karolinska Institute*, è stato istituito un network internazionale per la diffusione e l'utilizzo del MeSH.



**Servizio informatico, documentazione, biblioteca  
ed attività editoriali**

---

**Attività di controllo, valutazione, parere**



### **Buona Pratica di Laboratorio (BPL) per i sistemi computerizzati**

Partecipazione alle ispezioni per la BPL, questa definisce i principi con cui le ricerche di laboratorio (studi) sono programmate, condotte, controllate, registrate e riportate, allo scopo di ottenere dati sperimentali di elevata qualità. I principi di BPL sono stati adottati dall'OECD per promuovere la qualità e la validità dei dati sperimentali utilizzati per determinare la sicurezza di sostanze e prodotti chimici. In quest'ambito si verifica la conformità ai principi di BPL per quanto riguarda la sicurezza informatica.

Partecipazione alle ispezioni per la BPL, questa definisce i principi con cui le ricerche di laboratorio (studi) sono programmate, condotte, controllate, registrate e riportate, allo scopo di ottenere dati sperimentali di elevata qualità. I principi di BPL sono stati adottati dall'OECD per promuovere la qualità e la validità dei dati sperimentali utilizzati per determinare la sicurezza di sostanze e prodotti chimici. In quest'ambito si verifica la conformità ai principi di BPL per quanto riguarda la sicurezza informatica.

#### **Attività programmata**

Proseguimento di tale attività nel triennio.

### **Valutazione di accessibilità di siti web**

L'ISS è stato iscritto (incarico del Presidente dell'ISS del gennaio 2008) il 28 febbraio 2008 nell'Elenco pubblico dei valutatori di accessibilità, predisposto e tenuto aggiornato a cura del Centro Nazionale per l'Informatica nella Pubblica Amministrazione (CNIPA, ora Ente nazionale per la digitalizzazione della pubblica amministrazione – DigitPA), ai sensi dall'art. 3 del DPR 1/3/2005, n. 75 pubblicato nella GU 3/5/2005, n. 101, e dalla Deliberazione CNIPA 15/9/2005, n. 25, pubblicata nella GU 21/9/2005, n. 220.

A seguito di questa iscrizione effettua “verifica tecnica e verifica soggettiva” avendo dimostrato di possedere requisiti di garanzia di imparzialità e indipendenza, disponibilità di figure professionali esperte nonché di adeguata strumentazione per l'applicazione delle metodologie di verifica.

#### **Attività programmata**

Nel triennio in argomento il Gruppo web del Settore I effettuerà l'attività di valutazione, secondo il tariffario riportato nell'allegato F del Decreto del Ministro per l'Innovazione e le Tecnologie dell'8 luglio 2005.



**Presidenza**  
**Ufficio relazioni esterne**

---

**Attività di ricerca**



### **Billion Joint Lab**

La proposta si configura come un laboratorio congiunto costituito tra ISS e *Harvard University* per la raccolta e analisi di dati per la produzione di linee guida e la disseminazione di buone prassi nel settore della prevenzione e del contenimento del danno psico-sociale in corso di emergenze complesse, disastri naturali o meno.

Il laboratorio è costituito da una struttura permanente, che vedrà impegnati ricercatori e tecnici dei due istituti che operano da anni nel settore per quanto concerne l'impatto di breve e medio termine sui profili di mortalità e di morbosità diretti e indotti delle popolazioni e delle comunità colpite da catastrofi e disastri naturali o generati dall'uomo. In tal senso, hanno elaborato modelli di intervento che riguardano diverse categorie di contesto: carestie, terremoti, uragani e altri eventi acuti, non causati dall'uomo oltre a situazioni di conflitto, violenza di massa e violazione dei diritti umani a livello nazionale e internazionale, sia in situazioni di belligeranza che di assimilazione ad eventi e atti terroristici.

Il progetto si muoverà nel rispetto delle attività di ricostruzione dei tessuti socio-relazionali a favore delle vittime degli eventi derivanti dall'esercizio organizzato della violenza, alla luce delle indicazioni e delle linee guida già formulate durante la conferenza mondiale dei Ministri della Sanità "*1 Billion*", svoltasi a Roma il 3-4 dicembre 2004 e organizzata congiuntamente dalle due istituzioni.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Master Internazionale di Formazione *Global / Mental Health*.

Eventi scientifici.

Letteratura scientifica.

### **Accordo di collaborazione scientifica tra Università Telematica San Raffaele di Roma e ISS**

L'Università Telematica San Raffaele Roma (UNI SR) svolge, tra l'altro, attività di formazione e di ricerca nel campo del benessere e della salute, anche in collaborazione con altre istituzioni, in particolare con l'erogazione per via telematica, di tre Corsi di Laurea e cioè Scienze motorie, Scienza dell'Alimentazione e gastronomia, Design industriale e della moda, nonché di Master e Scuole di perfezionamento in queste aree e aree ad esse collegate.

L'UNI SR ha manifestato il proprio interesse a sviluppare specifiche attività di formazione universitaria che richiedono competenze tecnico-scientifiche particolari nel campo della salute pubblica. L'ISS e l'UNI SR hanno pertanto identificato una serie di aree di formazione e di ricerca di comune interesse.

