



**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ
PIANO ATTIVITÀ 2009-2011**

Progetti di ricerca

Vol. 2

Istituto Superiore di Sanità

Istituto Superiore di Sanità. Piano Attività 2009-2011. Progetti di ricerca e attività di controllo. Vol. 2.

iii, 924 p.

Il presente Piano Attività 2009-2011 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 (2006-2008). Il secondo volume presenta le linee di ricerca e le attività di controllo per il triennio 2009-2011 suddivise per Dipartimenti, Centri e Servizi. Il terzo volume riporta in elenco alfabetico le pubblicazioni dei ricercatori dell'ISS prodotte nel triennio 2006-2008.

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

Istituto Superiore di Sanità

Istituto Superiore di Sanità. Activity Plan 2009-2011. Research projects. Vol. 2.

iii, 924 p. (in Italian)

This Plan 2009-2011 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 (2006-2008). The second volume offers the research and the control activity for 2009-2011 divided into Departments, Centres and Services. The third volume contains the alphabetical list of the bibliographic references of the publications of ISS scientists in 2006-2008.

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.

© Istituto Superiore di Sanità

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

INDICE

Lista degli acronimi	iii
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria	
Attività di ricerca	1
Attività di controllo, valutazione, parere.....	37
Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze	
Attività di ricerca	55
Attività di controllo, valutazione, parere.....	133
Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare	
Attività di ricerca	141
Attività di controllo, valutazione, parere.....	177
Dipartimento del Farmaco	
Attività di ricerca	183
Attività di controllo, valutazione, parere.....	285
Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate	
Attività di ricerca	295
Attività di controllo, valutazione, parere.....	429
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare	
Attività di ricerca	451
Attività di controllo, valutazione, parere.....	517
Dipartimento di Tecnologie e Salute	
Attività di ricerca	529
Attività di controllo, valutazione, parere.....	571
Centro Nazionale AIDS per la patogenesi e vaccini contro HIV/AIDS	
Attività di ricerca	587
Attività di controllo, valutazione, parere.....	627
Centro Nazionale Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute	
Attività di ricerca	631
Attività di controllo, valutazione, parere.....	733
Centro Nazionale Sostanze Chimiche	
Attività di ricerca	763
Attività di controllo, valutazione, parere.....	771

Centro per la ricerca e la valutazione dei prodotti immunobiologici	
Attività di ricerca	775
Attività di controllo, valutazione, parere.....	795
Centro Nazionale Malattie Rare	
Attività di ricerca	809
Attività di controllo, valutazione, parere.....	815
Centro Nazionale Sangue	
Attività di ricerca	819
Attività di controllo, valutazione, parere.....	833
Centro Nazionale Trapianti	
Attività di ricerca	839
Attività di controllo, valutazione, parere.....	843
Organismo di valutazione e accreditamento	
Attività di ricerca	855
Attività di controllo, valutazione, parere.....	859
Servizio Biologico e per la Gestione della Sperimentazione Animale	
Attività di ricerca	865
Attività di controllo, valutazione, parere.....	869
Servizio Informatico, Documentazione, Biblioteca ed Attività Editoriali	
Attività di ricerca	877
Attività di controllo, valutazione, parere.....	891
Presidenza Ufficio Relazioni Esterne	
Attività di ricerca	895
Presidenza Unità di Bioetica	
Attività di Ricerca	917

LISTA DEGLI ACRONIMI

Dipartimenti

AMPP	Ambiente e connessa prevenzione primaria
BCN	Biologia cellulare e neuroscienze
EOMM	Ematologia, oncologia e medicina molecolare
FARM	Farmaco
MIPI	Malattie infettive, parassitarie ed immunomediate
SAAN	Sanità alimentare e animale
TES	Tecnologie e salute

Centri

CNAIDS	Centro Nazionale AIDS per la patogenesi e vaccini contro l'HIV/AIDS
CNE (o CNESPS)	Centro Nazionale di epidemiologia, sorveglianza e promozione della salute
CNRA (o CNQRA)	Centro Nazionale per la qualità degli alimenti e per i rischi alimentari
CNS	Centro Nazionale Sangue
CNT	Centro Nazionale Trapianti

Servizi

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

URE	Ufficio per le Relazioni Esterne
------------	----------------------------------

Dipartimento
Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

Attività di ricerca

Accordo tra l'ICRAM e l'ISS di collaborazione scientifica per l'effettuazione di uno studio sulla presenza di alcuni composti chimici del Cromo III e Cromo VI e del Mercurio nei sedimenti portuali oggetto di bonifica e i loro effetti sull'ambiente acquatico e sull'uomo

Oggetto della presente convenzione è l'accordo, tra l'Istituto centrale per la ricerca scientifica e tecnologica applicata al mare (ICRAM) e l'ISS, di collaborazione scientifica per l'effettuazione di uno studio sulla presenza di alcuni composti chimici del Cromo III e Cromo VI e del Mercurio nei sedimenti portuali e i loro effetti sull'ambiente acquatico e sull'uomo.

Lo studio prevede la ricerca di sostanze volatili prelevate in diverse realtà portuali italiane.

Risultati attesi nel triennio

Impostazione di una "analisi di rischio" sanitario ambientale specifica per sedimenti contaminati.

Trasferibilità dei risultati

Messa a punto di specifiche metodiche per la speciazione di metalli tossici. Valutazione sanitaria e ambientale per la movimentazione di sedimenti contaminati da tali metalli.

Ampliamento delle potenzialità di applicazione di sistemi cellulari per la definizione del profilo tossicologico di contaminanti ambientali di diversa natura

L'ISS svolge un ruolo preminente, conferitogli dal DL.vo n. 116 del 1992, che recepisce la direttiva CEE n.86/609/CEE in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici, nello sviluppo, validazione e uso di metodi alternativi alla sperimentazione animale mediante l'elaborazione di progetti specificamente dedicati a questo scopo.

Il Reparto Meccanismi di tossicità è impegnato, fin dalla sua costituzione, nella caratterizzazione e standardizzazione di linee cellulari rappresentative di sistemi *in vivo* e nello studio dei meccanismi di tossicità di sostanze di natura diversa, con l'obiettivo finale di contribuire al processo di valutazione del rischio.

Le colture cellulari, pur essendo dei sistemi semplificati rispetto all'organismo, hanno il vantaggio di poter essere utilizzate sia nella fase di screening delle sostanze tossiche, sia per lo studio del meccanismo d'azione, consentendo di evidenziare effetti precoci di citotossicità che, nella complessità di un intero organismo, potrebbero essere non rilevabili.

La ricerca attuale è focalizzata nella messa a punto e caratterizzazione di sistemi cellulari più complessi come gli epitelii delle diverse barriere biologiche di esposizione allo scopo di definirne la rilevanza in termini di predittività dell'assorbimento degli xenobiotici e della relativa biodisponibilità.

Risultati attesi nel triennio

Il presente progetto si propone di migliorare e ampliare le prestazioni dei modelli precedentemente descritti sia caratterizzandone la rilevanza con i relativi sistemi *in vivo* sia utilizzandoli su un più ampio spettro di contaminanti ambientali.

Sarà quindi studiata l'espressione di specifici trasportatori di epitelio sia a livello di trascrizione che di traduzione allo scopo di ampliare la capacità predittiva indipendentemente dal tipo di trasporto implicato attraverso le barriere.

Sarà caratterizzata la competenza metabolica cellulare allo scopo di valutarne la possibile influenza nei processi di assorbimento delle molecole ed eventualmente saranno messi a punto specifici protocolli di induzione di espressione.

Lo spettro di composti che si intende testare andrà dalle singole molecole di interesse ambientale, ad estratti di composizione eterogenea, a miscele di composizione nota di più tossine per valutare eventuali effetti di sinergia .

Trasferibilità dei risultati

L'obiettivo finale della presente ricerca è quello di disporre di modelli cellulari semplici e più complessi, la cui caratterizzazione abbia fornito parametri qualitativi ma soprattutto quantitativi di correlazione con i corrispondenti sistemi *in vivo*. Questo consentirebbe di prevedere con accuratezza la tossicità per l'uomo senza l'incertezza dovuta alle estrapolazioni specie-specifiche. Inoltre l'ampio spettro di composti di natura diversa testati ne amplierebbe le potenzialità di utilizzo, come ad esempio richiesto dalla legislazione REACH.

Atto di definizione dei rapporti tra il Comune di Portoscuso e l'ISS per la valutazione del rischio igienico-sanitario dei suoli compresi nel Sito di Interesse Nazionale Sulcis Iglesiente Guspinese

L'ISS svolgerà, in collaborazione con il Comune e con l'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), le attività necessarie per la valutazione del rischio igienico-sanitario, dettagliatamente indicate negli articoli successivi e nell'allegato tecnico, relativamente ai suoli compresi nel Sito di Interesse Nazionale Sulcis Iglesiente Guspinese con particolare riferimento alle aree agricole.

Le attività saranno organizzate come segue:

- definizione dello stato ambientale del territorio comunale di Portoscuso nelle diverse matrici;
- definizione del modello concettuale, il quale deve definire i legami tra le varie componenti del "rischio" ambientale (sorgenti, percorsi, bersagli);
- valutazione del rischio sanitario al quale la popolazione del Comune di Portoscuso è esposta, per il consumo di prodotti alimentari di origine vegetale coltivati nel Comune stesso, nonché per l'assunzione di prodotti di origine animale della stessa area di provenienza.

Risultati attesi nel triennio

Messa a punto di un Protocollo operativo per la valutazione dell'esposizione della popolazione del Comune di Portoscuso relativamente al consumo di prodotti alimentari (vegetali e animali) coltivati nel comune stesso.

Trasferibilità dei risultati

Raccolta e valutazione delle analisi chimiche ad oggi effettuate sui prodotti alimentari (animali e vegetali) provenienti dalle aree agricole del Comune di Portoscuso. Raccolta e valutazione delle analisi chimiche, chimico-fisiche, geologiche e idrogeologiche dei suoli e delle acque ad oggi effettuate per la caratterizzazione delle aree pubbliche del Comune stesso.

Elaborazione del "Modello Concettuale" del sito con divisioni dell'area in sub aree, sulle quali condurre la valutazione dell'esposizione della popolazione.

Atto di definizione dei rapporti tra il Comune di Brescia e l'ISS per la valutazione della qualità dell'aria ambiente e del rischio sanitario associato, nell'area del Comune di Brescia

L'attività verrà svolta sulla base di specifici sopralluoghi sulle aree di interesse. Raccolta di dati analitici relativi alle analisi già effettuate dell'aria ambiente e prosecuzione del monitoraggio dell'aria e delle ricadute al suolo degli inquinanti. Applicazione di modelli di

trasporto degli inquinanti nei suoli e nelle acque ed applicazione e valutazione del rischio igienico-sanitario.

Risultati attesi nel triennio

- Valutazione e validazione dei modelli di trasporto degli inquinanti nell'aria e ricadute al suolo
- Valutazione igienico-sanitaria dei rischi a cui la popolazione è potenzialmente esposta.

Trasferibilità dei risultati

Valutare i rischi igienico-sanitari connessi all'inquinamento dell'aria ambiente in alcune aree del Comune di Brescia in cui è necessario intervenire prioritariamente con l'operazione di bonifica, sulla base dei rischi sanitari individuati.

Atto di definizione dei rapporti tra il Comune di Brescia e l'ISS per la valutazione della qualità dell'aria ambiente e del rischio sanitario associato, nell'area del Comune di Brescia

L'attività verrà svolta sulla base di specifici sopralluoghi sulle aree di interesse. Raccolta di dati analitici relativi alle analisi già effettuate dell'aria ambiente e prosecuzione del monitoraggio dell'aria e delle ricadute al suolo degli inquinanti. Applicazione di modelli di trasporto degli inquinanti nei suoli e nelle acque ed applicazione e valutazione del rischio igienico-sanitario.

Risultati attesi nel triennio

- Valutazione e validazione dei modelli di trasporto degli inquinanti nell'aria e ricadute al suolo
- Valutazione igienico-sanitaria dei rischi a cui la popolazione è potenzialmente esposta.

Trasferibilità dei risultati

Valutare i rischi igienico-sanitari connessi all'inquinamento dell'aria ambiente in alcune aree del Comune di Brescia in cui è necessario intervenire prioritariamente con l'operazione di bonifica, sulla base dei rischi sanitari individuati.

Biomarcatori di danno cromosomico: modulazione della risposta individuale

La risposta individuale agli agenti mutageni, basata sull'analisi di biomarcatori intermedi di danno al DNA come i micronuclei e le aberrazioni cromosomiche, è un importante elemento per la valutazione del rischio di cancro. Questi biomarcatori quando utilizzati in studi di suscettibilità ai mutageni si sono dimostrati associati alla patologia tumorale in gruppi di pazienti rispetto ai gruppi di controllo affiancati. Inoltre in studi prospettici su soggetti sani, i biomarcatori di danno cromosomico sono predittivi del successivo rischio di cancro confermando la loro dipendenza da fattori individuali. Tuttavia, pur essendo molto utili a livello di gruppo, tali biomarcatori allo stato attuale non possiedono la sufficiente capacità predittiva da permettere a livello individuale un'affidabile identificazione dei soggetti a rischio. Fattori di confondimento sperimentali, ambientali e individuali (fisiologici e genetici) in grado di modulare la sensibilità, contribuiscono ad aumentare le incertezze delle stime. Questa linea di ricerca si propone quindi d'identificare i principali fattori confondenti della risposta ai mutageni ai fini di una migliore caratterizzazione fenotipica dei soggetti per la suscettibilità ai mutageni, in vista dell'impiego dei biomarcatori di danno al DNA in studi prospettici e caso controllo sul rischio di cancro. Saranno perciò presi in considerazione possibili fattori di confondimento e d'associazione in grado di modulare la risposta alle radiazioni ionizzanti, utilizzate come agente modello per studiare la suscettibilità individuale.

Risultati attesi nel triennio

I principali risultati attesi sono:

La determinazione dell'associazione tra il danno cromosomico misurato mediante analisi dei micronuclei e dei *nucleoplasmic bridge* e i livelli di fattori di segnalazione del danno determinato mediante analisi della fosforilazione dell'istone H2AX. Precedenti analisi avevano dimostrato una possibile correlazione negativa suggerendo una maggiore suscettibilità al danno cromosomico in soggetti con più bassi livelli di segnalazione. L'analisi del danno sarà effettuata su campioni selezionati già caratterizzati per la fosforilazione di H2AX dopo trattamento con radiazioni ionizzanti.

La caratterizzazione della risposta individuale in funzione di polimorfismi dei geni coinvolti nel *pathway* della riparazione delle doppie rotture e dei polimorfismi in grado di influenzare i livelli di danno ossidativo come ad esempio la manganese superoxide dismutase mitocondriale (MNSOD).

La determinazione della variabilità intraindividuo e interesperimento nella risposta al danno indotto e della variabilità dei fattori in grado di modulare la risposta intraindividuale.

Trasferibilità dei risultati

I risultati prodotti consentiranno di aumentare le conoscenze sul ruolo di alcuni fattori individuali (polimorfismi genetici, espressione di marcatori di segnalazione) e sulla loro variabilità nella risposta al danno indotto da agenti mutageni. Questo tipo di conoscenze favorirà il affinamento delle metodologie sperimentali impiegate per la valutazione dei biomarcatori di danno cromosomico, aumentando l'affidabilità del loro uso nella valutazione dei rischi di popolazioni esposte ad agenti mutageni/cancerogeni. Le conoscenze acquisite rappresentano anche utili informazioni sui processi e meccanismi alla base della risposta agli agenti mutageni e dello sviluppo tumorale e possono avere anche implicazione sull'applicazione di terapie chemioterapiche.

Cockayne syndrome: when the cross talk between DNA repair and transcription fails

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. Sebbene le basi patogenetiche di questa sindrome siano ancora da chiarire, evidenze sperimentali indicano che i geni mutati presentano un doppio ruolo sia nella riparazione del DNA che nella trascrizione. 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.

Le caratteristiche cliniche dei pazienti CS non possono comunque essere esclusivamente ricondotte ad un difetto nella riparazione del danno da luce UV; studi recenti indicano infatti che le proteine CSA e CSB sono coinvolte anche nella riparazione del danno ossidativo (D'Errico, *et al. Mutat Res* 2007) il cui ruolo nelle malattie neurodegenerative è ampiamente documentato. Il nostro laboratorio, in particolare, ha recentemente fornito la prima dimostrazione *in vivo* del coinvolgimento di CSA nella rimozione di diversi prodotti di reazione dei radicali liberi con il DNA (D'Errico, *et al. Oncogene* 2007;26:4336).

Le basi funzionali del coinvolgimento delle proteine CS nella riparazione e/o nella trascrizione in condizioni di stress ossidativo e il loro potenziale ruolo nei processi neurodegenerativi rimane tuttavia da chiarire.

Risultati attesi nel triennio

La finalità di questo progetto è quella di chiarire il ruolo nella neurodegenerazione di difetti nella riparazione e/o nella trascrizione in condizioni di stress ossidativo utilizzando come modello la CS

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);
- Condurre studi sulla relazione struttura-funzione utilizzando linee cellulari con mutazioni in diversi domini della proteina CSA per identificarne il ruolo relativo nella riparazione del danno ossidativo (in collaborazione con il CNR, Pavia);
- Analizzare il ruolo delle proteine CS nell'attivazione trascrizionale di specifici geni indotta da agenti ossidanti (in collaborazione con l'Università di Viterbo);
- Studiare l'interazione tra riparazione e trascrizione del DNA analizzando se la preferenzialità di danno/riparazione in specifiche regioni genomiche (es. promotori) regoli l'espressione di geni rilevanti;
- Analizzare il ruolo delle proteine CS nella riparazione del danno ossidativo nelle cellule target neuronali (in collaborazione con l'Istituto Tumori, Milano).

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.

Convenzione per la definizione degli interventi di messa in sicurezza d'emergenza e successiva bonifica nel Sito di Interesse Nazionale di "Laghi di Mantova e Polo chimico"

L'ISS, in ragione delle proprie specifiche competenze, nei limiti delle risorse economiche assegnate e sulla base delle priorità individuate dal Ministero, si impegna a realizzare gli interventi di propria competenza individuati nell'Accordo di programma "Per la definizione degli interventi di messa in sicurezza d'emergenza e successiva bonifica nel Sito di Interesse Nazionale di Laghi di Mantova e Polo chimico". In collaborazione con la ASL di Mantova in particolare a:

- Stesura del documento di *Consensus Report* per il SIN a cura dell'ASL di Mantova;
- Progettazione ed effettuazione di uno studio epidemiologico, coordinato da ISS e condotto in collaborazione con l'ASL di Mantova, sulla popolazione residente nella zona industriale del Comune di Mantova. Lo studio avrà il seguente modello:
 - Analisi di coorte;
 - Definizione della coorte: soggetti nei quartieri della zona industriale di Mantova durante il periodo 1960-1990;
 - Attribuzione dell'esposizione ad inquinanti chimici sulla base della storia abitativa;
 - Indicatori di effetto analizzati: mortalità, incidenza tumori, malformazioni congenite;

- Popolazione di confronto: Comune di Mantova e Provincia di Mantova.