Oggetto del presente accordo è la collaborazione tra ISS e UNI SR finalizzata alla progettazione, erogazione e valutazione di eventi di formazione su tematiche di comune interesse rientranti nell'area della salute pubblica utilizzando le attuali tecnologie e metodi di Formazione a Distanza (FAD) già sperimentati dall'ISS.

L'ISS ed l'UNI SR realizzeranno la suddetta collaborazione facendo riferimento alle rispettive unità di personale di ruolo e non di ruolo che verranno chiamate a collaborare dai Responsabili del progetto. Le dotazioni strumentali per la registrazione delle lezioni e le risorse finanziarie per la realizzazione degli eventi formativi saranno messe a disposizione da UNI SR.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Tale accordo si prefigge di attivare percorsi formativi in modalità FAD su tematiche di sanità pubblica e, grazie al bacino di utenza della UNI SR, raggiungere una fascia di partecipanti in via di formazione di base, come pure professionisti della sanità.

### **Trasferibilità dei risultati**

L'approccio didattico/organizzativo dei corsi offerti potrà essere esteso a più tematiche a valutazione dei risultati raggiunti con le prime sperimentazioni.

### **Accordo ISS-MATIMOP**

Nell'ambito dell'accordo bilaterale tra ISS e MATIMOP (Ministero dell'Industria dello Stato di Israele), sono proseguite le attività e le missioni volte ad attivare un Laboratorio Congiunto per la cooperazione scientifica e tecnologica in materia di sicurezza in salute pubblica. Il laboratorio congiunto mira a costruire un partenariato bilaterale per la promozione della sicurezza globale e affrontare congiuntamente i rischi potenziali per la salute nell'area del Mediterraneo. L'iniziativa presentata al MAE per l'ottenimento di finanziamento si prefigge di generare uno spin off esteso ai paesi afferenti all'area mediterranea. Le attività prevedono lo scambi di ricercatori, la costituzione di programmi congiunti di formazione e l'uso di strumenti ICT (ad esempio simulatori, gestione a distanza e l'apprendimento a distanza, telemedicina, telerilevamento e tecnologie digitali) per garantire sostenibilità e accessibilità alle aree limitrofe e confinanti alla UE.

### **Risultati attesi nel triennio**

Attivazione di un laboratorio congiunto su tematiche legate alla *bio-safety/bio-security*.

### **Accordo quadro tra la Scuola internazionale Ambiente salute e sviluppo sostenibile e l'ISS**

Il primo progetto nell'ambito del presente accordo è stato denominato "Salute e Ambiente Toscana per gli MMG della ASL di Arezzo", prevede la formazione degli MMG della ASL di Arezzo sulle tematiche ambientali di interesse sanitario presenti sul territorio ove essi operano. Gli obiettivi del percorso didattico che alterna fasi residenziali ad alta interattività (PBL) e fasi di lavoro sul campo (*Project Work*) sono così formulati:

- effettuare la ricognizione georeferenziata dei pericoli e dei fattori di rischio sanitari legati alla qualità dell'ambiente nell'ambito territoriale di competenza;
- delineare il ruolo dell'MMG nell'ambito della prevenzione e della epidemiologia regionale e aziendale, nonché in protocolli di ricerca sulla relazione tra salute degli assistiti e ambiente di residenza/lavoro;
- descrivere modalità di interazione con la rete di risorse e di esperti disponibile sul territorio nell'ambito della tematica ambiente e salute d'interesse;
- descrivere e applicare modalità appropriate di comunicazione del rischio tra MMG e cittadini;
- individuare fonti, strumenti e metodi per delineare le tematiche di maggiore attualità nella zona distretto di competenza (analisi di fabbisogno);
- elencare e descrivere le principali aree consolidate da evidenze e le principali aree grigie (mancanza di evidenze) nella relazione salute/ambiente, ricercando e valutando criticamente la letteratura scientifica relativa al tema salute/ambiente.

### **Risultati attesi nel triennio**

L'MMG rappresenta il contatto diretto tra i cittadini e le strutture dell'SSN. Chi si rivolge all'MMG si attende di ricevere una risposta competente al proprio bisogno non solo in materia di assistenza medica, ma anche in relazione a tematiche di prevenzione e promozione della salute per sé e per i componenti del proprio nucleo familiare.

Tale accordo si prefigge infatti di predisporre percorsi formativo-informativi nell'ambito delle tematiche concernenti la relazione tra salute e ambiente con lo scopo di promuovere la conoscenza delle evidenze scientifiche disponibili sull'impatto sanitario dell'inquinamento

ambientale e trasferire adeguati strumenti di intervento/informazione da parte degli operatori sanitari e ambientali, decisori e stake-holder coinvolti nella gestione delle attività in oggetto.

In questo ambito, quindi, si collocano i risultati attesi per il primo progetto attivato nel territorio della ASL di Arezzo che potrà essere esteso ad altre strutture della Regione Toscana dopo opportuna valutazione dei risultati.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'approccio didattico/organizzativo del progetto SAT-MMG, oltre che essere diffuso all'interno delle strutture della Regione Toscana, potrà essere utilizzato da altre Regioni italiane con la collaborazione e il supporto tecnico-scientifico dell'ISS all'attivazione di questo tipo di percorsi formativi.

### **Accordo quadro tra Regione Piemonte e ISS**

La Direzione Sanità della Regione Piemonte ha approvato la prosecuzione del progetto "Sperimentazione di modelli di valutazione di impatto ambiente-salute, utili ad individuare aree e/o tematiche territoriali a rischio ambientale e sanitario" la terza fase del quale prevede l'avvio di un accordo con l'ISS su alcuni aspetti gestionali e di prospettiva quali la formazione, l'analisi organizzativa, i monitoraggi, la comunicazione del rischio.

Oggetto del presente accordo quadro è la collaborazione tecnico-scientifica tra le due parti per sviluppare apposite strategie di sanità pubblica e relativi percorsi formativo-informativi nell'ambito delle tematiche pertinenti alla relazione tra salute e ambiente con particolare riguardo a:

- le basi scientifiche delle azioni di sanità pubblica in materia di prevenzione dei rischi ambientali;
- i criteri per l'individuazione delle priorità in tema di ambiente e salute in un contesto scientifico;
- il contributo del monitoraggio ambientale e del biomonitoraggio alla stima dei rischi per la salute;
- la comunicazione in materia di ambiente e salute, con lo scopo di promuovere la conoscenza e l'accesso alle evidenze scientifiche disponibili sulla relazione tra salute e ambiente e sviluppare adeguati modelli e strumenti di intervento per la ottimale gestione integrata delle tematiche salute e ambiente nel territorio della Regione Piemonte.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Tale accordo si prefigge di predisporre percorsi formativo-informativi nell'ambito delle tematiche concernenti la relazione tra salute e ambiente con lo scopo di promuovere la conoscenza delle evidenze scientifiche disponibili sull'impatto sanitario dell'inquinamento ambientale e trasferire adeguati strumenti di intervento/informazione da parte degli operatori sanitari e ambientali, decisori e stake-holder coinvolti nella gestione delle attività in oggetto.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'approccio didattico/organizzativo dei progetti che saranno attivati nell'ambito dell'accordo potranno essere proposti ad altre Regioni.

### **ADAMp/EVAs**

Laboratorio congiunto ISS – *Karolinska Institutet* nel campo della formazione professionale in salute pubblica, finalizzato alla creazione di due modelli sperimentali ad alta innovazione tecnologica per la ricerca scientifica e per la formazione specialistica nel campo biomedico e psico-sociale.

### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto prevede lo sviluppo di due modelli sperimentali dotati di intelligenza artificiale (EVAs e ADAMp) da destinare alla formazione innovativa specialistica nel campo della salute mentale e globale al fine di migliorare la conoscenza epidemiologica e psico-sociale. L'utilizzo di immagini computerizzate e algoritmi, tali anche da garantire la presenza di anomalie o alterazioni morfologiche e reattività psico-emotiva rende il più realistico possibile l'interazione tra uomo e macchina per gli scopi previsti. L'implementazione dell'utilizzo pubblico avviene attraverso un software applicativo comunemente utilizzato e utile per la sperimentazione di pratiche formative nel campo biomedico e psico-sociale.

### **Collaborazione istituzionale con *National Library of Medicine, NIH, USA***

Si prevede un'evoluzione strategica della collaborazione secondo due linee fondamentali: lo sviluppo di database conoscitivi multimediali, utilizzabili nelle attività che prevedono l'erogazione di azioni formative a distanza basate sulla piattaforma digitale che l'ISS ha perfezionato; l'utilizzazione delle risorse digitali della NLM per la conduzione di attività di supporto ai progetti di virtualità che l'ISS sta impostando (paziente virtuale, ospedale virtuale, distretto sanitario virtuale). Uno sviluppo particolare è previsto nell'ambito del *Visible Human Project* della stessa NLM, con l'attivazione di una sede *mirror* presso l'ISS, utilizzabile soprattutto per l'impostazione e la conduzione di trial clinici virtuali.

### **Risultati attesi nel triennio**

Moduli formativi multimediali evoluti; paziente virtuale e organizzazione sanitaria virtuale approntati e disponibili su portale dedicato; trial virtuali impostati e validabili anche attraverso una specifica collaborazione che verrà proposta all'autorità regolatoria nazionale.

### **Trasferibilità dei risultati**

Anche se lo sviluppo digitale non è sottoposto a brevettazione, si definiranno pacchetti di servizio che saranno erogati secondo il nomenclatore tariffario dell'ISS. Quanto sviluppato in *open source* sarà depositato presso il sito del riutilizzo dell'autorità informatica centrale.

### **Convenzione tra il Ministero della Salute e l'ISS per il Sistema nazionale di verifica e controllo sull'assistenza sanitaria (SiVeAS)**

La Direzione Generale della programmazione sanitaria del Ministero della Salute, nell'ambito delle attività di supporto tecnico interno del SiVeAS, ha stipulato in data 23 dicembre 2011 una convenzione con l'ISS di durata di 12 mesi.