Risultati attesi nel triennio

Conoscenza dell'impatto ambientale delle attività industriali presenti nel Comune di Mantova e connessa valutazione delle alterazioni dello stato di salute (mortalità e morbilità) dei residenti prossimi a dette aree industriali.

Trasferibilità dei risultati

Valutazione dello stato di salute della popolazione residente nella zona industriale del Comune di Mantova.

Definizione del profilo tossicologico di contaminanti ambientali attraverso l'uso di modelli *in vitro*

L'ISS svolge un ruolo preminente, conferitogli dal DL.vo 116/1992, che recepisce la direttiva CEE n.86/609/CEE in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o scientifici, nello sviluppo, validazione e uso di metodi alternativi alla sperimentazione animale mediante l'elaborazione di progetti specificamente dedicati a questo scopo.

Il Reparto Meccanismi di tossicità è impegnato, fin dalla sua costituzione, nella caratterizzazione e standardizzazione di linee cellulari rappresentative di sistemi *in vivo* e nello studio dei meccanismi di tossicità di sostanze di natura diversa, con l'obiettivo finale di contribuire al processo di valutazione del rischio.

Le colture cellulari, pur essendo dei sistemi semplificati rispetto all'organismo, hanno il vantaggio di poter essere utilizzate sia nella fase di screening delle sostanze tossiche, sia per lo studio dei meccanismi d'azione, in quanto possono evidenziare effetti precoci di tossicità che, nella complessità dell'organismo, potrebbero essere non rilevabili.

La presente ricerca è focalizzata sulla messa a punto e caratterizzazione di sistemi cellulari più complessi, come gli epiteli delle diverse barriere biologiche, allo scopo di definirne la rilevanza in termini di predittività dell'assorbimento e della biodisponibilità di xenobioti, incluso l'assorbimento delle nano particelle oggi ampiamente utilizzate in svariati prodotti commerciali.

Particolare rilevanza rivestono anche sistemi *in vitro* di bioindicatori per la rilevazione di contaminanti ambientali. È il caso del saggio DR-Calux che utilizza cellule ingegnerizzate come sistema di rilevazione di diossine e composti diossino-simili.

Risultati attesi nel triennio

Il presente progetto si propone di migliorare e ampliare le prestazioni dei modelli precedentemente descritti, sia caratterizzandone la rilevanza nei confronti dei relativi sistemi *in vivo*, sia utilizzandoli su un più ampio spettro di contaminanti ambientali.

Dato che le linee cellulari utilizzate presentano una notevole variabilità di espressione dei trasportatori normalmente presenti nelle barriere epiteliali, sarà studiata l'espressione di alcuni di essi (ad esempio la Pg-p), così da aumentarne la capacità predittiva caratterizzando alcuni meccanismi di trasporto attivo.

Lo spettro di composti che si intende saggiare andrà dalle singole molecole di interesse ambientale, ad estratti di composizione eterogenea, a miscele di composizione nota di più tossine per valutare eventuali effetti sinergici.

Dato che l'assorbimento delle nano particelle attraverso le principali "vie d'ingresso" dell'organismo rappresenta uno dei principali campi della nanotossicologia, si intende investigare la possibile applicazione dei modelli *in vitro* di barriera epiteliale utilizzati nel progetto all'assorbimento di nanoparticelle, allestendo gli opportuni protocolli sperimentali.

Infine si intende utilizzazione del saggio DR-Calux, che unisce i vantaggi dell'economicità e semplicità delle colture cellulari ad un'alta sensibilità di risposta (essendo in grado di

determinare quantità di TCDD nell'ordine di pochi picogrammi), per la rilevazione di diossine in matrici ambientali di natura diversa, possibilmente estendendo la sua applicazione anche ad ambiti istituzionali.

Trasferibilità dei risultati

L'obiettivo finale della presente ricerca è quello di disporre di modelli cellulari, sia semplici che più complessi, in grado di correlarsi in modo sempre più attendibile ai corrispondenti sistemi *in vivo*. Cruciale, per il raggiungimento di tale obiettivo, è l'identificazione e la caratterizzazione di parametri qualitativi ma soprattutto quantitativi di correlazione, per consentire una maggiore accuratezza nella previsione della tossicità per l'uomo, e diminuire l'incertezza dovuta alle estrapolazioni specie-specifiche.

L'ampio spettro di composti di natura diversa che si intende saggiare nel presente progetto, ha come scopo generale di ampliare le potenzialità di uso dei sistemi *in vitro*, oggi fortemente richiesto dalla legislazione vigente (REACH, VII emendamento della direttiva sui cosmetici).

Destino ambientale di biotossine prodotte da fioriture algali in ambienti acquatici di diversi tipi e origini collegati all'allevamento ittico, e modalità di bioaccumulo in fauna ittica soggetta a prelievo alimentare. Studio del rischio di esposizione nell'uomo; misure di neutralizzazione e comunicazione

Nel triennio 2009-2011 verrà ampliato ulteriormente lo studio sull'incidenza e tipologia delle fioriture tossiche nelle acque italiane e sulla frequenza delle contaminazioni tossiche nella fauna ittica pregiata ad interesse commerciale conseguenti al bioaccumulo lungo la piramide alimentare, mediante lo studio di comunità ittiche in ambienti acquatici esemplificativi e lo sviluppo di rapide metodologie immunologiche e strumentali ad alta efficienza analitica.

Verrà inoltre studiato il ruolo di additivi di vario tipo contaminati da tossine algali nell'inquinamento di acquacolture di per sé non affette da eutrofizzazione tossica.

Lo studio verrà ampliato a strategie di identificazione di fonti di inquinamento e di stress ambientale in falde idriche interessanti corpi d'acqua che prevedano usi umani alimentari, con la elaborazione di specifici piani di recupero di corpi idrici gravemente compromessi dall'eutrofizzazione, per la gestione ed eliminazione del rischio sanitario originato.

Le attività di ricerca verranno indirizzate ad approfondire la conoscenza di base e a sviluppare modelli e strumenti per l'uso e il consumo sostenibile delle risorse.

Verrà proseguita la riconversione della banca dati aggiornata delle fioriture algali tossiche del territorio nazionale organizzata nel Progetto ISS 2003-2004 C3F7, e verrà realizzata in collaborazione con il Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali – sottosegretariato alla Salute – la possibilità di accesso in rete alla stessa, per permettere un futuro utilizzo pubblico semplice e diretto nell'ambito delle indicazioni organizzative stabilite dalle Direttive Europee sulle Acque e dal DL 195/2005 (rec. Dir. 2003/4/CE).

Risultati attesi nel triennio

Verranno messi a punto metodi di estrazione ad efficienza ottimale per la rilevazione di tossine algali con analisi immunologiche e in spettrometria di massa da varie matrici e in particolare da tessuti di vertebrati e invertebrati appartenenti alla fauna ittica. Verranno poste a confronto varie metodologie disponibili per selezionare le migliori efficienze analitiche.

Verranno indagate nuove tecnologie per il disinquinamento dei siti predisposti all'insorgenza di fioriture tossiche con rischio di contaminazione per la fauna ittica.

Verranno impiegate tecnologie informatiche per consentire con efficienza l'aggiornamento e l'accesso online per gli organi territoriali alla banca dati delle fioriture algali italiane.

Trasferibilità dei risultati

Diffusione dei risultati mediante pubblicazioni, seminari, corsi, congressi.

Determinazione *indoor* dei livelli di polibromodifenileteri in ambienti di vita caratterizzati dalla presenza di strumenti elettronici e influenza sull'esposizione umana

I PBDE hanno rilevanti affinità in termini di struttura, caratteristiche di persistenza e capacità di bioaccumulo con i PCB. Tuttavia l'esposizione inalatoria umana ad essi, al contrario di quello che accade per i PCB, può essere significativa rispetto a quella alimentare (Harrad, *et al. Environmental Science and Technology* 2004;38:2345-50), o addirittura prevalente se si considera il materiale particolato (Jones-Otazo, *et al. Environmental Science and Technology* 2005;39:5121-30).

È pertanto rilevante effettuare un'indagine sui livelli di questi composti presenti nell'aria *indoor*, vista la diffusione di apparecchi elettronici sia negli ambienti di lavoro che nelle abitazioni civili. Al momento sono disponibili pochissimi studi relativi alla Gran Bretagna e al Canada, mentre mancano del tutto informazioni sui livelli in Italia.

I campionamenti saranno effettuati con postazioni fisse.

Si dispone di metodi di campionamento e analisi sostanzialmente idonei allo studio: è necessario un adattamento per il campionamento, dato che i bassi livelli di questi composti nell'aria (le concentrazioni nei Paesi europei, nei pochi lavori pubblicati es. Harrad. *Environ Sci Technol* 2006;40:4633-8, variano da alcune unità a frazioni di pg/m³) rendono estremamente complessa la determinazione.

Per il campionamento e l'analisi dei PBDE si provvederà mediante una sezione di schiuma di poliuretano preestratta inserita a valle del filtro per il campionamento del particolato. La determinazione verrà effettuata mediante la tecnica della diluizione isotopica dopo un procedimento a vari stadi di purificazione dell'estratto.

Risultati attesi nel triennio

Verranno prodotti dati sulla presenza di diversi congeneri dei PBDE presenti nell'aria di ambienti di vita e di lavoro, non industriali. Per ogni ambiente campionato verrà compilata una scheda che, oltre ai normali parametri microclimatici, considererà la presenza nel locale delle diverse varietà di strumenti elettronici (computer, fax, schermi video, stereo ecc.).

I dati sui livelli dell'aria *indoor* forniranno informazioni che potranno essere integrate con quelle ottenute da uno studio in corso sui livelli di PBDE nel latte materno. Infatti i dati delle concentrazioni determinate in alcuni fluidi biologici, quale il latte, forniscono indicazioni sulla reale esposizione complessiva, sostanzialmente inalatoria e alimentare, della popolazione generale a queste sostanze. Sarà quindi possibile, dai dati di questo studio e da quelli esistenti sulla presenza di PBDE negli alimenti, effettuare una stima dell'esposizione inalatoria e di quella alimentare per l'Italia.

Trasferibilità dei risultati

I dati prodotti dallo studio saranno pubblicabili su riviste internazionali.

Diagnostica virale rapida in liquami. Sorveglianza sanitaria di virus enterici (enterovirus, adenovirus e norovirus) attraverso campionature codificate di liquami urbani

In Italia la circolazione di molti virus enterici è alquanto sottostimata a causa di un sistema di notifica legato soprattutto a eventi epidemici che spesso coinvolgono un gran numero di persone. La presenza capillare sul territorio nazionale di migliaia di impianti di depurazione di acque reflue urbane, può essere utilizzata come un network permanente di sorveglianza sanitaria per integrare in modo razionale i dati epidemiologici tradizionali. Le indicazioni derivanti dalla presenza di adenovirus e norovirus nei campioni ambientali potrebbero sostituire o integrare il

parametro enterovirus nella valutazione di qualità delle acque a qualunque uso siano esse destinate.

L'obiettivo principale del presente progetto è l'analisi epidemiologica molecolare di virus enterici circolanti in Italia attraverso un protocollo di diagnosi rapida dei virus in reflui urbani di varie località italiane. Per il raggiungimento dell'obiettivo generale si utilizzeranno metodiche di PCR, *RealTime*, sequenziamento genico e colture cellulari.

Risultati attesi nel triennio

Identificazione e caratterizzazione molecolare dei ceppi prevalenti di enterovirus, adenovirus e norovirus nelle acque reflue degli impianti più rappresentativi di Potenza, Napoli, Roma, Firenze, Perugia, Bologna, Brescia, Torino, Trieste, Venezia. Verranno utilizzate metodiche rapide di RT-PCR, PCR e analisi delle sequenze nucleotidiche. Alcuni campioni significativi verranno inoculati su colture cellulari. I campionamenti avranno una cadenza stagionale. Campioni particolarmente interessanti, perché ceppi ricombinanti o identificati per la prima volta in Italia, verranno isolati su colture cellulari per l'isolamento di agenti citopatogeni. Mediante un sistema integrato di *RealTime* colture cellulari verrà stabilita la frazione infettante di virus coltivabili (enterovirus e adenovirus) nei campioni analizzati.

Trasferibilità dei risultati

Implementazione di una piattaforma permanente per la sorveglianza sanitaria di virus patogeni per l'uomo e la standardizzazione di metodiche d'eccellenza per la diagnostica rapida dei virus nell'ambiente. Questo lavoro darà indicazioni utili per una proposta di nuovi vaccini per gli adenovirus e per la revisione delle normative riguardanti la definizione dei rischi per la salute umana derivanti dal riutilizzo delle acque e dei fanghi depurati.

Difetti nella riparazione del danno ossidativo del DNA: sviluppo di saggi *in vitro* e utilizzo di modelli murini per la predizione del rischio cancerogeno

Il progetto si propone di mettere a punto dei saggi funzionali per valutare il ruolo di varianti geniche di significato incerto nel gene MUTYH, una glicosilasi del *Base Excision Repair* (BER) implicato nella predisposizione al carcinoma coloretale, e identificate nella popolazione italiana.

Risultati attesi nel triennio

Ci proponiamo di utilizzare un topo knockout per questo gene, presente nello stabulario dell'ISS, per studiare le conseguenze dell'accumulo di danno ossidativo del DNA nell'insorgenza dei tumori dopo trattamento con tossine in grado di indurre stress ossidativo. Esempi includono un contaminante degli alimenti (furano) o trattamenti acuti e cronici con destran solfato in un modello murino di colite ulcerosa.

Distretti rurali e loro vocazionalità verso le produzioni biologiche in un'ottica di sicurezza alimentare, qualità delle produzioni e promozione della salute umana

L'identificazione e caratterizzazione dei parametri di qualità (riferiti a salute e benessere animale, sicurezza alimentare e salute della popolazione umana) dell'ambiente in cui si svolgono attività zootecniche a vocazione biologica e ad alto valore paesaggistico-territoriale rappresenteranno il target progettuale.

Risultati attesi nel triennio

- La definizione di un modello di valutazione sanitaria della qualità ambientale dei distretti biologici zootecnici nei quali sono presenti animali bradi al pascolo e allevati in modo estensivo (quali suini, pecore, capre, bufali, api, pesce allevato e di cattura);

- la predisposizione e sperimentazione di modelli di HACCP per i fattori di produzione ambientali quale strumento di valutazione del rischio, all'interno delle aree dedicate alle produzioni primarie;
- la predisposizione di modelli di valutazione e graduazione della qualità e dei parametri di sicurezza alimentare dei prodotti derivati da zootecnia biologica.

Trasferibilità dei risultati

Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali e SSN, organizzazioni territoriali, comunità scientifica.

Esposizione a contaminanti chimici negli ambienti di vita: abitazioni e uffici

Nelle grandi aree urbanizzate l'inquinamento *outdoor* è causato principalmente dalle emissioni veicolari derivanti dalla combustione, evaporazione e degradazione del carburante, in particolare nelle città caratterizzate da alte intensità di traffico veicolare e, in misura minore, dalle emissioni industriali. Tale inquinamento, in seguito alle immissioni dell'aria all'interno delle abitazioni, è una delle principali sorgenti dell'inquinamento *indoor*. Pertanto, negli ambienti *indoor*, è possibile trovare tutti quegli inquinanti generalmente presenti nell'*outdoor*: materiale particolato, ossidi di carbonio, di azoto e di zolfo, metalli pesanti, ossidanti fotochimici e composti organici volatili (COV) come il benzene, le aldeidi e altri idrocarburi aromatici. Oltre all'inquinamento *outdoor* potrebbero influire, in modo rilevante, sulla qualità dell'aria degli ambienti interni gli occupanti stessi e le loro attività, le emissioni dai materiali di costruzione, di ricoprimento per pavimenti e pareti, dall'arredamento e dall'uso di prodotti commerciali: detersivi e cere, vernici, solventi, pesticidi, adesivi, prodotti cosmetici destinati alla cura personale, l'uso di particolari tipi di riscaldamento e dei condizionatori d'aria. Inoltre le emissioni tal quali da materiali di arredamento e dai meccanismi di adsorbimento/desorbimento dei mobili o delle tappezzerie, ad esempio, possono condizionare le concentrazioni dei contaminanti indoor. Infatti, i materiali di arredamento che adsorbono i composti organici volatili per periodi di tempo più o meno lunghi, possono divenire, in un secondo momento, sorgenti secondarie di emissioni. Ovviamente, in presenza di sorgenti *indoor*, una ventilazione naturale o forzata, porterebbe alla diluizione degli inquinanti. D'altra parte, in assenza di sorgenti interne l'immissione di aria inquinata non farà altro che incrementare le concentrazioni interne degli inquinanti. I livelli *outdoor* di benzene e degli altri COV variano, generalmente, anche in funzione delle condizioni atmosferiche. Gli eventi meteorologici e fotochimici, i fenomeni di ripartizione aria/acqua e di adsorbimento/desorbimento dal terreno sono fattori che condizionano le concentrazioni degli inquinanti nell'atmosfera. L'obiettivo di questo studio è quello di valutare l'influenza dell'inquinamento *outdoor* sulle concentrazioni dei COV e del materiale particolato all'interno di abitazioni-uffici e la caratterizzazione delle sorgenti *indoor* che rivestano un'importanza prioritaria negli ambienti di vita, considerando che secondo la WHO l'80-90% del nostro tempo viene trascorso nei suddetti ambienti. Il progetto prevede una valutazione dei livelli di concentrazione dei Composti Organici Volatili- COV (comprensivi di aldeidi), IPA (idrocarburi policiclici aromatici) e PM (materiale particolato incluse le nanoparticelle) negli ambienti di vita abitativi e uffici.

Per il campionamento e l'analisi si procederà nel modo seguente: il campionamento relativamente ai COV, per una valutazione dell'esposizione personale utilizzerà, un campionamento di tipo attivo, passivo e *canister*. Dopo le procedure di prelievo i campioni verranno sottoposti a procedure analitiche che prevedono come fase finale la determinazione dei COV con tecniche gas-cromatografiche mediante rivelatori FID e di spettrometria di massa (hrGC-FID e hrGC-MS) oltre che, per alcune tipologie di inquinanti, tramite analisi per HPLC.

Per il materiale particellare verranno utilizzati campionatori d'aria con apposito sistema di frazionamento della granulometria. In particolare per le nanoparticelle si metteranno a punto metodi analitici appropriati. La determinazione degli IPA, dopo opportuno *clean-up* sarà effettuata con tecniche analitiche cromatografiche (hrGC-FID/MS e/o HPLC). Le scelte delle tecniche analitiche più appropriate si baseranno sulla tipologia degli inquinanti e in relazione al tipo di campionamento effettuato.

Risultati attesi nel triennio

Primo anno: selezione dei siti di campionamento in funzione dell'altezza degli ambienti vita rispetto al piano stradale e della diversità delle zone (urbane, sub-urbane, periferiche, ecc.) oltre che dalla presenza di possibili fonti di rilascio. Validazione dei metodi di campionamento già in uso e finalizzati agli ambienti abitativi e uffici. Confronto con le concentrazioni degli inquinanti *outdoor* considerate come riferimento.

Secondo anno: raccolta dati ottenuti dalle campagne di monitoraggio. Modulazione di altri monitoraggi su ambienti abitativi a completezza della conoscenza.

Terzo anno: acquisizione completa dei dati analitici, loro elaborazione e redazione della relazione finale.

EU Project: Predict-IV – 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 all'attuale incapacità di tradurre le concentrazioni *in vitro* in dosi da cui derivare i NOAELs 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 – models*).

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 l'identificazione di effetti tossici indotti da farmaci e/o dai loro metaboliti a medio e lungo termine.

La UO dell'ISS contribuirà essenzialmente agli obiettivi del *Workpackage 3 (Non animal-based models for in vitro kinetics and human kinetic prediction)* di cui ha anche il coordinamento, i cui risultati principali saranno: i) l'identificazione dei parametri biocinetici rilevanti, ii) la caratterizzazione biocinetica dei modelli sperimentali attraverso la misura e/o la predizione dei suddetti parametri, iii) 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 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.

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 principi attivi fitofarmaci e 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 di antiparassitari nelle derrate alimentari deriva l'esigenza di valutare in concreto 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. Si ritiene necessario anche lo svolgimento di indagini per il rilevamento di presenza simultanea di residui di differenti antiparassitari derivanti da trattamenti multipli, allo scopo di una completa ed esaustiva valutazione dell'esposizione della popolazione attraverso la dieta. 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

Valutare in concreto 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 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

Collaborazione con i laboratori ufficiali (ARPA, Agenzie Provinciali per la Protezione dell'Ambiente – APPA, IZS) che eseguono controlli in materia di residui di fitofarmaci 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.

Gli impianti di acquacoltura e indagini microbiologiche

Il progetto prevede lo studio delle acque di impianti di acquacoltura dal punto di vista microbiologico. La caratterizzazione riguarderà il rilevamento di microrganismi indicatori di

contaminazione fecale, di microrganismi indicatori dello stato di qualità ambientale nelle acque, nei sedimenti e negli organismi acquatici.

Saranno individuati impianti di acquacoltura del territorio nazionale e saranno verificate le resistenze agli antibiotici dei microrganismi isolati.

Saranno anche condotte ricerche per l'individuazione di alghe e di microrganismi patogeni.

Risultati attesi nel triennio

Caratterizzazione delle comunità microbiche e individuazione e mitigazione degli impatti indotti sugli ecosistemi acquatici.

Trasferibilità dei risultati

Realizzazione di eventi formativi che prevedono crediti formativi per i partecipanti. Pubblicazioni scientifiche.

Identification of population risk profiles as an approach to cancer prevention (Progetto Integrato Oncologia)

Questo progetto è caratterizzato dal lavoro congiunto di diverse unità operative (UO) con un obiettivo principale comune che è l'identificazione di modificatori genetici e ambientali di rischio per permettere l'individuazione di soggetti vulnerabili. A questo sforzo congiunto si affianca lo sviluppo di nuove metodiche di comunicazione del rischio.

Risultati attesi nel triennio

In particolare il contributo specifico dell'UO 1 (ISS) consiste nello stimare l'ereditabilità della sensibilità individuale (possibile *marker* genetico di suscettibilità al tumore) a differenti agenti mutageni ambientali noti, allo scopo di mirare interventi di riduzione dell'azzardo ambientale e/o comportamentale in gruppi di popolazione con elevati profili di rischio. L'UO 2 (ISS) si propone di verificare se è possibile identificare specifici *pattern* di espressione genica associati all'instabilità genomica nel cancro gastrico (CG). L'UO 3 ha proceduto alla pianificazione del progetto e alla formulazione del protocollo operativo per l'individuazione dei pazienti e la raccolta delle informazioni individuali e dei campioni biologici. L'attività dell'UO 4 (Università Sapienza Roma) è rivolta sull'analisi dei fenotipi molecolari che caratterizzano il carcinoma gastrico. In particolare, i casi di carcinoma gastrico sono stati classificati in base alla presenza/assenza del fenotipo con instabilità dei microsatelliti. L'UO 5 (ISS) si occuperà dello studio delle alterazioni nei meccanismi di controllo della stabilità genomica in malattie infiammatorie intestinali in associazione con il rischio di cancro al colon. L'UO 6 (ISS) analizzerà i fattori di suscettibilità allo sviluppo di Leucemie Mieloidi Acute e Sindromi Mielodisplastiche secondarie (LMA/SMD). L'UO 7 (ISS) si occuperà del ruolo dell'infezione virale da HBV/HCV e linfoma non-Hodgkin. L'implementazione e informatizzazione di Linee Guida cliniche e Carte del rischio per patologie legate al fumo sarà svolta dall'UO 8 (ISS). L'UO 9 (ISS) si occuperà degli aspetti bioetici legati alla raccolta e al trattamento di dati sensibili e alla comunicazione dei dati individuali.

Trasferibilità dei risultati

Per quanto concerne le possibili implicazioni di sanità pubblica, questo progetto potrà fornire la base scientifica per individuare tipologie di soggetti a più alta vulnerabilità e per delineare quindi appropriate strategie di prevenzione della popolazione atte a ridurre il rischio di insorgenza di diverse neoplasie.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (IZSM) – Ricerca Corrente – Valutazione della presenza di contaminanti ambientali in prodotti ittici

e integratori alimentari: controllo, gestione e comunicazione dei rischi associati in conformità al Regolamento 882/2004/CE

Raccolta dei dati disponibili circa la presenza dei contaminanti costituiti da tossine algali in prodotti ittici, mangimi, integratori a base di alghe, e ricerca bibliografica circa i metodi di analisi già noti per la presenza dei contaminanti considerati in varie matrici.

Sviluppo e validazione di metodi di prova di screening e conferma in ELISA e LC-MS/MS per la determinazione dei contaminanti studiati nelle matrici analizzate.

I metodi di prova sviluppati saranno validati intra-laboratorio in accordo con quanto previsto dalle norme verticali relative ai contaminanti ambientali e dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025.

Trasferimento dei metodi di prova tra le UO interessate.

Raccolta e analisi di campioni di prodotti ittici, mangimi, alghe e integratori alimentari da provare.

Risultati attesi nel triennio

- Redazione delle procedure operative standard (POS) relative alle modalità di campionamento e analisi, applicazioni di modelli di studio per il trasferimento delle contaminazioni dall'ambiente ai prodotti analizzati.
- Studio di un modello di valutazione, gestione e comunicazione del rischio secondo quanto previsto dal Regolamento 882/2004/CE. Saranno valutati i livelli di contaminazione rilevati nei prodotti analizzati, per definire i rischi dell'esposizione del consumatore. Saranno individuati modelli di comunicazione del rischio a diversi destinatari (SSN, associazioni di consumatori, associazioni mediche, associazioni di categoria).

Trasferibilità dei risultati

Diffusione dei risultati mediante pubblicazioni, seminari, corsi, congressi.

Measurements of DNA repair capacity: functional properties of variant BER proteins and analysis of their interaction with oxidized DNA substrates

Nel corso del triennio si intende sviluppare metodi per la valutazione dell'attività funzionale di proteine della riparazione del danno ossidativo del DNA. L'attività si articolerà secondo due livelli.

- Messa a punto e applicazione di saggi *in vitro* su estratti proteici, derivanti da linee linfoblastoidi e/o linfociti.
- Studio dei meccanismi di interazione delle analoghe proteine ricombinanti, mutate e non, con il DNA.

Lo studio dell'attività funzionale in proteine derivante da estratti cellulari sarà sviluppato in primo luogo sulla proteina umana MUTYH e su alcune sue varianti identificate in pazienti affetti da poliposi eredo familiare (MAP). Tale attività, già iniziata nel corso del triennio precedente rientra nelle attività della rete TEF (Tumori eredo familiari). Uno studio parallelo sarà sviluppato sull'attività funzionale della proteina umana OGG1 e sul ruolo di polimorfismi (SNP) sulla capacità riparativa del DNA e del potenziale impatto sul rischio di insorgenza di tumori. Accanto al metodo recentemente messo a punto, basato essenzialmente sulla fluorescenza, si prevede di disegnare strategie alternative e multidisciplinari che possano dare informazioni sull'attività funzionale di tali proteine in *real time*. Tecniche avanzate di biofisica (*Surface Plasmon Resonance* e fluorescenza dinamica) saranno utilizzate per lo studio di interazioni DNA-proteina e proteina-proteina, utilizzando proteine ricombinanti e oligomeri contenenti lesioni specifiche.

Risultati attesi nel triennio

- Messa a punto di un metodo per la valutazione dell'attività funzionale della glicosilasi umana MUTYH in estratti proteici.
- Caratterizzazione dei meccanismi di base nella interazione del DNA ossidato con alcune proteine del BER (MUTYH, OGG1) e loro varianti.

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni scientifiche.

Misure e analisi dei livelli di concentrazione dei composti organici volatili (COV) nell'indoor di strutture ospedaliere, uffici e strutture commerciali

La presenza dei COV, negli ambienti confinati (*indoor*) di tipo non-industriale, anche se a basse concentrazioni, ha un importante impatto sulla salute e sul benessere degli occupanti a causa della prolungata durata dell'esposizione in quanto la popolazione trascorre la maggior parte del proprio tempo (fino all'80% - 90%) in ambienti di vita (abitazioni, ospedali, scuole, uffici, mezzi di trasporto, ecc.).

A tuttora, dati disponibili concernenti concentrazioni di COV in ambienti *indoor* afferiscono ad ambienti di misura con differente layout, differente attività degli occupanti, o a parità di attività, con differenti procedure e/o protocolli operativi, differenti fattori modificatori dei livelli di concentrazione.

L'obiettivo di questo progetto è quello di valutare "se l'osservato legame tra attività svolta e concentrazione misurata è segnale di una effettiva contaminazione indotta dall'attività, dalle sorgenti *indoor* o il risultato di uno scambio *indoor/outdoor* (aerazione/ventilazione), o diffusione inquinante all'interno della struttura"; sia tramite l'analisi dei dati già disponibili di concentrazione dei COV nell'aria *indoor* di strutture ospedaliere, uffici e strutture commerciali sia tramite l'analisi di dati derivanti da nuove strategie di monitoraggio e conseguenti misure di concentrazione dei COV.

Le misure di concentrazioni di COV saranno effettuati anche con strumenti portatili a lettura diretta (di TVOC, CO, CO2 Umidità Relativa, Temperatura) corredati di specifico software per l'analisi dei dati.

Il software SAS (versione 8.1), e tecniche specifiche (es. Analisi Componenti Principali, ecc.) saranno usati per il trattamento sia dei dati direttamente ottenuti dalle sopra citate misure che dei dataset ottenuti da fonti ufficiali (es. US- *Environmental Protection Agency*, EPA, ecc).

Risultati attesi nel triennio

- Stima di un appropriato metro di misura dell'esposizione (degli occupanti) a composti organici volatili (COV) e sostanze volatili di certo interesse sanitario o scelte quali *marker* di esposizione dovuta alla specifica attività svolta nell'*indoor* di misura., e che risultano classificate per lo meno come irritanti o sensibilizzanti (es. methyl methacrylate (MMA) nelle strutture odontoiatriche)
- Stima delle correlazioni tra i livelli di concentrazione dei COV nell'*indoor* e nell'*outdoor* delle strutture (ospedaliere, commerciali, uffici) in esame;
- Stima delle correlazioni tra specifiche procedure di svolgimento delle attività nelle strutture indagate e relative variazioni di concentrazioni dei COV;
- Stima delle correlazioni tra sostanze inquinanti e i fattori (layout, aerazione, protocolli di operatività degli occupanti ecc.) modificatori dei livelli di concentrazione degli inquinanti;
- Individuazione delle sorgenti di COV, da materiali e sostanze in uso nell'ambiente *indoor* di misura;

- Individuazione dei fattori (es. layout dell'area di lavoro, materiali e sostanze in uso, protocolli operativi e procedure cliniche) che influenzano la qualità dell'aria *indoor* nell'ambiente;
- Individuazione di attività e/o sorgenti con elevati fattori emissivi;
- Stima (tramite la misura del parametro TVOC (*total Volatile Organic Compound*)) dell'idoneità del sistema aerazione nell'*indoor* di misura.

Trasferibilità dei risultati

- linee guida per la progettazione del monitoraggio degli inquinanti nell'ambiente *indoor*;
- protocolli operativi per il contenimento dei livelli di concentrazione dei COV ambienti *indoor* di strutture ospedaliere, uffici e strutture commerciali;
- protocolli per la distribuzione degli spazi e aree dell'ambiente *indoor* ai fini del contenimento dei livelli di concentrazione dei COV;
- protocolli operativi per il monitoraggio dell'aria *indoor*.

Modelli struttura attività per la tossicità chimica

Le ricerche del prossimo triennio riguarderanno la modellizzazione delle relazioni struttura-attività per la tossicità delle sostanze chimiche, con particolare riguardo alla mutagenesi e cancerogenesi.

Questo settore ha assunto in Europa una importanza notevole anche dal punto applicativo, per via della introduzione di metodi teorici di predizione della tossicità all'interno della nuova legislazione europea sul rischio chimico (REACH, ma anche cosmetici, ecc.). In particolare, quest'ultimo fatto ha dato luogo ad una notevole attività sia a livello EU che a livello più internazionale (*Organisation for Economic Co-operation and Development*, OECD) volta a preparare strumenti per la attuazione pratica di tali legislazioni. A queste attività il nostro gruppo sta già pienamente partecipando, con contributi al sistema esperto Toxtree, patrocinato e messo a pubblica disposizione dal *Joint Research Centre* di Ispra (<http://ecb.jrc.ec.europa.eu/qsar/qsar-tools/>), e al sistema esperto (Q)SAR Application Toolbox dell'OECD (http://www.oecd.org/document/23/0,3343,en_2649_34379_33957015_1_1_1_1,00.html).

Risultati attesi nel triennio

- Banche dati chimico-relazionali
Un obiettivo è l'espansione e aggiornamento della banca dati ISSCAN sui cancerogeni chimici (<http://www.iss.it/ampp/dati/cont.php?id=233&lang=1&tipo=7>). Un altro obiettivo è una nuova banca dati relativa a saggi di mutagenesi *in vivo*, (in particolare micronucleo nei roditori), e di una banca dati per il saggio della mutagenesi *in vitro*, con informazione dettagliata per i vari ceppi del test di Ames (*Salmonella typhimurium*).
- Allerte strutturali per vari tipi di tossicità
Dopo le allerte strutturali per la cancerogenesi e mutagenesi *in vitro* (informatizzata nel sistema esperto Toxtree: <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/qsar/qsar-tools/index.php?c=TOXTREE>), si svilupperanno Allerte strutturali per la mutagenesi *in vivo*. Questi sono particolarmente importanti nelle strategie regolative in quanto verifiche della potenziale mutagenicità mostrata *in vitro*. Queste saranno codificate in un nuovo modulo di Toxtree.
- Fattori modulanti delle Allerte strutturali
Mentre le Allerte strutturali danno una prima stima del potenziale tossico di una sostanza, questa potenzialità viene modulata dalla composizione del resto della molecola. Verranno studiati e possibilmente codificati i fattori modulanti delle Allerte strutturali.
- Modelli quantitativi struttura-attività (QSAR)
Si svilupperanno QSAR per classi di sostanze di particolare interesse tossicologico. Si indagheranno metodi per caratterizzare i domini di applicabilità dei modelli QSAR, e per

la ricerca automatica (informatizzata) di sostanze congeneriche ad una data sostanza di cui si vogliono stimare le proprietà tossiche.

Trasferibilità dei risultati

- espansione del sistema esperto Toxtree del *Joint Research Centre* (Ispra);
- espansione del sistema esperto QSAR *Application Toolbox* dell'OECD;
- messa a disposizione nel dominio pubblico di banche dati chimico relazionali di alta qualità;
- contributo a linee guida OECD.

PERFOOD

Progetto europeo incentrato sulla valutazione dell'esposizione alimentare a composti perfluororganici, attraverso indagini chimico-tossicologiche.

Risultati attesi nel triennio

Valutazione dell'esposizione alimentare e aggregata ai composti perfluorurati (PFC) in Italia, confronto con le esposizioni europee e internazionali e paragone con i livelli di accettabilità di assunzione stabiliti dalle Autorità Sanitarie.

Trasferibilità dei risultati

Trasferimento dei risultati alla Commissione Europea, alle Agenzie Internazionali (EFSA) e agli enti dell'SSN.

Possibile ruolo di tossine cianobatteriche nell'eziopatogenesi della Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA): sopravvivenza e tossicità di cianobatteri ambientali in condizioni che simulano quelle del corpo umano (in collaborazione con il Reparto di Meccanismi di tossicità)

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una rara patologia degenerativa del sistema nervoso centrale, la cui eziopatogenesi è ancora sconosciuta. Una recente ipotesi suggerisce che cianobatteri tossici, attraverso la produzione di un aminoacido potenzialmente neurotossico (la β -metilammino alanina (BMAA)) e/o altre tossine, possano avere un ruolo in questa patologia.

L'obiettivo del progetto è quello di verificare l'ipotesi che associa l'esposizione a cianobatteri/cianotossine all'insorgenza della SLA attraverso la conduzione di prove sperimentali di laboratorio e analisi di campioni biologici umani.

Questa ipotesi sarà esplorata studiando le seguenti possibilità: i) i cianobatteri sono in grado di colonizzare soggetti suscettibili che potrebbero contrarre la SLA, a causa di una produzione interna di BMAA e/o altre cianotossine; ii) la sola esposizione ambientale alle cianotossine ha un ruolo nella eziopatogenesi della SLA.