Oggetto della convenzione è la progettazione di un percorso di alta specializzazione per la gestione di problematiche complesse nel settore della sanità pubblica e in particolar modo per la gestione dei piani di rientro.

Le attività oggetto della presente convenzione verranno dettagliate con apposito atto separato e successivo.

### **Risultati attesi nel triennio**

Progettazione di percorsi di alta specializzazione per la gestione di problematiche complesse e in particolare per la gestione dei piani di rientro.

### **Trasferibilità dei risultati**

Il percorso formativo sarà destinato ai funzionari coinvolti nelle problematiche oggetto della convenzione in tutte le Regioni interessate.

### **Italian-Egyptian Debt for Development Swap Program – Progetto Health Governance Unit**

Il Progetto *Health Governance Unit* si inserisce nell'ambito del Programma di riconversione del debito, firmato al Cairo (Egitto) il 3/7/2007 tra il Governo italiano ed egiziano. È finalizzato a sviluppare le competenze formative del *Medical Research Institute* dell'Università di Alessandria, a supporto del processo di riforma sanitaria del Paese e per il controllo delle malattie infettive. Il progetto prevede la costruzione di un laboratorio di biosicurezza di terzo livello (BSL-3). I percorsi formativi offerti al personale egiziano sono organizzati e condotti da esperti dell'ISS con il coinvolgimento di personale proveniente da enti di eccellenza dell'SSN e da Università italiane.

La durata del progetto è di tre anni (2011-13).

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto fornirà supporto tecnico-scientifico al fine di costituire presso il *Medical Research Institute* una struttura di laboratorio altamente specializzata e di formare personale in grado di supportare il processo di riforma sanitaria del Paese.

#### **Trasferibilità dei risultati**

La metodologia utilizzata dal progetto ne consentirà la replicabilità in contesti simili.

### **Master in Global Development and Social Justice**

Sulla base dell'accordo sottoscritto con la *St. John's University* di New York si intende proseguire la collaborazione congiunta nell'ambito del Master *Global Development and Social Justice*. Il Master prevede la formazione biennale di 35 studenti universitari laureati provenienti da Paesi in transizione e in via di sviluppo, vincitori di borse di studio erogate dalla *St. John's University*. Il piano di studi offre una preparazione teorica multidisciplinare per l'interpretazione dei fenomeni politici, economici e socio-sanitari della complessa realtà internazionale. Inoltre, garantisce l'acquisizione e il perfezionamento di nozioni di base, criteri fondamentali e competenze tecniche per la progettazione in ambito europeo e internazionale e per la cooperazione allo sviluppo nel settore pubblico, privato e no-profit.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Attivazione di un Master internazionale con accreditamento universitario.

Formazione di studenti universitari.

### **Master universitario di secondo livello in governo clinico per la medicina interna**

Il Master biennale è rivolto ai medici internisti e si propone di sviluppare capacità di governo dei processi di assistenza allo scopo di raggiungere obiettivi di appropriatezza ed efficienza; far acquisire ai partecipanti il know how e le capacità distintive necessarie per una crescita professionale rispondente alle esigenze aziendali di avvalersi di équipe multidisciplinari per governare la complessità ospedaliera del nuovo millennio; far acquisire competenze specifiche nell'area gestionale organizzativa che si focalizza sull'interazione tra persone e contesto di lavoro.

Prevede tre moduli: un primo modulo erogato in modalità residenziale, basato su incontri formativi (lezioni accademiche in cui interverranno esperti disciplinari, esercitazioni assistite e studi di casi), erogabili secondo un programma settimanale in ciclo continuativo fino al completamento del modulo (ovvero all'acquisizione della competenza richiesta). Il primo modulo è coordinato dal Libero Istituto Universitario Carlo Cattaneo (LIUC). Il secondo modulo è erogato in modalità FAD. Tale modalità sarà svolta con il metodo *Problem Based*

*Learning* (PBL). Questo modulo è coordinato dall'ISS. I partecipanti concluderanno l'attività formativa con il terzo modulo, coordinato dalla Federazione delle Associazioni dei Dirigenti Ospedalieri Internisti (FADOI), riguardante la stesura di un *project work*, che verterà su una tematica manageriale. L'elaborato verrà poi valutato durante la discussione finale.