Saranno condotte prove su numerosi ceppi di cianobatteri, per determinare il loro presunto ruolo nell'insorgenza della SLA.

Sarà valutata la loro resistenza al buio, alla temperatura corporea, a condizioni di pH 2, di carenza di ossigeno, in presenza di diverse fonti di carbonio organico. Saranno valutate le percentuali di sopravvivenza, la capacità di ripresa e la produzione di tossine. Saranno messe a punto metodiche analitiche per la determinazione della BMA in gascromatografia ad alta risoluzione/spettrometria di massa LR, anche in campioni biologici.

Risultati attesi nel triennio

L'approccio a step successivi, utilizzato per il raggiungimento degli obiettivi del progetto prevede:

- La conduzione di prove preliminari in laboratorio per dimostrare se i cianobatteri possono sopravvivere in condizioni simili a quelle tipiche dell'organismo umano (assenza di luce,

temperatura corporea, condizioni di pH gastrico, di basse pO₂ e in presenza di batteri tipici della flora intestinale) e se in queste condizioni sono favoriti i genotipi tossici (in collaborazione con il Reparto Meccanismi di tossicità). Screening condotti su vari ceppi di cianobatteri permetteranno di valutare la differente tossicità degli stessi e di individuare eventuali condizioni (temperatura, pH, competizione) che ne modulino la crescita e la tossicità. I risultati prodotti da questa prima fase costituiscono la base di partenza per la definizione del rischio sanitario associato all'esposizione ai diversi ceppi di cianobatteri.

- Nell'eventualità di risultati positivi, saranno avviate collaborazioni per verificare l'ipotesi della possibile colonizzazione da parte dei cianobatteri su modelli animali (es. roditori).
- Sarà quindi stimata l'incidenza e dei livelli di esposizione della popolazione alla BMAA e altre cianotossine attraverso l'analisi di campioni ematici.

Trasferibilità dei risultati

Sulla base dei risultati raggiunti sarà valutata la fattibilità di condurre uno studio pilota presso l'Azienda Ospedaliera S. Maria di Terni (strutture di Neurofisiopatologia e Neurologia) e l'ISS (Dipartimento AMPP) su pazienti affetti da SLA, di recente diagnosi, in cui però siano state precedentemente escluse cause di secondarietà e in cui sia stato dimostrato una progressione di malattia per mezzo di studio EMG-ENG e/o RMN spettroscopica.

Inoltre, la determinazione dei livelli di tossicità e sopravvivenza in condizioni simili al corpo umano di diversi ceppi ambientali di cianobatteri, provenienti da campioni di suolo e di acque interne, fornirà indicazioni essenziali per una corretta determinazione del rischio e per eventuali strategie di monitoraggio ambientale da parte delle istituzioni preposte.

La messa a punto di un metodo analitico in GC/MS semplificherebbe la sua trasferibilità alle strutture territoriali deputate al controllo sanitario della popolazione in quanto la strumentazione necessaria è già disponibile nella maggior parte delle strutture a differenza dei sistemi LC/MS o LC/MS/MS.

Progetto HICSED – Indagini chimico-ecotossicologiche. Indirizzi per la formulazione di un'analisi di rischio per la Laguna di Venezia. Valutazione finale integrata dei risultati delle Fasi A, B e C

Il Progetto HICSED prevede le seguenti fasi:

- fornire indicazioni sulle metodologie analitiche e sui requisiti di qualità del dato chimico da adottare nell'ambito degli studi e misure sui sedimenti lagunari;
- fornire una raccolta di informazioni sperimentali di tipo chimico ed eco tossicologico utili all'integrazione e all'approfondimento delle conoscenze e valutazioni già disponibili sulla effettiva pericolosità della contaminazione dei sedimenti lagunari con l'utilizzo di criteri ecotossicologici;
- impostare una "analisi di rischio" sanitario-ambientale specifica per gli ecosistemi lagunari;
- sperimentare tecniche di decontaminazione innovative per i sedimenti inquinati della Laguna di Venezia.

Risultati attesi nel triennio

Impostazione di una "analisi di rischio" sanitario ambientale specifica per gli ecosistemi lagunari.

Trasferibilità dei risultati

Possibile revisione dei limiti previsti dal "Protocollo Fanghi del 1993", per una gestione sostenibile sotto il profilo ambientale e sanitario della movimentazione dei sedimenti scavati in

ambito lagunare. Analisi chimiche ed ecotossicologiche di sedimenti lagunari escavati. Sviluppo di una procedura di analisi di rischio ecologica.

Progetto HICSED – Indagini chimico-ecotossicologiche. Indirizzi per la formulazione di un’analisi di rischio per la Laguna di Venezia. Valutazione finale integrata dei risultati delle Fasi A, B e C

Il Progetto HICSED prevede:

- fornire indicazioni sulle metodologie analitiche e sui requisiti di qualità del dato chimico da adottare nell’ambito degli studi e misure sui sedimenti lagunari;
- fornire una raccolta di informazioni sperimentali di tipo chimico ed eco tossicologico utili all’integrazione e all’approfondimento delle conoscenze e valutazioni già disponibili sulla effettiva pericolosità della contaminazione dei sedimenti lagunari con l’utilizzo di criteri ecotossicologici;
- impostare una “analisi di rischio” sanitario-ambientale specifica per gli ecosistemi lagunari;
- sperimentare tecniche di decontaminazione innovative per i sedimenti inquinati della Laguna di Venezia.

Risultati attesi nel triennio

Impostazione di una “analisi di rischio” sanitario ambientale specifica per gli ecosistemi lagunari.

Trasferibilità dei risultati

Possibile revisione dei limiti previsti dal “Protocollo Fanghi del 1993”, per una gestione sostenibile sotto il profilo ambientale e sanitario della movimentazione dei sedimenti escavati in ambito lagunare. Sviluppo di una procedura di analisi di rischio ecologica.

Prove interlaboratorio su analisi microbiologiche per matrici acquose (acque destinate al consumo umano e acque di scarico): Accordo di collaborazione scientifica ISS-UNICHIM

L’accordo è in corso dal 2000 ed è stato rinnovato nel 2003 e nel 2006. Attualmente è portato avanti con prove interlaboratorio riguardanti analisi microbiologiche su matrici acquose assimilabili alle acque destinate al consumo umano e nel 2008 è stato integrato, con l’approvazione della Presidenza dell’ISS, con circuiti interlaboratorio riguardanti le acque di scarico.

Le prove interlaboratorio sono condotte due volte all’anno e vedono coinvolti laboratori che si occupano di analisi microbiologiche del comparto idrico.

I parametri microbiologici da rilevare sono coliformi, *Escherichia coli*, enterococchi, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa* e altri parametri indicatori di fecalizzazione e/o dello stato delle diverse matrici idriche.

L’accordo prevede l’organizzazione di convegni, workshop, riunioni nel corso dei quali si discutono i risultati ottenuti dai laboratori partecipanti nell’ambito delle diverse prove interlaboratorio e si forniscono approfondimenti tecnici sulle tematiche oggetto delle medesime prove sia in relazione a temi di microbiologia sia in relazione a temi attinenti la qualità delle prove.

Attualmente i laboratori partecipanti ai circuiti sono circa 300.

Nel corso del presente anno 2009 è previsto un ulteriore rinnovo triennale dell’accordo.

Risultati attesi nel triennio

Diffusione e miglioramento della politica della qualità nell'ambito del comparto dei laboratori che si occupano di analisi di matrici idriche.

Trasferibilità dei risultati

Realizzazione di eventi formativi che prevedono crediti formativi per i partecipanti. Pubblicazioni scientifiche.

Riparazione del DNA e instabilità genomica in cellule staminali emopoietiche

Obiettivi del progetto sono: i) lo studio dell'efficienza dei sistemi di riparazione del DNA in precursori ematopoietici; ii) il ruolo di mutazioni nei geni della riparazione del DNA nell'insorgenza di leucemie mieloidi acute sia *de novo* che secondarie al trattamento per un primo tumore.

Risultati attesi nel triennio

Programma di attività e Metodi: Isolamento di cellule CD34+ da sangue cordonale e caratterizzazione per *Real-time* PCR dei livelli di espressione di vari geni della riparazione del DNA. Analisi funzionale delle vie di riparazione dopo trattamento con agenti metilanti e radiazioni ionizzanti. Analisi mutazionale per sequenziamento automatizzato in leucemie mieloidi acute.

Trasferibilità dei risultati

Risultati scientifici previsti: un'augmentata conoscenza delle capacità di riparazione del danno al DNA in staminali normali e cellule leucemiche potrà aiutare a disegnare trattamenti terapeutici più mirati.

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. L'evidenza epidemiologica di una consistente associazione tra cancro e abitudini alimentari suggerisce che l'esposizione a genotossine alimentari possa contribuire significativamente alla eziologia di alcune patologie tumorali. Le evidenze accumulate negli ultimi anni sulla presenza diffusa negli alimenti di potenti agenti genotossici e/o cancerogeni come l'acrilamide e il furano avallano l'ipotesi che l'esposizione ad agenti genotossici con la dieta possa rappresentare un significativo fattore di rischio, e suggeriscono l'opportunità di ulteriori indagini volte alla identificazione delle componenti genotossiche presenti nella dieta.

Questa linea di ricerca rappresenta la continuazione di una attività pluriennale svolta su tale problematica, finalizzata alla identificazione e caratterizzazione del rischio genotossico di contaminanti/*by-product* o sostanze aggiunte intenzionalmente agli alimenti.

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

- la caratterizzazione del potenziale genotossico del furano *in vivo* (progetto in corso con finanziamento dell'UE);
- la definizione delle caratteristiche genotossiche di alcuni composti aromatizzanti di interesse prioritario;
- la valutazione, attraverso approcci sperimentali e non sperimentali, della interazione tra suscettibilità individuale agli effetti genotossici e *uptake* di micronutrienti.

Risultati attesi nel triennio

I principali risultati attesi sono i seguenti:

- la caratterizzazione del potenziale genotossico del furano *in vivo*, con particolare riferimento agli effetti indotti nei tessuti bersaglio dell'effetto cancerogeno; tale informazione è necessaria ai fini della delucidazione del meccanismo di cancerogenicità del furano, e della valutazione del rischio posto dalla presenza negli alimenti delle basse dosi di furano che si formano durante il trattamento termico degli stessi;
- la definizione del rischio genotossico posto da alcuni composti aromatizzanti di largo impiego che presentano *alert* strutturali di genotossicità (composti carbonilici alpha-beta insaturi), e che sono stati valutati e provvisoriamente autorizzati nell'ambito della procedura stabilita dal Regolamento Comunitario 1565/2000;
- informazioni sull'influenza dei micronutrienti e delle patologie che ne modificano la disponibilità (per es. la malattia celiaca) sulla stabilità genomica e sindromi 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 definizione del meccanismo d'azione cancerogena del furano, con particolare riferimento alla sua genotossicità, è stata riconosciuta dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA) un elemento decisivo per la valutazione del rischio per l'uomo; la stessa Autorità Europea ha sottolineato la necessità di colmare le carenze conoscitive sulla genotossicità dei composti aromatizzanti degli alimenti, con priorità per quelli con *alert* strutturali. Infine, 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.

Sorveglianza epidemiologica di patogeni virali umani (adenovirus, enterovirus, norovirus, e virus dell'Epatite E), attraverso il monitoraggio parallelo di acque reflue, fanghi depurati e casi clinici

Il riciclo e riutilizzo delle acque reflue depurate, nelle attività agricole, nei processi industriali, negli usi civili ammessi, consente di diminuire il prelievo delle risorse idriche naturali superficiali e sotterranee ed è normato dal DL.vo 152/99, modificato poi dal DL 152/2006. Esso prevede che le Regioni adottino norme e misure volte a favorire il riutilizzo delle acque reflue depurate. Gli impianti di depurazione devono, quindi, essere considerati veri e propri "processi produttivi" se predisposti per produrre acqua depurata che possa essere anche riutilizzata. Tali impianti producono anche fanghi la cui destinazione è ancora prevalentemente lo smaltimento in discarica speciale e pertanto, come alternativa, se ne incoraggia l'utilizzo anche in agricoltura secondo quanto normato dal DL.vo 27/1/1992 n. 99 di attuazione della Direttiva n. 86/278/CEE. Le leggi regionali hanno individuato un totale di 92 Ambiti Territoriali Ottimali (ATO) con indicazioni normative in parte omogenee e in parte contrastanti. Il criterio di riutilizzo dell'acqua e dei fanghi depurati comporta una differenziazione sia della tipologia del trattamento che degli standard di qualità chimici e microbiologici. Questi ultimi sono sempre limitati alla misurazione dei coliformi e mai dei patogeni virali. A ciò si aggiunge che, in Italia, la circolazione di molti virus enterici è alquanto sottostimata a causa di un sistema di notifica legato soprattutto a eventi epidemici che spesso coinvolgono un gran numero di persone. Il rischio virale quindi legato al riutilizzo delle acque depurate e dei fanghi è totalmente sconosciuto.

Risultati attesi nel triennio

Il coinvolgimento capillare di funzionari e tecnici degli organi regionali, nonché eventuali cliniche universitarie consoliderà il network già implementato nell'ambito di un progetto

finanziato dal CCM del Ministero della Salute (http://www.ccm-network.it/prg_area1_mal_infettive). I dati sulla prevalenza dei ceppi virali circolanti nell'ambiente, consentiranno di integrare in modo razionale i dati epidemiologici tradizionali che sono basati sulla notifica degli eventi epidemici. Il lavoro validerà metodiche d'eccellenza basate sulla identificazione qualitativa (RT-PCR) e sulla quantificazione (*RealTime*-RTPCR) dei virus seguiti da sequenziamento genico e colture cellulari. Il sistema permetterà di verificare la circolazione di varianti non autoctone importate attraverso la globalizzazione. La disponibilità di campioni caratterizzati per questo ampio spettro di patogeni enterici, consentirà di validare un doppio sistema di *microarray* totalmente innovativo. Il primo (BCS) potrà analizzare 96 campioni per volta su un unico microchip per l'identificazione di un solo patogeno per volta. Il secondo (DG) consentirà di analizzare tre campioni su un unico microchip contenente gli *array* di tutti e quattro i patogeni. La procedura operativa verrà semplificata in entrambi i metodi per future applicazioni routinarie. In aggiunta, mediante un sistema integrato di *RealTime* colture cellulari verrà stabilita la frazione infettante di virus coltivabili nei campioni analizzati. Le capacità degli impianti, espressi in abitanti equivalenti, serviranno ad estrapolare i dati statistici di popolazione.

Trasferibilità dei risultati

La diagnostica virale rapida è ormai indispensabile e universalmente adottata per l'identificazione rapida dell'agente eziologico di una malattia infettiva. La conoscenza dei ceppi circolanti sul territorio nazionale permetterà di migliorare l'efficienza e l'accuratezza di questi sistemi diagnostici che contribuiranno nell'insieme a produrre informazioni utili per la proposta di nuovi vaccini, soprattutto per gli adenovirus. È noto, infatti, quanto questi siano pericolosi per i soggetti immunodepressi a causa della loro peculiare trasmissione per via aerea, oltre che fecale. È anche possibile prevedere una applicazione nella revisione del DL 152/2006 onde caratterizzare al meglio i potenziali rischi per la salute umana derivanti dal riutilizzo delle acque e dei fanghi depurati. Il sistema diagnostico a microchip, se validato, sarebbe un valido strumento diagnostico per il nostro sistema sanitario e per gli operatori preposti all'ambiente.

Studio dei meccanismi di prevenzione e riparazione del danno ossidativo al DNA in modelli sperimentali di patologie neurodegenerative

La corea di Huntington è una malattia ereditaria di tipo autosomico dominante caratterizzata dalla morte di neuroni striatali e corticali. Questa malattia neurologica è causata dalla espansione di sequenze ripetute CAG nel gene che codifica per una proteina chiamata Huntington. Esperimenti svolti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che la espressione della idrolasi hMTH1 svolge un ruolo protettivo nei confronti della neurodegenerazione tipica di HD. Si tratta di un enzima della riparazione che elimina gli effetti dannosi dovuti alla presenza di precursori ossidati della sintesi degli acidi nucleici. La messa a punto di un topo transgenico che sovraesprime la proteina umana hMTH1 potrebbe contribuire enormemente al chiarimento del ruolo di questa proteina nella patogenesi e, forse, nel trattamento delle malattie neurodegenerative. Ci proponiamo quindi di valutare gli effetti neuroprotettivi di hMTH1 esprimendo la proteina con vettori lentivirali nel cervello di topi affetti da HD.

Risultati attesi nel triennio

Lo scopo di questo progetto è quello di verificare l'ipotesi che la modulazione dei meccanismi di induzione, prevenzione e riparazione dal danno ossidativo al DNA possa rappresentare un approccio neuroprotettivo per le malattie neurodegenerative. Tale obiettivo sarà affrontato in maniera innovativa, grazie alla disponibilità di modelli transgenici originali e di metodologie avanzate.