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi nel triennio sono:

- formazione di almeno trenta dirigenti ospedalieri dell'SSN per biennio;
- miglioramento delle competenze nelle Regioni da cui provengono i partecipanti nell'ambito della gestione dei pazienti, del *case management* e della continuità assistenziale ospedale-territorio come previsto nel PSN;
- rinnovamento metodologico della formazione in campo sanitario, grazie alla funzione di collaborazione tecnico-scientifica dell'entità proponente con i discenti. Tale beneficio si potrà concretizzare, come già verificato negli anni trascorsi, con l'introduzione di nuove strategie educative per le professioni sanitarie e di sistemi informatizzati orientati sul discente per la ricerca bibliografica e l'auto-istruzione guidata a distanza;
- miglioramento dell'efficacia e dell'efficienza dei programmi sanitari per mezzo di attività di ricerca operativa rilevanti per i sistemi sanitari regionali di provenienza;
- scambio attivo di esperienze e competenze in un ambito formativo multidisciplinare, con varia provenienza geografica e amministrativa e creazione di rapporti privilegiati di comunicazione e collaborazione tra dirigenti ospedalieri e non delle varie Regioni.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il Master consentirà la trasmissione di competenze nella gestione e realizzazione di attività formative analoghe a quelle disponibili presso le strutture delle diverse Regioni italiane che partecipano alla realizzazione del corso, a favore delle istituzioni regionali da cui i partecipanti provengono o che hanno, comunque, competenza accademico-formativa in sanità pubblica a livello loco-regionale.

#### **Problem Based e-Learning – PBeL**

Il progetto è finalizzato alla sperimentazione in ambito e-learning di metodologia *problem based*. Infatti le due istituzioni operano da anni nel campo della formazione sanitaria, manageriale e tecnico-specialistica attraverso metodologie di apprendimento per problemi (*Problem Based Learning* e studio di casi) innovative e basate sull'evidenza di efficacia in termini di impatto formativo duraturo e qualificante nell'ambito del ragionamento clinico e della sanità pubblica. Grazie a questo progetto si vuole sperimentare concretamente la fruibilità del metodo didattico citato secondo le procedure e le opportunità fornite dalla didattica digitale erogata con modalità a distanza da PBL a PBeL).

Il Progetto definisce i materiali ritenuti qualificati, rilevanti e disponibili presso le due istituzioni, utili alla costruzione di moduli didattici di indirizzo manageriale e tecnico-specialistico in sanità a livello nazionale e internazionale. Questo porta alla produzione di moduli sperimentali pubblicabili sulla piattaforma elettronica dell'ISS e della Mc Gill.

Una volta individuati i possibili contesti per lo sviluppo e per l'erogazione dell'attività didattica, le due parti estenderanno il campo della ricerca e raccolta dei materiali anche ad altre organizzazioni di riconosciuta eccellenza per organizzare formazione specifica nel settore sanitario.

### **Risultati attesi nel triennio**

Banca dati virtuale destinata alla raccolta e archiviazione specializzata in casi di studio, letteratura scientifica e materiale didattico in generale.

Moduli formativi sperimentali in PBeL da erogare attraverso modalità sincrona e asincrona attraverso didattica via web.

### **Potenziamento della Facoltà di Medicina "A.M. Dogliotti Medical College" di Monrovia, Liberia**

L'*A.M. Dogliotti Medical College* ha subito gli effetti devastanti della lunga guerra civile, che in diverse ondate tra il 1989 e il 2003 ha portato alla progressiva distruzione della infrastruttura, degli equipaggiamenti, dei laboratori e dei servizi di supporto del College come dell'intero sistema Paese.

Attività: revisione dei curricula formativi tale da permettere il riconoscimento internazionale e tenere in considerazione le necessità e le specificità della situazione sanitaria liberiana; copertura delle carenze relative al personale docente (numero di docenti, qualifiche, livello di aggiornamento, disponibilità all'insegnamento); aggiornamento del livello della tecnologia: pochi equipaggiamenti disponibili risultano datati e insufficienti per una moderna diagnostica, limitando quindi le possibilità di aggiornamento professionale dei docenti e l'insegnamento.

Il progetto, fortemente richiesto dalla Presidenza del Paese, si propone di contribuire a migliorare lo stato di salute della popolazione della Liberia con la formazione dei quadri della sanità. In particolare il progetto prevede di migliorare e rafforzare la capacità dell'*A.M. Dogliotti Medical College* nel formare medici qualificati e competenti. La strategia elaborata per l'esecuzione del progetto si propone di intervenire su varie componenti contribuendo quindi in maniera organica e sinergica al raggiungimento dell'obiettivo proposto.

### **Risultati attesi nel triennio**

La prima componente, affidata all'ISS, riguarda il miglioramento degli standard qualitativi dell'insegnamento intervenendo sulle importanti carenze relative alla docenza (numero docenti, aggiornamento professionale e formazione di nuovi docenti, numero di facilitatori dell'apprendimento; numero di tutor) e più in generale sulla qualità, i contenuti e le metodologie di insegnamento. Saranno inoltre rafforzate e migliorate le funzioni di supporto all'insegnamento universitario come i laboratori, la biblioteca e le strutture di supporto tecnico e amministrativo.

### **Trasferibilità dei risultati**

Gli strumenti proposti in questo progetto sono quelli della formazione, basati sulla verifica sistematica dell'efficacia, oltre all'esperienza di campo maturata dalle due istituzioni e alla sperimentazione dei curricula prodotti e delle linee guida di intervento nella produzione ed espletamento dei moduli didattici. In particolare le attività di valutazione dei discenti saranno sviluppate in conformità con le regole della trasparenza e della predefinitezza di obiettivi specifici di apprendimento come richiesto dalla moderna andragogia.

### **Progettazione di azioni formative istituzionali dell'ISS costruite in risposta al fabbisogno formativo delle Regioni e delle Province autonome generato dall'applicazione dei piani regionali di prevenzione**

Oggetto e scopo principale del progetto consistono nell'identificare il fabbisogno formativo prioritario generato dall'applicazione dei piani di prevenzione regionali con l'obiettivo finale di progettare attività di formazione istituzionale dell'ISS rispondenti a detto

fabbisogno, caratterizzate da requisiti di formazione efficace per l'adulto e di fattibile applicazione a livello regionale.

Le attività verranno condotte tramite un programma di attività concordato come parte integrante del progetto (cronogramma) e consisteranno in workshop interattivi con il personale delle Regioni e Province autonome coinvolto nei processi di formazione continua del personale sanitario che si occupa di prevenzione/sanità pubblica. Verrà attivata una pagina web sul sito ISS dedicata al progetto accessibile ai chi partecipa al progetto. I risultati finali verranno diffusi con una conferenza nazionale in ISS.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Il progetto mira a raggiungere i seguenti obiettivi:

- identificare le tematiche di formazione continua in ordine prioritario relative all'applicazione dei piani di prevenzione regionali declinate in obiettivi formativi generali e specifici e relativi destinatari;
- descrivere i requisiti di formazione efficace basati sulle prove fornite dalla ricerca scientifica di settore volti a produrre un cambiamento delle capacità professionali, del livello organizzativo e degli esiti e realisticamente applicabili ai percorsi formativi individuati dal progetto;
- identificare strategie organizzative per erogare percorsi di formazione dell'ISS trasferibili alle strutture sanitarie territoriali per il tramite delle Regioni e valutabili negli effetti sulla base di indicatori sviluppati di concerto con le Regioni;
- identificare potenziali strategie organizzative per promuovere la sostenibilità del confronto tra Regioni e ISS in ambito di formazione continua in sanità pubblica del personale dei servizi di prevenzione a livello territoriale e regionale.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Il progetto offre l'opportunità, con un investimento capitale limitato e quindi fattibile, di attivare un sistema di consultazione e condivisione che, se ritenuto utile, potrebbe essere in seguito mantenuto con un modesto impegno finanziario delle Regioni a fronte di una maggiore rispondenza dei percorsi formativi organizzati dall'ISS alle necessità regionali in tema di prevenzione e sanità pubblica. Come beneficio aggiuntivo e trasversale, offre l'opportunità di attivare un proficuo scambio tecnico-scientifico tra Regioni e ISS (alleanze tra *stake-holder*) sulle tematiche di formazione efficace (in grado di generare a cascata il cambiamento professionale, il miglioramento dei servizi, il miglioramento degli esiti, eventuali sinergie d'azione interregionali) applicabili allo sviluppo delle risorse umane dell'SSN operanti nei dipartimenti di prevenzione territoriali e nelle strutture regionali deputate alle attività di prevenzione.

### **Programma EUROSociAL II**

EUROSociAL II è un programma finanziato dalla CE, finalizzato a promuovere la coesione sociale in America Latina attraverso scambi di esperienze, conoscenze e buone pratiche fra amministrazioni pubbliche dell'UE e dell'America Latina sull'accesso universale a servizi sociali e sanitari di qualità. La gestione del programma prevede la partecipazione di soci operativi (tra cui il Ministero della Salute) che si avvalgono di entità collaboratrici (tra cui l'ISS) per la progettazione ed esecuzione delle azioni di assistenza tecnica a favore dei paesi beneficiari. Il piano annuale d'azione che stabilisce le azioni specifiche del programma EUROSociAL viene definito successivamente all'aggiornamento delle richieste segnalate dalle autorità di governo alle Delegazioni dell'UE in America Latina e viene presentato alla CE. I soci operativi, coordinati dai soci coordinatori e congiuntamente

con le controparti latinoamericane, progettano i diversi interventi e definiscono il budget per l'implementazione delle azioni. La durata del programma è di quattro anni (2011-14).

#### **Risultati attesi nel triennio**

I risultati attesi vanno dall'applicazione rigorosa di una metodologia per lo scambio di esperienze fino alla implementazione di meccanismi di identificazione e approfondimento della domanda.

In ambito sanitario, i risultati attesi si riferiscono all'equità di accesso ai servizi sanitari, al miglioramento della qualità dei servizi e alla valutazione di impatto delle politiche sanitarie.

#### **Trasferibilità dei risultati**

Lo scambio di esperienze per il miglioramento della qualità dell'assistenza sanitaria e l'accesso ai servizi sanitari consentirà la replicabilità dei risultati prodotti non solo nei Paesi interessati dal programma, ma anche ad altre nazioni.

### **Programma regionale di formazione dei formatori sanità della Regione autonoma della Sardegna**

La Direzione Generale dell'Assessorato dell'Igiene e sanità e dell'Assistenza sociale della Regione autonoma della Sardegna, con il fine di sviluppare le competenze dei propri dipendenti sulle tematiche di formazione continua in sanità pubblica, ha richiesto all'ISS di istituire un apposito accordo di collaborazione.