Studio della tossicocinetica e dei meccanismi di tossicità di pesticidi e contaminanti ambientali sintetici e naturali, con particolare attenzione a interazioni per esposizioni multiple, e a fattori di suscettibilità metabolici e legati alle diverse fasce di età

Il progetto si propone di contribuire alla conoscenza dei meccanismi di tossicità e della diversa suscettibilità agli effetti di pesticidi e contaminanti ambientali sintetici e naturali rilevanti dal punto di vista sanitario, a cui gran parte della popolazione è esposta. La diversa suscettibilità può essere dovuta a: i) caratteristiche genetiche (polimorfismi genetici per gli enzimi del metabolismo alterano l'equilibrio tra bioattivazione e detossificazione influenzando drasticamente la tossicità); ii) caratteristiche legate all'età (esposizione in utero e pre-postnatale può causare rischi diversi da quelli tipici dell'età adulta dovuti al diverso grado di maturazione degli organi interni, la funzionalità incompleta/diversa dei sistemi metabolici). Inoltre nella realtà l'esposizione multipla rappresenta la regola più che l'eccezione, mentre la valutazione del rischio avviene per singole sostanze. Le informazioni disponibili per identificare eventuali interazioni che diano effetti diversi dalla semplice additività sono molto scarse e generalmente sono dovute a interferenze a livello tossicocinetico. Le informazioni raccolte potranno essere 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: i) identificazione di fattori metabolici di suscettibilità agli effetti di pesticidi e contaminanti ambientali sintetici e naturali, attraverso l'impiego di enzimi umani ricombinanti e di frazioni subcellulari epatiche ed extraepatiche di origine umana. Gli enzimi identificati potranno essere utilizzati come biomarcatori di suscettibilità in studi di popolazione mirati, ii) identificazione di eventuali meccanismi di suscettibilità legata alla esposizione durante la gravidanza e alle diverse fasce di età, 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, iii) individuazione di fenomeni di interazioni tossicocinetiche nella fase di assorbimento e biotrasformazione tra contaminanti diversi e rispetto a prodotti endogeni (es. ormoni steroidei) 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 a pesticidi e a contaminanti ambientali sintetici e naturali, identificando fattori di vulnerabilità (es. bambini e/o donne in gravidanza) e possibili fenomeni di interazione da segnalare per limitare eventuali condizioni d'uso. I risultati potranno perciò essere trasferiti sia a livello nazionale (es. Commissione Consultiva per i Prodotti Fitosanitari) che internazionale (es. UE ed EFSA, per l'inserimento in All. I dei prodotti fitosanitari secondo la Dir. Europea 91/414). 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 della tossicocinetica e dei meccanismi di tossicità di pesticidi e contaminanti ambientali sintetici e naturali, con particolare attenzione a interazioni per esposizioni multiple, e a fattori di suscettibilità metabolici e legati alle diverse fasce di età

Il progetto si propone di contribuire alla conoscenza dei meccanismi di tossicità e della diversa suscettibilità agli effetti di pesticidi e contaminanti ambientali sintetici e naturali rilevanti dal punto di vista sanitario, a cui gran parte della popolazione è esposta. La diversa suscettibilità può essere dovuta a: i) caratteristiche genetiche (polimorfismi genetici per gli enzimi del metabolismo alterano l'equilibrio tra bioattivazione e detossificazione influenzando drasticamente la tossicità); ii) caratteristiche legate all'età (esposizione in utero e per-postnatale può causare rischi diversi da quelli tipici dell'età adulta dovuti al diverso grado di maturazione degli organi interni, la funzionalità incompleta/diversa dei sistemi metabolici). Inoltre nella realtà l'esposizione multipla rappresenta la regola più che l'eccezione, mentre la valutazione del rischio avviene per singole sostanze. Le informazioni disponibili per identificare eventuali interazioni che diano effetti diversi dalla semplice additività sono molto scarse e generalmente sono dovute a interferenze a livello tossicocinetico. Le informazioni raccolte potranno essere 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: i) identificazione di fattori metabolici di suscettibilità agli effetti di pesticidi e contaminanti ambientali sintetici e naturali, attraverso l'impiego di enzimi umani ricombinanti e di frazioni subcellulari epatiche ed extraepatiche di origine umana. Gli enzimi identificati potranno essere utilizzati come biomarcatori di suscettibilità in studi di popolazione mirati, ii) identificazione di eventuali meccanismi di suscettibilità legata alla esposizione durante la gravidanza e alle diverse fasce di età, 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, iii) individuazione di fenomeni di interazioni tossicocinetiche nella fase di assorbimento e biotrasformazione tra contaminanti diversi e rispetto a prodotti endogeni (es. ormoni steroidei) 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 a pesticidi e a contaminanti ambientali sintetici e naturali, identificando fattori di vulnerabilità (es. bambini e/o donne in gravidanza) e possibili fenomeni di interazione da segnalare per limitare eventuali condizioni d'uso. I risultati potranno perciò essere trasferiti sia a livello nazionale (es. Commissione Consultiva per i Prodotti Fitosanitari) che internazionale (es. UE ed EFSA, per l'inserimento in All. I dei prodotti fitosanitari secondo la Dir. Europea 91/414). 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 ecc.) 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 interazione 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 xeno biotici.

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 e validazione di metodi multiresiduo per l'analisi di fitofarmaci Organofosforati e N-Metil Carbammati nei prodotti alimentari di origine animale e alimenti con alto contenuto di grassi e organizzazione di circuiti interlaboratorio

L'impiego di fitofarmaci utilizzati sia per la protezione di derrate alimentari che come farmaci veterinari, porta alla comparsa di residui in prodotti di origine animale, i cui Livelli Massimi di Residuo (LMR) sono stabiliti al momento della registrazione per l'impiego o durante rivalutazione tossicologica (Reg. (CE) 396/2005 e Reg. (CE) 2377/90). Il Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali da tempo stabilisce dei piani di monitoraggio nazionale per valutare la conformità agli LMR fissati e l'attuale Reg. (CE) 1213/2008 include

per la prima volta il monitoraggio di alimenti di origine animale nel programma comunitario triennale 2009-2011.

Il progetto ha lo scopo di sostenere l'attività del Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) per i residui di fitofarmaci nei prodotti alimentari di origine animale e alimenti con alto contenuto di grassi, che ha sede presso il Reparto di Antiparassitari dell'ISS.

Tra i compiti dell'LNR è previsto lo sviluppo di metodi per il controllo ufficiale dei campioni. I metodi devono essere validati in conformità alle norme e documenti guida di pertinenza (Decisione della Commissione 2002/657/CE, documento SANCO/2007/3131 e normativa UNI CEI EN ISO/IEC 17025), che impongono requisiti specifici per i metodi di analisi e i laboratori che effettuano controlli ufficiali.

Il progetto prevede anche la preparazione di esercizi interlaboratorio ai quali gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS) sono tenuti a partecipare per garantire il proprio sistema in Qualità.

Risultati attesi nel triennio

Nel triennio 2009-2011, si prevede lo sviluppo di metodi multiresiduo per l'analisi di fitofarmaci Organofosforati e N-Metil Carbammati da usare per i programmi di monitoraggio e per l'analisi di conferma di campioni dove si sia riscontrato il superamento del Limite Massimo di Residuo. Alcune metodiche sono già state sviluppate nel Reparto Antiparassitari ma si propone di ampliare e mirare la ricerca dei principi attivi selezionati nei piani di monitoraggio nazionale ed europeo in relazione alle matrici individuate negli stessi piani. I metodi del Reparto utilizzano tecniche di ripartizione su matrice solida per l'estrazione e la purificazione dei campioni, soddisfacendo i requisiti di rapidità, facilità di esecuzione, miniaturizzazione delle procedure di analisi in favore di bassi consumi di solventi e materiali e di un minore impatto ambientale. L'approccio che si intende seguire nella presente ricerca è quello di sviluppare metodi multiresiduo per gruppi selezionati di composti che condividano una similarità di classe chimica e comportamento analitico.

È poi prevista la validazione di tutte le metodiche analitiche sviluppate in ottemperanza alle direttive di settore (Decisione della Commissione 2002/657/CE, documento SANCO/2007/3131 e normativa UNI CEI EN ISO/IEC 17025).

Inoltre, verranno organizzati dei gruppi di lavoro tra gli IZS e l'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 Organofosforati e N-Metil Carbammati servirà anche a sostenere l'attività di controllo e di monitoraggio degli IZS. I dati dei piani nazionali di monitoraggio vengono raccolti dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali e trasmessi annualmente all'Unione Europea, che li utilizza per la valutazione del rischio per la popolazione.

Suscettibilità agli agenti genotossici: ruolo dei fattori ambientali ed epigenetici nella variabilità individuale

La sensibilità individuale ai cancerogeni rappresenta un marcatore predittivo di suscettibilità al cancro ed è influenzata sia da fattori genetici che ambientali. Studi recenti hanno dimostrato il peso significativo della componente ambientale ed evidenziato l'importanza di investigare come i singoli fattori associati, ad esempio, allo stile di vita possano modulare questo fenotipo. Il

modello sperimentale ottimale per approfondire il ruolo dell'ambiente è rappresentato dagli studi sui gemelli che, essendo condotti su individui geneticamente identici, permettono di attribuire direttamente alla componente ambientale le differenze fenotipiche osservate. Questo sistema sperimentale è anche utile per analizzare i cambiamenti epigenetici che si accumulano nel corso della vita, indotti da fattori ambientali e fisiologici. Le modificazioni epigenetiche, che interessano gli acidi nucleici senza causare alterazioni della sequenza nucleotidica, sono implicate nel controllo dell'espressione genica, della riparazione del DNA e della struttura del genoma. Questa linea di ricerca si propone di studiare in una popolazione di gemelli il ruolo della componente ambientale ed epigenetica nella modulazione della suscettibilità individuale agli agenti mutageni.

Risultati attesi nel triennio

I principali risultati attesi forniranno informazioni su:

- l'influenza di fattori legati allo stile di vita (fumo, alcol, dieta) sulla sensibilità individuale ai mutageni e i meccanismi eventualmente coinvolti, quali la segnalazione del danno sul DNA, la capacità individuale di riparazione del danno e l'analisi dell'efficienza individuale nella rimozione delle cellule molto danneggiate;
- l'influenza di micronutrienti (es. acido folico, antiossidanti) sulla stabilità del genoma e di importanti strutture cromosomiche come i telomeri, le cui alterazioni sono state associate ad alti livelli di instabilità cromosomica e a diversi tipi di tumore;
- l'influenza dei fattori ambientali sui cambiamenti epigenetici, meccanismo molecolare coinvolto nella regolazione dell'espressione genica, notoriamente alterato nel processo di cancerogenesi;
- l'influenza dei cambiamenti epigenetici sulla sensibilità ai mutageni, probabilmente significativa considerando la possibile associazione tra i cambiamenti epigenetici e l'instabilità cromosomica.

Trasferibilità dei risultati

L'identificazione e la caratterizzazione dei fattori di rischio nell'ambiente è preliminare all'implementazione degli interventi di prevenzione ai fini della tutela della salute pubblica. Inoltre, identificare i fattori ambientali che influenzano la sensibilità individuale ai mutageni può avere una rilevanza significativa per caratterizzare preventivamente la risposta individuale ai trattamenti chemio e radioterapici.

Sviluppo di metodologie analitiche specifiche monoresiduo per la determinazione dei residui di fitofarmaci in matrici vegetali

Il Regolamento Comunitario n. 396/2005/EC del Parlamento Europeo e del Consiglio del 23 febbraio 2005 definisce una politica comunitaria armonizzata in materia di controllo dei Limiti Massimi dei Residui di fitofarmaci su prodotti di origine vegetale e animale.

L'articolo 28 del Regolamento definisce i criteri di accettabilità dei metodi di analisi secondo quanto previsto dal Regolamento Comunitario n. 882/2004/EC in materia di controllo ufficiale su cibo e mangimi. Esso definisce le linee guida europee sulla base delle quali devono essere sviluppati e validati i metodi di analisi dei residui di fitofarmaci (documento SANCO/2007/3131).

L'articolo 28 stabilisce altresì che tutti i laboratori che effettuano controlli ufficiali sui residui di fitofarmaci devono partecipare ai *Proficiency Test* (PT) organizzati dai Laboratori Comunitari di Riferimento su incarico della Commissione Europea. Sulla base dell'articolo 28 il Laboratorio Nazionale di Riferimento per i metodi singoli (istituito presso il Reparto Antiparassitari) è obbligato a partecipare ai PT europei organizzati dal Laboratorio Comunitario

di Riferimento per i metodi singoli con il quale deve collaborare per interscambi di carattere normativo e scientifico, secondo quanto previsto dal regolamento 882/2004/EC.

La partecipazione ai PT per le metodiche mono residuo richiede lo studio e lo sviluppo di metodi di analisi specifici per alcune categorie di composti per i quali non è possibile applicare metodi di analisi multi residuo comunemente adottati per il controllo dei limiti massimi dei residui di fitofarmaci.

Il progetto si propone di sviluppare metodi analitici innovativi e specifici tali da permettere la determinazione di residui di fitofarmaci in matrici vegetali (frutta, ortaggi e cereali).

I principi attivi per i quali saranno sviluppati metodi analitici specifici nell'ambito del progetto proposto sono fenossiacidi (MCPA, MCPB, 2,4-D, MCPP), il gruppo dei ditiocarbamati (Maneb, Mancozeb, Metiram, Propineb, Thiram e Ziram), Captan, Folpet, Abamectina, Glifosate, Mepiquat e Chlormequat. Tali principi attivi data la loro natura chimica non possono essere determinati mediante metodi multi residuo e devono necessariamente essere analizzate con metodi *ad hoc* che spesso richiedono procedimenti lunghi e dispendiosi in termini di tempo e di quantità di reattivi utilizzati. Il progetto si propone di sviluppare metodologie analitiche rapide e specifiche tali da poter ottenere un estratto direttamente analizzabili in LC/MS/MS e GC/MS/MS, con limiti di quantificazione inferiori a 0.01 mg/kg. Lo sviluppo di metodi mono residuo rapidi e specifici dovrebbe permettere un più rapido controllo delle sostanze attive, nei prodotti di origine vegetale, che spesso vengono 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, il Laboratorio Nazionale di Riferimento, svilupperà metodi di analisi mono residuo per quei principi attivi per i quali sono state evidenziate carenze sperimentali da parte dei laboratori ufficiali nazionali.

Nella terza fase del progetto i metodi sviluppati verranno proposti per la validazione mediante l'organizzazione di circuiti interlaboratorio con la collaborazione dei laboratori ufficiali preposti al controllo dei residui di fitofarmaci.

Trasferibilità dei risultati

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

Sviluppo e validazione di metodi analitici per la determinazione di residui di prodotti fitosanitari in matrici vegetali

L'impiego dei prodotti fitosanitari in agricoltura è uno dei mezzi utilizzati per cercare di ottenere un'efficace protezione dei vegetali dall'azione di organismi nocivi, che si riflette negativamente sulla qualità dei prodotti e sulla resa dei raccolti. Fra gli organismi nocivi che possono essere controllati tramite l'impiego dei prodotti fitosanitari si ricordano principalmente: insetti, funghi, erbe infestanti.

L'uso dei prodotti fitosanitari può comportare la presenza, nei prodotti destinati all'alimentazione provenienti da coltivazioni trattate con prodotti fitosanitari, di piccole quantità (residui) dei principi attivi (o sostanze attive) impiegate.

Tali residui non devono essere presenti in quantità tali da comportare effetti nocivi per la salute dell'uomo (operatori del settore, consumatori) e degli animali. La quantità massima di residuo tollerato (per ogni combinazione sostanza attiva/matrice alimentare) viene indicato

come Limite Massimo di Residuo (LMR) e viene fissato al momento della registrazione o in sede di rivalutazione periodica.

Gli LMR sono attualmente armonizzati a livello comunitario dal Regolamento Comunitario n. 396/2005/EC, entrato in vigore il 01/09/2008.

Il Ministero del Lavoro, delle Salute e delle Politiche Sociali stabilisce annualmente un piano nazionale di monitoraggio degli alimenti, campionati secondo la Dir. 2002/63/CE recepita in Italia dal DM 23 luglio 2003, per la verifica del rispetto dei suddetti LMR.

Il superamento degli LMR comporta una denuncia penale a carico del detentore e/o del produttore e, se richiesta, prevede la possibilità dell'esecuzione presso l'ISS, Dipartimento di AMPP, Reparto Antiparassitari, di un'analisi di revisione.

Il Reparto è anche sede del Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) per i residui di fitofarmaci in matrici ortofrutticole e in tal veste ha il compito di coordinamento tecnico/scientifico dei laboratori ufficiali italiani che svolgono analisi di residui di fitofarmaci in matrici alimentari.

Risultati attesi nel triennio

Nel triennio il progetto si propone di sviluppare metodi multiresiduo per l'analisi dei residui di fitofarmaci nelle matrici di interesse che siano: rapidi, di facile esecuzione, a basso consumo di solventi e accoppiati a tecniche di determinazione strumentali sofisticate e dotate di elevata selettività e sensibilità quali l'LC/MS/MS e la GC/MS/MS, utilizzabili nell'ambito delle attività istituzionali svolte dal Reparto Antiparassitari.

Tali metodi saranno quindi sottoposti a processo di validazione secondo le norme e le linee guida di settore: norma UNI 17025, documento SANCO 3131/2007.

Si prevede l'organizzazione di gruppi di lavoro tra l'LNR per i residui di fitofarmaci in matrici ortofrutticole e i laboratori ufficiali italiani (ARPA, APPA, ASL, IZS) nel corso dei quali trattare problemi tecnici specifici di particolare interesse pratico (approccio pratico alla stima dell'incertezza di misura, interpretazione dei risultati rispetto al limite di legge alla luce dell'incertezza, arrotondamento del risultato analitico e cifre significative).

Trasferibilità dei risultati

Lo sviluppo e la validazione dei metodi per l'analisi dei residui di fitofarmaci in matrici alimentari saranno di supporto per le attività istituzionali del Reparto Antiparassitari per quanto riguarda l'esecuzione delle analisi di revisione e per le attività di competenza dell'LNR per le matrici ortofrutticole. Inoltre i metodi sviluppati e validati potranno essere di supporto all'attività di controllo svolta sul territorio dai laboratori ufficiali italiani (ARPA, APPA, ASL, IZS).

Sviluppo, validazione e applicazione di metodologie multiresiduo, con particolare riguardo alle classi di composti organoclorurati e piretroidi, per la determinazione di residui di fitofarmaci in alimenti di origine animale, nell'ambito dell'attività di ricerca svolta dall'LNR per i prodotti di origine animale

Il progetto ha lo scopo di sviluppare e validare metodiche analitiche multiresiduo, in particolare per le classi di composti organoclorurati e piretroidi, per il controllo dei livelli di residui di fitofarmaci negli alimenti di origine animale destinati all'uomo (carni, uova, latte e prodotti derivati, miele, pesce). L'attività di controllo in questo settore è regolamentata a livello Europeo dal Reg. 882/2004, la cui attuazione ha portato alla formazione sia del *Community Reference Laboratory* (CRL) sia del *National Reference Laboratory* (NRL) specifici per gli alimenti di origine animale (AO). L'LNR ha il compito di coordinare, in accordo con il CRL, l'attività dei laboratori ufficiali, responsabili del controllo degli alimenti sul territorio nazionale,

per il rispetto dei Limiti Massimi dei Residui (LMR), recentemente armonizzati a livello europeo con il Reg. 396 del 2008.

L'NRL-AO ha sede presso il Reparto Antiparassitario dell'ISS.

I metodi sviluppati devono essere validati in accordo alla normativa UNI CEI EN ISO/IEC 17025, alla Decisione della Commissione 2002/657/CE e alle linee guida SANCO/2007/3131, che impongono specifici criteri di qualità dei dati analitici prodotti.

Risultati attesi nel triennio

Nel triennio 2009-2011 si ritiene possibile lo sviluppo di più metodi analitici riferiti alle classi di composti organo clorurati e piretroidi in una o più matrici di origine animale, sulla base delle indicazioni fornite dal CRL, in termini di selezione dei principi attivi e delle matrici di interesse.

I metodi sviluppati saranno validati secondo le norme sopra indicate.

Trasferibilità dei risultati

I metodi analitici sviluppati potranno essere utilizzati nell'ambito dei Piani Nazionali per il controllo dei livelli di residui di antiparassitari negli alimenti, eseguiti sul tutto il territorio nazionale in collaborazione con diverse strutture: ASL, Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA) e IZS regionali. I dati ottenuti dai monitoraggi sono trasferibili al Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali e alla Commissione Europea.

The role of oxidative DNA damage repair in cancer risk

Negli ultimi anni l'obiettivo principale della nostra ricerca è stato l'analisi del ruolo della riparazione del danno ossidativo del DNA nelle malattie umane. I risultati principali sono stati: i) la scoperta del ruolo del *Nucleotide Excision Repair* (NER) nella riparazione del danno ossidativo e le sue implicazioni per il rischio di cancro e di malattie neurodegenerative; ii) l'identificazione di profili di espressione genica che distinguono i tumori gastrici con e senza instabilità dei microsatelliti.

Questo progetto parte da queste scoperte proponendo approcci sperimentali utili a migliorare la conoscenza del *cross-talk* tra diversi meccanismi nella riparazione del danno ossidativo del DNA e il relativo contributo di diversi tipi di alterazioni (mutazioni/cambiamenti nell'espressione) di geni della riparazione nel rischio di cancro gastrico sporadico. Il cancro gastrico è un buon modello di malattia da *oxyradical overload* poiché l'infezione da *Helicobacter pylori*, che causa stress ossidativo, è uno dei maggiori fattori di rischio.

Risultati attesi nel triennio

La conoscenza derivata da questo studio contribuirà alla comprensione del ruolo del danno ossidativo nella cancerogenesi e nello sviluppo di malattie neurodegenerative. Inoltre, si definirà il ruolo della deregolazione di specifici meccanismi di riparazione nell'insorgenza del tumore gastrico.

Trasferibilità dei risultati

La nostra ricerca aumenterà la conoscenza del ruolo di difetti nel processamento del danno ossidativo nell'eziopatogenesi di malattie genetiche rare quali *xeroderma pigmentosum* e sindrome di Cockayne così come nel rischio di cancro o di malattie neurodegenerative nella popolazione generale. Inoltre, le informazioni relative alla deregolazione dell'espressione di geni della riparazione del DNA nel cancro gastrico potrà fornire informazioni utili anche nel disegno di protocolli chemioterapici personalizzati.

Validazione e sviluppo di metodi multiresiduo per residui di prodotti fitosanitari negli oli di 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/2007/3131 è essenziale per garantire l’affidabilità dei dati forniti da tutti i laboratori dell’SSN, APPA e ARPA, 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 (COI), costituito da rappresentanti dei principali Paesi produttori di olio di oliva, istituzionalmente incaricati di effettuare i controlli ufficiali. L’obiettivo prioritario del Gruppo di Lavoro è quello di selezionare i metodi più affidabili per la determinazione dei residui di prodotti fitosanitari negli oli di oliva.

Negli ultimi anni sono già stati organizzati e coordinati nove *Proficiency Test* per il COI su residui di prodotti fitosanitari nell’olio di oliva coinvolgendo laboratori italiani e dell’area mediterranea. Al momento la sottoscritta è incaricata del coordinamento per il proseguimento dei lavori del Gruppo sopracitato.

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

Risultati attesi nel triennio

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 aggiornati 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 alla esposizione a cianotossine: monitoraggio ambientale con tecniche molecolari, caratterizzazione della biotrasformazione nell’uomo e di fattori metabolici di suscettibilità e identificazione di un possibile ruolo nell’eziopatogenesi della Sclerosi Laterale Amiotrofica. In collaborazione con il Reparto di Qualità degli ambienti acquatici e delle acque di balneazione

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. Le microcistine (MC) sono potenti

epatotossine, promotori tumorali, classificate dall'*International Agency for Research on Cancer* (IARC) come possibili cancerogeni umani. La cilindrospermopsina (CYN) è epato- e nefrotossica, con sospetta attività genotossica e cancerogena. Alcune CTX sono neurotossiche ed è stato suggerito un ruolo per cianobatteri tossici nell'eziopatogenesi di malattie neurodegenerative, tra cui la SLA attraverso la produzione di un aminoacido potenzialmente neurotossico (la beta-metilammioalanina (BMAA)). Nonostante le CTX rappresentino un problema sanitario rilevante, le informazioni tossicologiche disponibili e l'identificazione dei livelli espositivi sono limitate. 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: i) colmare alcune delle lacune conoscitive e migliorare il processo di valutazione dei rischi per la salute associati alla esposizione alle cianotossine e ii) verificare l'ipotesi di coinvolgimento dei cianobatteri e delle CTX nella eziopatogenesi della SLA.

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.
- verifica dell'ipotesi che associa l'esposizione a cianobatteri/cianotossine alla insorgenza di SLA attraverso l'identificazione della possibilità per i cianobatteri di sopravvivere in condizioni simili a quelle tipiche dell'organismo umano e della eventuale selezione dei genotipi 'tossici'.
- 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 per una migliore definizione dei livelli espositivi.

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 dalle varie fonti.
- miglioramento dei piani di monitoraggio, soprattutto in relazione alla valutazione dell'esposizione a cianotossine.
- 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.
- indicazioni sul ruolo dei cianobatteri nell'eziopatogenesi della SLA, e sviluppo di un "biomarcatore" per approntare sistemi di diagnosi precoce.
- disegno di programmi di profilassi per patologie neurologiche, successive alla eventuale identificazione di un target farmacologico specifico, costituito da agenti eziologici aggredibili.

Valutazione del rischio per la salute umana associato alla esposizione a cianotossine: monitoraggio ambientale con tecniche molecolari, caratterizzazione della biotrasformazione nell'uomo e di fattori metabolici di suscettibilità e identificazione di un possibile ruolo nell'eziopatogenesi della Sclerosi Laterale Amiotrofica

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. Le microcistine (MC) sono potenti epatotossine, promotori tumorali, classificate dalla *International Agency for Research on Cancer* (IARC) come possibili cancerogeni umani. La cilindrospermopsina (CYN) è epato- e nefrotossica, con sospetta attività genotossica e cancerogena. Alcune CTX sono neurotossiche ed è stato suggerito un ruolo per cianobatteri tossici nell'eziopatogenesi di malattie neurodegenerative, tra cui la SLA attraverso la produzione di un aminoacido potenzialmente neurotossico (la beta-metilamminoalanina (BMAA). Nonostante le CTX rappresentino un problema sanitario rilevante, le informazioni tossicologiche disponibili e l'identificazione dei livelli espositivi sono limitate. 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: i) colmare alcune delle lacune conoscitive e migliorare il processo di valutazione dei rischi per la salute associati alla esposizione alle cianotossine e ii) verificare l'ipotesi di coinvolgimento dei cianobatteri e delle CTX nella eziopatogenesi della SLA.

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.
- verifica dell'ipotesi che associa l'esposizione a cianobatteri/cianotossine alla insorgenza di SLA attraverso l'identificazione della possibilità per i cianobatteri di sopravvivere in condizioni simili a quelle tipiche dell'organismo umano e della eventuale selezione dei genotipi "tossici".
- 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 per una migliore definizione dei livelli espositivi.

Trasferibilità dei risultati

Le conoscenze acquisite potranno essere trasferite al Servizio Sanitario Nazionale (SSN) e potranno essere tradotte in:

- miglioramento della valutazione del rischio e definizione delle soglie accettabili di esposizione alle cianotossine dalle varie fonti.
- miglioramento dei piani di monitoraggio, soprattutto in relazione alla valutazione dell'esposizione a cianotossine.
- 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.

- indicazioni sul ruolo dei cianobatteri nell'eziopatogenesi della SLA, e sviluppo di un "biomarcatore" per approntare sistemi di diagnosi precoce
- disegno di programmi di profilassi per patologie neurologiche, successive alla eventuale identificazione di un target farmacologico specifico, costituito da agenti eziologici aggredibili.

Valutazione della presenza di alcuni contaminanti ambientali tossici e persistenti d'interesse emergente attraverso l'utilizzo di bioindicatori zootecnici

Organizzare una prima indagine conoscitiva che preveda la ricerca di alcuni contaminanti ambientali che per caratteristiche chimico-fisiche e tossicologiche, luogo e modalità di rilascio nell'ambiente, ecc., possono ritenersi d'interesse prioritario sia per l'ambiente che per la sicurezza alimentare.

Risultati attesi nel triennio

- La messa a punto di opportuni metodi analitici fondati su criteri di qualità internazionalmente riconosciuti;
- la verifica della presenza e la determinazione dei livelli di concentrazione di alcuni contaminanti di prioritario interesse in alimenti quali latte ovi-caprino e miele;
- la verifica della presenza di indicatori della qualità dell'ambiente in cui vengono svolte le attività legate alle filiere alimentari del latte ovi-caprino e del miele.

Trasferibilità dei risultati

Dati trasferibili al Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, all'SSN, agli operatori di settore.

Dipartimento
Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

Attività di controllo, valutazione, parere

Aggiornamenti di normative (OCSE e UE)

In qualità di membro del gruppo di esperti dell'OCSE 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 l'*European Commission 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.

Piano triennale

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

Analisi della presenza di alghe tossiche e delle tossine correlate in campioni di acqua potabile, balenabile 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 del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali e leggi sanitarie nazionali. Le tossine presenti vengono rilevate, identificate e stimate con sistemi di biosaggi e sistemi chimici strumentali. Vengono formulate 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.

Piano triennale

Le attività di studio continueranno ad 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 194/95. La gestione di tale attività richiede una continua attività sperimentale preliminare per la messa a punto dei metodi analitici adeguati agli accertamenti richiesti.

Piano triennale

Si prevede un totale di circa dieci pareri nel triennio 2009-2011.

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.

Piano triennale

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 aprile 1962, n.283 e dal DPR 26 marzo 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.

Piano triennale

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 27/01/1992 n. 120 per le Buone Pratiche di Laboratorio. Partecipazione all'attività dei Gruppi Ispettivi in relazione alla Direttiva 93/42/CEE per il rilascio della marcatura CE. Partecipazione ai lavori dei Gruppi Ispettivi in relazione al DL.vo 26/5/97 n. 156 – attuazione della Direttiva 93/99/CEE 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 NAS e/o della Magistratura.

Piano triennale

Proseguirà l'attività ispettiva, nell'ambito della marcatura CE (Direttiva 93/42/CEE, recepita in Italia mediante DL.vo 46/97 e successive modifiche). Inoltre proseguirà la valutazione della biocompatibilità dei dispositivi medici; 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.

Attività di parere 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, Commissione Europea, Comitati Scientifici sull'Alimentazione Umana e sulle Piante), anche nell'ambito della *Scientific COOPeration* (SCOOP).

Piano triennale

Nel prossimo triennio si svolgerà l'attività di formazione per operatori del Sistema Sanitario Nazionale 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, Commissione Europea, 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 2009-2011 la produzione di circa 12 pareri su richiesta della Direzione del Dipartimento.

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 gennaio 1992.

Piano triennale

Si prevede per il triennio 2009-2011 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.

Piano triennale

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 EU). Questa attività comprende anche quella, di settore, relativa al Laboratorio Nazionale di Riferimento per la ricerca dei residui negli animali vivi e nei loro prodotti (LNR), 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.

Piano triennale

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 ad 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.

Piano triennale

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 Guideline 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.), afferisce 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'Istituto.

Piano triennale

Per l'attività in esame, si prevedono circa tre riunioni nel triennio 2009-2011.

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 settembre 2000.

Piano triennale

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 del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali 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'Unione Europea presso "European Commission Co-ordination for the Evaluation of Active Substances Contained in Plant Protection Products under Council Directive 91/414/EEC" (ECCO).

Piano triennale

L'attività comporterà la partecipazione alla stesura di monografie europee per l'inclusione in All. 1 alla Dir. EU 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 (SM) 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 SM 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 coordinante 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.

Piano triennale

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 interferenti endocrini (*endocrine disruptors*, 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.

Piano triennale

Si prevede una riunione nel triennio in esame.

Identificazione molecolare di virus nell'acqua

Lavoro istituzionale in ottemperanza alle direttive CEE (76/160 dell'8 dicembre 1975) recepite dalla legislazione italiana con DPR 14/05/1988 n. 155 e DPR 236 del 24/05/1988 o particolari situazioni di emergenza (18/12/1997 Prot. S. 2992/62 bis, 12 novembre 1998 prot. 042408 08/09/2001, 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.

Piano triennale

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 Sanità (nomina con decreto del Ministro della Sanità 27/02/1997). I principi di 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.

Piano triennale

Per quanto riguarda gli aspetti relativi ai test di mutagenesi, in base all'attività precedente si prevedono circa 2-3 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 3-4 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.

Piano triennale

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'ENEA il nostro Dipartimento 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 152/99 e 258/00).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.

Piano triennale

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'Agencia Europea per la Sicurezza Alimentare (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.

Piano triennale

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.

Organismo Notificato

Le direttive europee sui dispositivi medici prevedono che tutti i dispositivi medici debbano recare la marcatura CE per poter essere immessi sul mercato; ai fini dell'ottenimento della marcatura CE i fabbricanti richiedono l'emissione della certificazione CE agli Organismi Notificati (ON).

L'ISS è accreditato dal Ministero della Salute (Autorità Competente per i dispositivi medici) come Organismo Notificato per le direttive 90/385/CEE (impiantabili attivi) e 93/42/CEE (dispositivi medici).

La sezione presso il Dipartimento AMPP svolge attività di certificazione CE ai sensi della direttiva 93/42/CEE.

L'iter di certificazione CE, che viene avviato dalla richiesta di certificazione CE presentata dal fabbricanti di dispositivi medici, consiste nell'esame della documentazione tecnica di prodotto e nell'effettuazione di verifiche ispettive presso i fabbricanti (ed eventuali terzi degli stessi).

L'esame della documentazione tecnica di prodotto permette di valutare la conformità del dispositivo medico ai requisiti essenziali previsti dalla direttiva 93/42/CEE; tali requisiti riguardano:

- le caratteristiche chimico, fisiche e biologiche dei prodotti
- le caratteristiche relative all'ambiente e alla fabbricazione
- le informazioni fornite dal fabbricante.

Le verifiche ispettive presso i fabbricanti di dispositivi medici vengono svolte sia in fase di prima richiesta di certificazione CE che periodicamente in quanto è compito dell'ON accertarsi che il fabbricante applichi il sistema di gestione della qualità implementato dai fabbricanti e precedentemente approvato. Durante le verifiche ispettive vengono valutati i seguenti aspetti:

- organizzazione del fabbricante (strutture organizzative e responsabilità)
- tecniche di controllo e di garanzia di qualità a livello di fabbricazione (procedure operative e registrazioni della qualità)
- procedura di sorveglianza del mercato da parte del fabbricante.

L'iter di certificazione si conclude, in caso di esito favorevole delle valutazioni dell'ON, con il rilascio della certificazione CE.

Piano triennale

Sarà effettuata la verifica della conformità dei dispositivi medici ai sensi della Direttiva 93/42/CEE e successivi aggiornamenti, mediante valutazione di fascicoli tecnici e verifiche ispettive presso i fabbricanti.

Si prevedono circa 1.000 richieste di certificazione CE da valutare per il prossimo triennio.

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.

Piano triennale

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 Guideline 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'Istituto.

Piano triennale

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

Piante officinali e medicinali

Le droghe vegetali e le loro preparazioni trovano molteplici usi, tra cui le bevande, gli alimenti, anche quelli destinati ad una alimentazione particolare compresi gli integratori alimentari, i cosmetici e le preparazioni farmaceutiche ed erboristiche. Le proprietà vanno da quelle aromatizzanti e/o profumanti, coloranti e nutrizionali a quelle variamente funzionali dal punto di vista cosmetico, salutistico e terapeutico. In questo ultimo caso le pratiche che impiegano preparazioni vegetali si rifanno ai principi della fitoterapia, omeopatia, ayurvedica, medicina tradizionale cinese, fiori di Bach, aromaterapia. Molto spesso il loro impiego viene proposto sulla base di conoscenze di tipo tradizionale e meno spesso su evidenze scientificamente provate, potendo talvolta essere una potenziale causa di rischio di effetti tossici o indesiderati che possono verificarsi anche in conseguenza di associazioni incontrollate di più prodotti.

Piano triennale

Nel triennio 2009-2011 si approfondirà l'attività per le piante officinali e/o medicinali per quanto riguarda l'identità botanica, l'origine, la provenienza, il metodo di preparazione, la composizione chimica, la destinazione di impiego e i dati della letteratura per quanto riguarda i dati biologici e tossicologici. Questo tipo di attività sarà di supporto nei vari progetti di legge nazionali che prevedono liste di piante. Non è prevedibile il numero di pareri da espletare nel triennio.

Procedura Centralizzata EMEA. 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 del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali su possibili rischi mutageni e cancerogeni di farmaci.

Piano triennale

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'Unione Europea 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*.

Piano triennale

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 dei dossier di sostanze attive e preparati di uso biocida (Dir. 98/8/CE)

Si valutano i dossier delle sostanze attive biocide e dei relativi preparati ai fini dell'applicazione della Dir. 98/8/CE – DL.vo 174/2000) e gestione degli aspetti tecnico-scientifici legati alla sua applicazione.

Piano triennale

Proseguirà l'attività di partecipazione alla stesura di monografie europee di sostanze attive a prodotti ad uso biocida per le quali l'Italia è Paese membro *rapporteur* relativamente agli aspetti legati agli effetti per la salute dell'uomo; preparazione delle risposte ai commenti degli altri SM e partecipazione alle riunioni tecniche a ISPRA – IRC presso l'ECB per la definitiva approvazione dell'*Assessment Report*. Sulla base delle attività degli ultimi due anni si prevede un'attività annuale di 4-5 monografie (principi attivi). Risposta ai commenti di altri SM su quattro Monografie presentate in precedenza e una settimana di riunione per la riunione al *Technical Meeting*.

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.

Piano triennale

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 decreto Legislativo 313/91.

Piano triennale

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 Decreto Legislativo 206/2005.

Piano triennale

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.

Piano triennale

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 2-4 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 dall'assunzione di preparati di medicine alternative (ayurvediche e cinesi).

Piano triennale

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 amalgame e protesi dentale

Accanto alle vie di esposizione a contaminanti solitamente studiate, specifiche problematiche ambientali e/o particolari stili di vita possono determinare situazioni di rischio per la salute umana, quindi si studiano problematiche tossicologiche derivanti anche dall'uso di amalgame dentali e protesi odontoiatriche.

Piano triennale

Proseguirà l'attività di valutazione della presenza di mercurio e altri metalli componenti le leghe utilizzate in odontoiatria ai fini di un potenziale rischio tossicologico per l'uomo.