ISS e Direzione Generale Sanità, ciascuno secondo le proprie competenze, contribuiranno alla organizzazione del "Programma Regionale Formazione Formatori Sanità" che prevede la formazione di formatori (FDF), che operano nelle strutture sanitarie pubbliche regionali, l'organizzazione di workshop sulle tematiche del programma e di *study tour* in enti di eccellenza sul territorio nazionale.

Gli scopi della collaborazione sono la progettazione, attuazione e valutazione di un percorso formativo a carattere regionale, con l'obiettivo finale di una corretta e aggiornata gestione delle attività di formazione continua nelle strutture sanitarie regionali in sinergia con le strategie più efficaci e appropriate utilizzate a livello nazionale e internazionale prevedendo anche momenti di riflessione e confronto a detti livelli. Le attività dell'accordo di collaborazione vengono condotte nel rispetto delle scadenze previste dalla Regione Sardegna. Il personale URE ha organizzato una serie di moduli didattici sia per i responsabili degli Uffici formazione delle varie strutture sanitarie regionali che per i loro collaboratori.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Miglioramento delle competenze del personale afferente agli Uffici di formazione delle strutture sanitarie della Regione Sardegna. Introduzione di tecnologie e metodi didattici innovativi quali il *Problem Based Learning* e la FAD. Attivazione di accordi di collaborazione con ASL o Aziende Ospedaliere della Regione con specifici progetti di formazione in sanità pubblica. Nel corso dell'anno 2011 è stata istruita una convenzione con la ASL di Carbonia-Iglesias e iniziato un percorso di collaborazione specifica sul tema di formazione innovativa con la ASL di Lanusei.

#### **Trasferibilità dei risultati**

L'approccio didattico/organizzativo del progetto può essere esteso ad altre Regioni italiane. Nel corso dell'anno 2011 una Regione italiana ha infatti contattato l'URE per programmare nell'anno 2012 un progetto di formazione dei formatori per i responsabili degli uffici formazione delle strutture sanitarie regionali.

**Registro di popolazione per l'infarto acuto del miocardio (IMA): studio di fattibilità per un sistema di sorveglianza dell'infarto acuto del miocardio in paesi del Mediterraneo, secondo le raccomandazioni EUROCISS**

Il progetto “Registro di popolazione per l'infarto acuto del miocardio (IMA): studio di fattibilità per un sistema di sorveglianza dell'infarto acuto del miocardio in Paesi del Mediterraneo, secondo le raccomandazioni EUROCISS” si inserisce nell'ambito dei progetti di partenariato EuroMed a carattere sanitario, finalizzati a rafforzare i sistemi sanitari e l'offerta di salute attraverso la lotta alle malattie non trasmissibili, in linea con gli impegni presi dall'Italia all'interno dell'Unione per il Mediterraneo. È finalizzato a promuovere l'adozione di un sistema di sorveglianza che utilizzi procedure e metodi standardizzati in Paesi del Mediterraneo, facendo tesoro dell'esperienza di EUROCISS, progetto finanziato dalla CE dal 2000 al 2007. Il manuale di operazioni di EUROCISS sarà testato nei Paesi partner (Egitto e Croazia) con uno studio pilota su dati raccolti routinariamente. La durata del progetto è di un anno (2012).

***Risultati attesi nel triennio***

I risultati attesi del progetto si riferiscono alla valutazione della fattibilità di un registro di popolazione per l'IMA. Risultati immediati saranno costituiti dalla formazione del personale per lo studio pilota da condurre e dalla raccolta dei dati (dati censuari di popolazione e diagnosi di dimissione ospedaliera per IMA e causa di morte), necessari per la testare il manuale di operazioni EUROCISS nei Paesi partner.

La messa a regime del registro consentirà il confronto di indicatori validi, a livello sia nazionale che internazionale.

***Trasferibilità dei risultati***

L'estensione della metodologia del progetto ad altri Paesi, che attualmente non dispongono di un sistema di registro dell'IMA, faciliterà l'adozione di un registro sull'IMA basato su metodi e procedure standardizzate e validate e, conseguentemente, permetterà di confronti a livello internazionale.

**Presidenza  
Unità di bioetica**

---

**Attività di ricerca**



### **Attività istituzionale e di consulenza nel settore della bioetica**

Proseguiranno incarichi presso commissioni e comitati, tra cui: il Gruppo misto CNB-CNBBSV (Comitato Nazionale per la Bioetica – Comitato Nazionale per la Biosicurezza, le Biotecnologie e le Scienze della Vita) della Presidenza del Consiglio dei Ministri; il CSS; il Gruppo tecnico multidisciplinare per l'autorizzazione alla conservazione del sangue cordonale nel caso di particolari patologie; la Consulta nazionale trapianti; la Commissione nazionale per il Programma di trapianto incrociato di rene.

Come membro del *Working Group on Ethical Issues di Alzheimer Europe*, contribuirà alla stesura di linee guida per la sperimentazione clinica con pazienti incapaci di esprimere il consenso.

Proseguiranno anche gli incarichi come membro dei comitati etici dell'ISS e di altre istituzioni.