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.

Piano triennale

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 Dipartimento del Farmaco relativi all'uso di prodotti cosmetici. Sulla base delle attività del precedente triennio, si prevede l'elaborazione di circa 10-15 pareri.

Valutazione dell'esposizione umana a inquinanti ad elevata persistenza e tossicità/definizione di azioni di riduzione dell'esposizione

Tale attività viene svolta nell'ambito delle Convenzioni "United Nations environment programme on persistent organic pollutants (UNEP-POPs)" 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/EU.

Piano triennale

Si prevede per tale attività, nel triennio 2009-2011, un espletamento di circa dieci pareri.

Valutazione dell'esposizione umana a inquinanti ad elevata persistenza e tossicità/valutazione del rischio tossicologico associato

Tale attività viene svolta nel contesto di diversi programmi internazionali tra cui il "Regionally based assessment of persistent toxic substances", promosso e coordinato dall'United Nations Environment Programme (UNEP). Il progetto ha lo scopo di caratterizzare l'esposizione umana ad inquinanti ad elevata persistenza e tossicità, tramite la definizione dei loro livelli nell'ambiente e negli alimenti, al fine di valutare il rischio attuale per la salute umana e gli ecosistemi.

Piano triennale

Prosegue l'attività di valutazione dell'esposizione umana a inquinanti ad elevata persistenza e tossicità, prevedendo un totale di cinque pareri.

Valutazione della genotossicità dei prodotti fitosanitari (punto 5.4 DL.vo 194/95)

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.

Piano triennale

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 all'esperienza pregressa in circa 12 pareri per il triennio 2009-2011.

Valutazione della genotossicità di sostanze a contatto con alimenti, aromatizzanti, additivi alimentari e coadiuvanti di processo (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare)

L'attività consultiva per l'Unione Europea 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'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (*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*).

Piano triennale

Nel triennio precedente sono stati elaborati circa 30 pareri. Un carico di lavoro analogo è ipotizzabile per il triennio 2009-2011.

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".

Piano triennale

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, ricreazionali, 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.

Piano triennale

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

Viene effettuata attività di supporto ad enti pubblici, quali Prefetture, ASL, PMP, Regioni e Province, in merito alla valutazione igienico-sanitaria di impianti di discarica e gestione dei rifiuti in genere. Vengono anche effettuate valutazioni e determinazioni analitiche finalizzate alla classificazione dei rifiuti in merito alla loro pericolosità.

Piano triennale

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 siti di bonifica di interesse nazionale (ai sensi del DL.vo 152/2006 e smi – art. 252) (circa 100 riunioni/anno); inoltre verranno effettuati sopralluoghi e campionamenti di suoli contaminati in siti di bonifica di interesse nazionale (su richiesta del Ministero Ambiente e/o Carabinieri NOE – 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 Ambiente – circa 50 richieste/anno); elaborazione di pareri in merito alla classificazione dei rifiuti pericolosi (su richiesta ARPA, Regioni, Province, Ministero 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 (su richiesta del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, Ministero Ambiente – circa dieci interventi/anno). Infine è prevista la partecipazione a *ring test* nazionali e internazionali, per la definizione di specifiche metodiche, per la valutazione del potenziale potere lisciviante dei rifiuti pericolosi e non, e di specifici test di ecotossicità per suoli e sedimenti contaminati (una partecipazione/anno).

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.

Piano triennale

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.

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 del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali 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 l'identificazione di limiti. Si effettuano valutazioni e pareri per lo *Scientific Committee for Health and Environmental Risks* (SCHER) della EU DG SANCO.

Piano triennale

Si prevede per il prossimo triennio un'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 di Prodotti Fitosanitari (DL.vo 194/95)

Si tratta di attività di valutazione delle proprietà tossicologiche di prodotti fitosanitari (sia principi attivi che formulati) nei dossier presentati per la loro autorizzazione. L'attività si svolge all'interno della Commissione Consultiva per i Prodotti Fitosanitari (art. 20 DL.vo 194/95) di cui la responsabile è membro supplente (nomina con DM 18 maggio 2000) ed esperto relativamente ai test di tossicocinetica e metabolismo e a tutti i test tossicologici (tossicità acuta, a medio e a lungo termine, irritazione e sensibilizzazione oculare e cutanea). Oltre alla preparazione dei pareri tossicologici (mediamente sei annui) e la partecipazione alle relative riunioni del Gruppo 1, all'interno della commissione, la responsabile dell'attività partecipa ai lavori del Gruppo Fitofarmacopea Ufficiale (art.18 DL.vo 194/95) in qualità di esperto per i settori più sopra indicati.

Piano triennale

L'attività comporta la partecipazione a riunioni della Commissione Consultiva per i Prodotti Fitosanitari presso il Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali in qualità di membri della commissione e di vari sottogruppi: sei riunioni plenarie/anno e riunioni mensili dei cinque sottogruppi, oltre a riunioni straordinarie per il gruppo Legislazione, attività comunitarie e per specifici sottogruppi *ad hoc*. Sulla base delle attività degli ultimi due anni si prevede: una media di 30 riunioni/anno e il rilascio di 30 pareri e valutazioni all'anno su principi attivi/prodotti fitosanitari.

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.

Piano triennale

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.

Verifica della conformità dei materiali a contatto con alimenti alle normative nazionali ed europee. 2. Vigilanza e verifica della conformità dei dispositivi medici

1. 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. 2. Vigilanza e verifica della conformità dei dispositivi medici: viene effettuata nell'ambito delle disposizioni di cui all'art. 17 del DL.vo 46/97 "Attuazione della Direttiva 93/42/CEE, concernente i dispositivi medici".

Piano triennale

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

Dipartimento
Biologia Cellulare e Neuroscienze

Attività di ricerca

A role for calcium dysregulation in Alzheimer's disease: bridging between experimental models and humans

Un'alterazione del *signaling* del calcio nella malattia di Alzheimer fu postulata per la prima volta nel 1987 da Khachaturian. Da allora numerosi studi sperimentali hanno svelato due vie principali attraverso le quali il Ca^{2+} condiziona o è condizionato dalla patologia. Infatti, un'alterata omeostasi del calcio dei neuroni può alterare sia il metabolismo che la produzione di proteine patologiche associate all'AD: il peptide beta-amiloideo (A-beta) e la tau. L'accumulo di queste proteine è in grado di determinare una alterazione del calcio e quindi disfunzione sinaptica e neurodegenerazione che sottende il declino cognitivo. Tale ipotesi venne avvalorata dalla scoperta del legame tra le mutazioni delle preseniline associate all'AD di tipo Familiare (FAD) e l'alterazione del *signaling* del calcio. Il *neuroimaging* di pazienti affetti da FAD e portatori della mutazione da noi individuata sulla presenilina2-A85V mostrano, nei gangli della base, calcificazioni cerebrali confermate dall'analisi neuropatologica (Piscopo, *et al.* 2008). Attualmente, non esistono dati *in vivo* che supportino l'alterazione del *signaling* del calcio nella patofisiologia dell'AD. Lo scopo del progetto sarà di migliorare la comprensione del legame tra dismetabolismo del calcio e AD mediante un approccio multidisciplinare tra biologia molecolare, biochimica, elettrofisiologia (Ca^{2+} *imaging*) e farmacologia. Si cercherà, inoltre, di valutare la capacità di due trattamenti: la memantina e la curcumina con lo scopo di consolidare e/o di proporre il loro impiego nel trattamento dell'AD.

Risultati attesi nel triennio

Le linee di fibroblasti umani portatori di diverse mutazioni sui geni delle preseniline da noi raccolte, e un nuovo topo transgenico portatore della mutazione PSEN2A85V da noi approntato, ci consentiranno, con un approccio multidisciplinare di indagare sugli effetti del dismetabolismo del Ca^{2+} che sembrano verificarsi sia nei FAD che nei casi sporadici (SAD). Inoltre, i modelli sperimentale da noi impiegati ci consentiranno di studiare la valenza terapeutica di due trattamenti farmacologici in relazione al metabolismo del Ca^{2+} : uno ampiamente utilizzato nella terapia dell'AD, l'altro quale sostanza naturale potenzialmente in grado di modificare il fenotipo patologico. La ricerca sui modelli di FAD anche se rappresentano il 5-10% di tutta la popolazione Alzheimer potrebbe essere potenzialmente rilevante per la comprensione dei meccanismi molecolari di base, per tutte le forme cliniche di AD.

Trasferibilità dei risultati

Lo scopo del progetto è quella di contribuire alla comprensione della modalità mediante la quale le mutazioni delle preseniline modificano l'omeostasi del Ca^{2+} e di valutare attraverso paradigmi sperimentali la capacità di due trattamenti farmacologici: allo scopo di trasferire le evidenze rivelate nei modelli sperimentali, nella pratica clinica, contribuendo così all'elaborazione di trattamenti terapeutici per la patologia. Un secondo outcome possibile sarà di valutare se la modifica dell'omeostasi del Ca^{2+} sia una condizione precoce della neurodegenerazione di tipo AD. Questa informazione potrebbe avere una notevole ricaduta sull'SSN, migliorando le capacità di intervento precoce nel controllo dei pazienti con declino cognitivo.

Agonisti del recettore nucleare PPAR-gamma come potenziali agenti terapeutici per proteggere gli oligodendrociti e promuovere la mielinizzazione

L'ipotesi alla base di questo progetto è che gli agonisti del recettore nucleare PPAR-gamma (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*) possano innescare una serie di eventi con ricadute positive su diversi aspetti della biologia degli oligodendrociti, le cellule responsabili della formazione della mielina nel sistema nervoso centrale. L'obiettivo del progetto è quindi quello

di identificare tali meccanismi al fine di avere un quadro più completo delle azioni di questi agonisti, alcuni dei quali già in uso nella pratica clinica per il trattamento del diabete di tipo 2, e di porre le basi per proporre l'uso di questi farmaci anche in patologie demielinizzanti (ad esempio la sclerosi multipla) o in patologie pediatriche caratterizzate da alterazioni nel processo di mielinizzazione. Utilizzando come modello sperimentale colture di precursori oligodendrocitari, ottenuti da cervello di ratto neonato, abbiamo dimostrato che gli agonisti del PPAR-gamma (pioglitazone e 15d-PGJ2) promuovono il differenziamento dei precursori verso forme più mature che esprimono proteine tipiche della mielina e allo stesso tempo aumentano le capacità di difesa dallo stress ossidativo. Questi risultati sono di particolare interesse se si considera che lo stress ossidativo caratterizza molte delle malattie de-mielinizzanti o dis-mielinizzanti e che la produzione di radicali liberi aumenta nelle fasi di elevato metabolismo tipico degli oligodendrociti durante le fasi di sintesi di mielina.

Risultati attesi nel triennio

Nel corso degli studi precedenti è stato dimostrato che l'attivazione del recettore PPAR-gamma da parte dei suoi agonisti specifici induce un'aumentata espressione di catalasi e SOD2, rispettivamente responsabili della degradazione del radicale perossido e dello ione superossido, e di UCP2, una proteina mitocondriale responsabile della diminuzione della produzione di ione superossido da parte dei mitocondri. Inoltre, si è osservata un'aumentata capacità da parte dei mitocondri di regolare la propagazione di onde citoplasmatiche di Ca^{2+} , conosciute come eventi promuoventi la mielinizzazione. Intendiamo proseguire gli studi verificando se questi meccanismi siano effettivamente in grado di proteggere gli oligodendrociti da insulti di tipo ossidativo, utilizzando paradigmi sperimentali che riproducono alcuni degli aspetti tipici delle patologie della mielina.

Intendiamo inoltre verificare il coinvolgimento di UCP-2 come mediatore degli effetti protettivi degli agonisti di PPAR-gamma attraverso alcune strategie sperimentali quali l'uso di inibitori specifici, il silenziamento della gene *ucp-2* con tecniche di siRNA; l'uso di topi geneticamente modificati, non esperimenti *ucp-2* (*Ucp2* $-/-$ KO).

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti potranno contribuire a valutare il potenziale terapeutico degli agonisti del PPAR-gamma, già in uso nella pratica clinica per il trattamento del diabete di tipo 2, in patologie della mielina. I risultati potranno essere utilizzati per elaborare e proporre nuovi paradigmi sperimentali pre-clinici, necessari per il trasferimento dei risultati sperimentali alla clinica.

Apoptosi/autofagia in cellule tumorali: radicali e microambiente tumorale

Il microambiente costituisce un elemento selettivo e determinante per lo sviluppo del processo tumorale e delle metastasi. Solo le cellule tumorali che sopravvivono alla selezione costituita dal microambiente sono in grado di proliferare. La cellula sopravvive alle condizioni avverse del microambiente (ad es. infiammazione, riduzione dei nutrienti, ipossia) tramite un processo di sopravvivenza e di autodistruzione di organelli intracellulari noto come autofagia. Il destino del tumore è determinato, pertanto, dall'equilibrio che si instaura tra i processi di apoptosi e di autofagia. L'obiettivo è quello di proporre una serie di strategie farmacologiche innovative tendenti a modificare il microambiente tumorale, e inibire il processo autofagico. Sotto questo aspetto poco è noto circa il ruolo dei radicali e dello stress ossidativo nel modificare il microambiente e determinare il destino della cellula tumorale. Obiettivo sarà verificare su cellule di melanoma metastatiche umane l'effetto di farmaci, inibitori metabolici e generatori di radicali sui processi di autofagia/apoptosi. In collaborazione con Dipartimento Farm.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi sono: una maggiore conoscenza dei processi di autofagia/apoptosi e del ruolo dei radicali nel determinare il destino delle cellule tumorali. Identificare farmaci o combinazioni di molecole adatte a determinare autofagia/apoptosi. Valutare il ruolo di inibitori metabolici per contrastare lo *shift* metabolico caratteristico delle cellule tumorali (*Warburg effect*).

Trasferibilità dei risultati

I risultati della ricerca verranno messi a disposizione della comunità scientifica tramite l'Alleanza Contro il Cancro.

Approcci innovativi allo studio dell'induzione e del riparo del danno ossidativo al DNA in modelli di malattie neurodegenerative: basi molecolari e identificazione di possibili bersagli terapeutici

Il progetto si propone di studiare i meccanismi responsabili dello stress ossidativo che sottende ai processi neurodegenerativi e di identificare nuove strategie neuroprotettive. In particolare, viene studiato il ruolo di hMTH1, un enzima che previene l'incorporazione di purine ossidate nel DNA ed è in grado di controllare il livello di ossidazione del DNA.

Risultati attesi nel triennio

Validare il ruolo neuroprotettivo di hMTH1 in un modello sperimentale di infiammazione del sistema nervoso centrale e studiare l'espressione e localizzazione cellulare di questo enzima in tessuto cerebrale *post-mortem* da pazienti con SM.

Trasferibilità dei risultati

Le nuove conoscenze sui meccanismi di danno neuronale indotto da stress ossidativo potranno contribuire all'identificazione di nuovi bersagli molecolari per terapie neuro protettive.

Assunzione di iodio attraverso la dieta: studio sulla popolazione generale e su fasce vulnerabili

La carenza nutrizionale di iodio costituisce un grave problema sanitario e sociale che interessa un numero elevato di persone in vari Paesi del mondo. La carenza iodica compromette la funzione tiroidea e si traduce in quadri morbosi, complessivamente denominati disordini da carenza iodica (IDD). La strategia raccomandata dalla WHO a livello mondiale, per l'eradicazione di queste patologie, è quella di aumentare l'apporto di iodio utilizzando come veicolo il sale alimentare. Per dare nuovo impulso al programma di iodoprofilassi in Italia, sono state emanate di recente una serie di misure legislative volte a promuovere il consumo di sale arricchito di iodio su tutto il territorio nazionale.

Presso l'ISS è stato istituito l'Osservatorio Nazionale per il Monitoraggio della Iodoprofilassi in Italia (OSNAMI).

Il progetto prevede la determinazione dei livelli di iodio nei diversi prodotti alimentari. La campionatura sarà realizzata secondo le indicazioni del *Codex Alimentarius*.

Saranno calcolate le assunzioni della popolazione combinando tali livelli con i dati di consumo alimentare INRAN recentemente revisionati (2009).

Le determinazioni verranno condotte con tecnica Q-ICP-MS (metodo validato).

Risultati attesi nel triennio

- Individuazione dei contenuti di iodio nei diversi alimenti.
- Valutazione delle assunzioni di iodio e loro confronto con le dosi raccomandate.

Trasferibilità dei risultati

- Eventuale revisione della normativa sul sale iodato.

- Trasferimento ai laboratori del controllo ufficiale di metodiche analitiche per l'analisi del contenuto di iodio.
- Valutazione dei livelli di presenza di iodio negli alimenti (sale) utilizzati nell'ambito della iodiofilassi.

Attività immunomodulatoria e metabolismo della vitamina D3 in cellule dendritiche umane

La vitamina D3 (vitD3), universalmente nota per il suo ruolo nell'omeostasi del tessuto osseo, è un ormone pleiotropico dotato di una potente attività immunomodulatoria. Importanti bersagli della vitD3 nel sistema immune sono le cellule dendritiche (DC), che esposte a 1,25(OH)2D3 – il suo metabolita attivo – diventano tollerogeniche. Le DC sono inoltre in grado di effettuare tutte le reazioni enzimatiche necessarie per la conversione della vitD3 in 1,25(OH)2D3, partecipando così al suo cosiddetto metabolismo extrarenale, che si ritiene svolga un ruolo chiave nel regolare la concentrazione locale, e l'attività, di 1,25(OH)2D3 proprio in organi bersaglio "non classici", quali il sistema immune.

Lo studio dell'attività immunomodulatoria della vitD3 in DC umane è un filone di ricerca attivo nel nostro gruppo già da alcuni anni, e ci ha permesso di dimostrare effetti della 1,25(OH)2D3 sia sulla regolazione trascrizionale del differenziamento/attivazione delle DC, che sulla loro attività chemiotattica, entrambi importanti nell'indirizzarle verso la via tollerogena.

Nel prossimo triennio ci proponiamo di proseguire ed estendere questi studi, focalizzandoci su: i) studio della trasduzione del segnale e dei geni bersaglio della vitD3 in DC, ii) analisi delle interferenze e/o sinergie tra vitD3 e IFN di tipo I, iii) studio dell'attività immunomodulatoria e del metabolismo della vitD3 in DC ottenute da pazienti affetti da malattie immunomediate, quali la sclerosi multipla (SM) e la celiachia.