All'interno dell'ISS proseguirà inoltre l'incarico come membro del Gruppo Interdipartimentale di Oncologia, nonché del *Working Group* sugli aspetti etici e regolatori del Nodo italiano di "BBMRI".

Proseguirà l'attività di consulenza per il Presidente dell'ISS, per i Dipartimenti e Centri nazionali dell'ISS e verso istituzioni esterne (ad esempio: Consiglio Superiore della Magistratura, CSS, Corte di Cassazione, Garante per la Protezione dei Dati Personali).

Proseguirà l'attività per la Pontificia Accademia per la Vita, di cui è membro dal 2011.

#### **Risultati attesi nel triennio**

Dall'attività istituzionale e di consulenza all'interno dell'ISS scaturiranno: documenti elaborati dall'Unità di Bioetica singolarmente, con altre componenti dell'ISS e con altre istituzioni; documenti ufficiali e pareri informali; contributi per la redazione di linee guida e normative; contributi per la preparazione e l'esecuzione di progetti di ricerca. Dalla partecipazione a comitati etici scaturiscono non solo pareri, ma anche autorizzazioni a norma di legge.

### **Partecipazione progetti di ricerca, per aspetti di bioetica**

La partecipazione a progetti di ricerca implica:

- Responsabilità di Ethics Advisor, per incarico dall'European Research Council, del progetto "The impact of DEMographic Changes on Infectious DisEases transmission and control in middle/low income countries, DECIDE", coordinato dall'Università Bocconi – Dondena Centre.
- Responsabilità dell'Unità Operativa di Bioetica del progetto "Revisione della nosografia degli stati vegetativi: applicazione di metodiche di analisi del comportamento a soggetti in coma e stato vegetativo".
- Partecipazione al progetto "Implementazione di una rete nazionale di biobanche regionali per la conservazione protratta del materiale residuo dello screening neonatale", coordinato dal Dipartimento di BCN dell'ISS.
- Partecipazione a progetto "RD-Connect", in collaborazione con il CNMR dell'ISS.
- Partecipazione al progetto "Bioethical issues in the use of the new criteria for prodromal Alzheimer disease: disclosure of the diagnosis, clinical trials, social impact", coordinato dall'IRCCS Fatebenefratelli di Brescia.
- Partecipazione al progetto "EuEvidence: European Virtualized Infrastructure of Distributed ENvironments for Clustering E-science for medicine", coordinato dal consorzio GARR (Rete Italiana delle Università e della Ricerca).

### **Risultati attesi nel triennio**

Sono obiettivo dei progetti di ricerca dati e analisi riguardanti numerosi temi eticamente rilevanti, tra cui: ricerca di base, sperimentazione clinica, ricerca traslazionale, ricerca epidemiologica e osservazionale, ricerca in sanità pubblica, ricerca con campioni biologici, ricerca con persone incapaci di esprimere il consenso, tutela dei dati personali, protezione delle persone partecipanti a sperimentazioni, valutazione e gestione del rischio clinico.

### **Pubblicazioni e attività didattica nel settore della bioetica**

Dalle attività istituzionali e di ricerca scaturirà anche la pubblicazione di lavori scientifici. Nel triennio precedente il responsabile dell'Unità di Bioetica ha pubblicato oltre 100 lavori scientifici, di cui oltre la metà in riviste di rilevanza internazionali che hanno contribuito in modo rilevante all'impact factor cumulativo dell'ISS.

Proseguiranno gli incarichi di: membro dell'*Editorial Board* di "*Journal of Clinical Research & Bioethics*"; membro dell'*Advisory Board* di "*Clinical Trial Magnifier*" (*Clinical Trials Centre, University of Hong Kong*); responsabile della rubrica "Etica della biologia" di "Biologi Italiani" (Ordine Nazionale dei Biologi).

Proseguirà inoltre l'attività di revisore, su temi di bioetica, per riviste di rilevanza internazionale.

L'attività didattica è realizzata mediante: direzione scientifica di corsi nell'ambito delle attività formative dell'ISS, docenza corsi organizzati da altre strutture, incarichi di docenza universitari, lezioni occasionali in corsi in altre sedi, pubblicazioni scientifiche divulgative. La direzione del corso dell'ISS "Etica della ricerca scientifica: studi clinici, di popolazione, genetici" sarà condivisa con il CNESPS. L'attività didattica in ambito universitario si realizza anche con l'incarico di relatore in tesi di laurea e di dottorato su temi di bioetica.

### **Risultati attesi nel triennio**

Le pubblicazioni e l'attività didattica contribuiscono alla divulgazione e all'apprendimento della bioetica all'interno dell'Istituto, in ambito nazionale e in ambito internazionale. L'esperienza passata attesta che le numerose pubblicazioni di rilevanza internazionale (sia commissionate, sia programmate nell'ambito delle attività di ricerca e istituzionali) costituiscono un prodotto apprezzato e utilizzato in numerose nazioni non soltanto europee.

*Stampato in proprio*

*Settore Attività Editoriali – Istituto Superiore di Sanità  
viale Regina Elena 299  
00161 Roma*

*maggio 2012*