Risultati attesi nel triennio

Gli studi proposti contribuiranno alla caratterizzazione a livello molecolare dei meccanismi d'azione della 1,25(OH)2D3 in diversi modelli di DC (DC generate *in vitro* da monociti con diversi cocktail di citochine, e sottopopolazioni di DC circolanti nel sangue). In particolare, studieremo l'effetto dell'1,25(OH)2D3 su fattori trascrizionali, fattori solubili (citochine e chemochine) e molecole di superficie importanti per lo sviluppo e le funzioni delle DC, e nell'induzione di cellule T regolatorie. Studieremo inoltre le possibili interferenze e/o sinergie a livello molecolare tra vitD3 e IFN di tipo I, citochine pleiotropiche dotate anch'esse di importanti attività modulatorie sulle DC. L'IFN-beta è anche la principale opzione terapeutica nella SM, ma la relazione tra IFN di tipo I e vitD3 è stata finora poco studiata. L'estensione di questi studi a DC isolate da pazienti con SM riveste dunque una particolare importanza per la comprensione della rilevanza dell'attività immunomodulatoria e degli effettori del metabolismo della vitD3 nella patogenesi e/o nella terapia di questa malattia. Infine, poiché i pazienti con disturbi dell'assorbimento intestinale, come i celiaci, sono anche ad alto rischio di deficienza di vitD3, si può ipotizzare che questa carenza possa esacerbare lo stato infiammatorio iniziato dalla gliadina, l'agente eziologico della celiachia, anche attraverso le DC. Gli studi proposti contribuiranno alla verifica sperimentale di questa ipotesi.

Trasferibilità dei risultati

1,25(OH)2D3 e i suoi analoghi sono entrati di recente nella pratica clinica per il trattamento di malattie autoimmunitarie, come la psoriasi e l'iperparatiroidismo, e il loro potenziale terapeutico è in rapida espansione. Ad esempio, in pazienti con SM la sicurezza e la tollerabilità della vitamina D3 sono già state accertate in studi clinici pilota e nel prossimo futuro ne verrà sicuramente valutata anche l'efficacia terapeutica. Gli studi proposti amplieranno le conoscenze di base sui meccanismi attraverso i quali 1,25(OH)2D3 induce tolleranza immunitaria

modulando le funzioni delle DC, 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 due patologie immunomediate.

Biomarcatori nelle patologie immunomediate

Per molte malattie a patogenesi immunologica, in particolare le malattie autoimmuni, l'eziologia è sconosciuta e i meccanismi patogenetici non sono ad oggi completamente identificati. Inoltre la diagnosi di queste malattie può essere difficile perché i sintomi iniziali non sono specifici e non esistono dati di laboratorio caratteristici della malattia.

I progetti relativi al triennio 2009-2011 avranno come obiettivo principale quello di meglio caratterizzare i meccanismi patogenetici coinvolti nella disregolazione dell'omeostasi linfocitaria in patologie immunomediate con particolare riguardo alle malattie autoimmuni. A tal fine metodiche di biologia cellulare e molecolare verranno applicate per lo studio dell'apoptosi, della funzione timica e della proliferazione cellulare. Un particolare interesse verrà rivolto al ruolo che le differenze di genere svolgono nell'insorgenza e nel decorso di patologie autoimmuni. È infatti noto da anni che gli ormoni sessuali hanno un ruolo importante nel modulare la funzione del sistema immune. In particolare gli estrogeni sono in grado di influenzare la maturazione e la funzione delle diverse componenti del sistema immune. In questo ambito verranno condotti studi volti all'individuazione dei meccanismi cellulari e molecolari alla base delle differenze di genere nel decorso e severità delle malattie autoimmuni.

Risultati attesi nel triennio

Gli studi effettuati dovrebbero consentire di individuare nuovi marcatori che rendano conto delle differenze cliniche di gravità della malattia, da utilizzare sia a fini diagnostici che prognostici. In particolare i risultati attesi dovrebbero consentire l'individuazione nelle patologie oggetto di studio: i) dei principali fattori responsabili della alterata omeostasi linfocitaria; ii) di bioindicatori di malattia utilizzabili sia a fini diagnostici che prognostici e che rendano conto delle differenze di genere nell'insorgenza, decorso e risposta ai trattamenti terapeutici.

Trasferibilità dei risultati

L'insieme dei risultati ottenuti dovrebbe portare ad una migliore comprensione dei meccanismi patogenetici delle malattie oggetto di studio ed allo sviluppo di nuovi protocolli diagnostici e/o prognostici oltreché allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche basate sulle differenze di genere.

Biomarcatori prognostici e diagnostici nelle patologie polmonari e vascolari

Verranno studiate due patologie la Broncopneumopatia Cronico-Ostruttiva (BPCO) come patologia ad ampia diffusione (terza causa di ospedalizzazione) e una rara vasculopatia nota come sindrome di Kawasaki (SK). Sulla BPCO verrà effettuato uno studio clinico su 20 pazienti adulti BPCO. Ogni paziente verrà sottoposto ad esami clinici e a prelievi di sangue destinati ad uno studio *ex vivo* sull'individuazione di nuovi *biomarker* prognostici. I pazienti (divisi in fumatori e non) verranno sottoposti a terapia differenziata con Betametasona e Formoterolo + N-acetylcysteina. Collaborazione con Dipartimento Farm e Ospedale Forlanini. L'SK è una patologia pediatrica infiammatoria a carico dei vasi sanguigni con particolare coinvolgimento delle coronarie. L'eziologia di questa patologia è poco conosciuta e la diagnosi difficile. Obiettivo del progetto è la ricerca di biomarcatori di stress ossidativo nell'SK sia a fini diagnostici che prognostici. Verrà valutato lo stato ossidante/antiossidante, la presenza di

biomarcatori di senescenza/apoptosi e lo stato di attivazione di cellule immunocompetenti prima e dopo terapia farmacologia. In collaborazione con Dipartimento Farm.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi sono: i) valutazione dei parametri clinici generali prima e dopo terapia con farmaci antiossidanti (parametri reologici, funzionali ecc.); ii) valutazione dello stato di stress ossidativo mediante tecniche di risonanza di *spin* elettronico; iii) valutazione di parametri biologici cellulari, (nitrotirosine, marcatori di senescenza e apoptosi) e plasmatici *redox* (attività antiossidante, LDL ossidate) prima e dopo terapia con farmaci antiossidanti; e iv) *marker* di progressione della malattia con possibilità di impiego clinico.

Trasferibilità dei risultati

Grazie alla collaborazione con gli Ospedali Forlanini e Bambino Gesù di Roma i risultati della ricerca potranno essere immediatamente trasferiti a livello clinico.

Biomarcatori *redox* e meccanismi di *signaling* dipendenti da stress ossidativo nei tessuti

Nei tessuti, lo stress ossidativo modula i segnali intracellulari e determina la produzione di molecole segnale e nuovi livelli di radicali liberi. Un obiettivo del presente progetto è studiare i target preferenziali intra/extra cellulari modificati dai radicali costruendo, così, una “radicalomica” dei tessuti esposti a stress ossidativo. Verranno, inoltre, valutati i livelli biomarcatori innovativi correlati con i processi cellulari che portano alla produzione di radicali.

Il progetto si articolerà come segue:

- Identificazione dei siti bersaglio dei radicali nei tessuti. Verranno effettuati studi *ex vivo* su sangue normale o patologico utilizzando un composto non radicalico (*spintrap*) in grado di legarsi covalentemente con i radicali centrati sulle biomolecole diventando esso stesso un radicale rivelabile mediante Risonanza Paramagnetica Elettronica, spettroscopia di massa e anticorpi anti-*spintrap*.
- Meccanismi di *signaling* del monossido di carbonio (CO) nell'eritrocita. Il CO è un gas prodotto fisiologicamente nel catabolismo dell'eme con proprietà biologiche in parte simili all'ossido nitrico (NO). A differenza dell'NO, il CO non ha proprietà *redox* e costituisce quindi una molecola segnale specifica per le metalloproteine ma incapace di reagire con l'ossigeno e generare radicali. D'altra parte questa molecola, anche se chimicamente inerte, può indurre stress ossidativo.
- Biomarcatori innovativi nelle patologie degenerative. Verranno studiati i livelli di ADMA (dimetil arginina asimmetrica, inibitore della NO sintetasi endoteliale eNOS) e Apelina (attivatore della eNOS) nella patologia cardiovascolare primitiva e nelle complicanze cardiovascolari secondarie in collaborazione con l'Ospedale Umberto I di Roma.

Risultati attesi nel triennio

- Identificazione dei siti bersaglio dei radicali nei tessuti.
- Identificazione dei meccanismi di *signaling* indotti da CO nel sangue umano.
- Identificazione di ADMA e Apelina come biomarcatori innovativi nel sangue di pazienti con patologie cardiovascolari.

Trasferibilità dei risultati

Grazie alla collaborazione con l'Ospedale Umberto I di Roma i risultati della ricerca potranno essere trasferiti a livello clinico.

Caratterizzazione neurocomportamentale di modelli murini transgenici di sindromi di ritardo mentale: dall'alterazione nei geni al deficit sociale

I modelli animali costituiti da linee di topi con modificazioni genetiche possono essere un valido strumento nello studio della relazione genotipo-fenotipo in diversi disturbi del neurosviluppo, quali i disturbi dello spettro autistico (DSA). Nel progetto ci focalizzeremo sullo studio del fenotipo comportamentale di diversi modelli murini di DSA [topi BTBR T+tf/J, topi *knockout* per il recettore 1b della Vasopressina, topi *knockin* per il gene Neurologina 3, topi Mecp2-308], con un'analisi quantitativa e qualitativa delle vocalizzazioni nel tentativo di identificare alterazioni di natura comunicativa (secondo sintomo diagnostico dei pazienti DSA).

Risultati attesi nel triennio

Dati preliminari indicano che in topi BTBR T+tf/J neonati si riscontra un profilo di vocalizzazioni ultrasoniche alterato: BTBR T+ tf/J è una linea murina che mostra alterazioni del comportamento sociale e risposte comportamentali stereotipate e/o ripetitive in accordo con il primo e il terzo dei sintomi diagnostici dell'autismo. I topi neonati BTBR T+tf/J verranno confrontati con altre linee di topi *inbred* (C57BL/6J, FVB/NJ and 129/SvJ) utilizzando una innovativa analisi sonografica in cui le vocalizzazioni verranno suddivise in dieci diverse categorie secondo la loro forma. Ci attendiamo che le vocalizzazioni dei topi BTBR risultino più monotone e meno diversificate che nelle altre linee.

Analisi simili verranno condotte anche in topi *knockout* per il recettore 1b della Vasopressina e in topi *knock in* per la Neurologina 3: in entrambe le linee sono state identificate delle significative riduzioni del numero delle vocalizzazioni emesse in un contesto di isolamento sociale dalla madre e dai fratelli di nidata.

Trasferibilità dei risultati

L'identificazione di *marker* innovativi per l'identificazione di deficit di tipo sociale e comunicativo (es. vocalizzazioni ultrasoniche) appare particolarmente rilevante nel caso di DSA, poiché i deficit sociali e comunicativi sono sintomi chiave della malattia. Il nostro progetto rimane finalizzato alla identificazione di endofenotipi robusti da esportare in altri modelli murini di autismo e nella messa a punto di potenziali trattamenti farmacologici di rilevanza translazionale.

Coinvolgimento del virus di Epstein-Barr nella eziopatogenesi della sclerosi multipla: da "se" a "come"

Il progetto si propone di acquisire ulteriori informazioni sul ruolo del virus di Epstein-Barr nell'eziopatogenesi della sclerosi multipla attraverso un approccio multidisciplinare che coinvolge cinque gruppi di ricerca italiani e la Banca Inglese di Tessuti di sclerosi multipla presso l'*Imperial College* di Londra. È previsto uno studio integrato delle caratteristiche neuropatologiche e della presenza di cellule infettate con EBV in tessuto cerebrale *post-mortem* da pazienti con sclerosi multipla, dei livelli di mediatori dell'infiammazione nei corrispondenti *liquor* e delle caratteristiche funzionali di linee di cellule B infettate (ISS; *Imperial College*, Istituto Neurologico C. Mondino, Dipartimento Medicina Sperimentale Università Sapienza di Roma). Verranno inoltre analizzate la presenza di varianti del virus di Epstein-Barr e la risposta cellulare specifica per il virus nel sangue di pazienti con sclerosi multipla (Ospedale S. Andrea; IRCCS Fondazione S. Lucia).

Risultati attesi nel triennio

i) fornire ulteriori evidenze a favore del ruolo del virus di Epstein-Barr nella SM; ii) contribuire all'identificazione di nuovi marcatori di malattia e di risposta alla terapia.

Trasferibilità dei risultati

La comprensione dei meccanismi eziopatogenetici della SM e l'identificazione di nuovi marcatori di malattia avranno delle ricadute importanti nella pratica clinica, contribuendo allo sviluppo di nuove strategie diagnostiche e terapeutiche.

Controllo del ciclo cellulare

Questa linea di ricerca procederà in due direzioni, comprendenti tanto lo studio di meccanismi di base, quanto la loro applicazione terapeutica. Meccanismi di base: verrà investigata la natura dell'ostacolo, recentemente riconosciuto, che le cellule terminalmente differenziate incontrano a replicare in modo completo il proprio DNA, anche quando spinte al reingresso nel ciclo cellulare. Sarà indagata la struttura della cromatina nelle cellule terminalmente differenziate, con particolare riguardo a quelle muscolari scheletriche, l'ordine di attivazione delle origini di replicazione, e l'eventuale replicazione preferenziale di specifici *loci* genomici.

La recente scoperta che è possibile riattivare il ciclo mitotico in ogni tipo cellulare mediante la semplice rimozione di appropriati inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti (cdk) verrà altresì utilizzata in approcci terapeutici alla rigenerazione tissutale *in vivo*. Verranno inizialmente completati esperimenti volti a confermare che tale riattivazione è possibile anche *in vivo* in fibre muscolari scheletriche. Successivamente verrà indagata la possibilità di accelerare la riparazione del tessuto muscolare a seguito di danno, mediante iniezione di virus adeno-associati ricombinanti che veicolano shRNA contro specifici inibitori delle cdk.

Risultati attesi nel triennio

Pubblicazioni scientifiche.

Brevetti.

Potenziati applicazioni terapeutiche.

Trasferibilità dei risultati

È verosimile che alcune delle ricerche di questa linea producano approcci terapeutici utilizzabili nel medio termine. Tali approcci sarebbero in tal caso trasferiti all'SSN nel modo più opportuno nelle circostanze specifiche.

DC-ATLAS: uno strumento per integrare le vie di trasduzione del segnale e i circuiti regolatori coinvolti nell'attivazione delle cellule dendritiche

Questo progetto si inserisce nel Network di Eccellenza (NoE) Europeo "DC-THERA-Dendritic cells for Novel immunotherapies", finanziato nell'ambito del VI Programma Quadro su *Life Science, Genomics and Biotechnology for Health*. Il NoE DC-THERA ha lo scopo di integrare le attività di gruppi di ricerca di base e clinica, con l'obiettivo finale di trasferire le conoscenze di base sulla biologia delle cellule dendritiche (DC), ottenute con un approccio multidisciplinare, in protocolli clinici di immunoterapia del cancro e dell'infezione da HIV, basati sull'uso di DC. In questo contesto, l'iniziativa DC-ATLAS ha lo scopo di creare una banca dati, specifica delle DC, sulle vie di trasduzione del segnale e i circuiti regolatori coinvolti nell'attivazione di queste cellule.

Gli obiettivi principali del DC-ATLAS sono: i) creare un gruppo di ricerca interdisciplinare che include esperti in immunologia, bioinformatica e statistica; ii) definire la struttura, le connessioni e i circuiti regolatori delle vie di trasduzione del segnale; iii) sviluppare approcci di *systems biology* per l'analisi delle DC.

Il nostro contributo specifico riguarderà: i) la validazione delle vie di trasduzione del segnale attivate specificamente in DC dal recettore *Toll-like 3* oppure dall'interazione delle citochine

IFN-beta e IL-10 con i rispettivi recettori; ii) la rappresentazione grafica delle vie di trasduzione del segnale validate.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi dagli studi afferenti al DC-ATLAS riguarderanno la descrizione delle vie di trasduzione del segnale attivate in DC da RNA a doppia catena, IFNbeta e IL-10 mediante la creazione di un file di testo, una lista di geni e una rappresentazione grafica. Ogni via di trasduzione sarà descritta mediante tre diversi moduli, riguardanti: i) i processi legati all'interazione ligando/recettore, ii) l'attivazione di molecole specifiche deputate alla trasduzione del segnale, iii) i processi biologici attivati (produzione di citochine/chemochine, apoptosi, migrazione cellulare, differenziamento).

Trasferibilità dei risultati

Grazie all'attività di integrazione che è il principio fondante del NoE, i risultati ottenuti in uno sforzo congiunto con gli altri gruppi partecipanti, verranno inseriti all'interno del DC-ATLAS, che costituirà la prima banca dati pubblicamente disponibile delle vie di trasduzione del segnale innescate durante il processo di maturazione/attivazione delle DC. È atteso che questa banca dati fornirà informazioni importanti per una migliore comprensione della biologia delle DC e contribuirà all'individuazione di nuovi bersagli per lo sviluppo di immunoterapie più mirate ed efficaci.

Determinanti genetici e fattori modulatori nelle malattie neurodegenerative: modelli clinici e animali

La complessità dell'Alzheimer (AD) è data dalla sua natura multifattoriale, attribuibile, non solo alla presenza di più geni causali ma anche all'interazione con fattori metabolici e ambientali. È importante la ricerca di “nuovi fattori di suscettibilità” probabilmente capaci di modulare l'insorgenza e la progressione del fenotipo patologico. Studi di associazione sull'AD hanno evidenziato come SNP rilevati in diversi geni coinvolti nel metabolismo del colesterolo, nel metabolismo dell'A o in altre proteine possano costituire ulteriori fattori di rischio. Un esiguo numero di studi hanno dimostrato l'interazione tra rischio, fattori genetici, biochimici e ambientali nel predisporre un individuo allo sviluppo di demenza. I nostri obiettivi sono:

- delineare uno specifico profilo di rischio per gli AD per comprendere la rete di interazioni metaboliche che regolano l'insorgenza e l'evoluzione della demenza al fine di ritardare l'esordio della malattia;
- identificare i differenti profili genetici con maggiore efficacia di risposta nella terapia con inibitori AchE;
- realizzare studi caso-controllo sugli AD per stabilire il contributo di SNP presenti in diversi geni, in associazione con altri fattori di rischio biochimici e ambientali;
- verificare l'esistenza di un'associazione tra SNP e fenotipi patologici;
- studiare se la risposta ai farmaci inibitori dell'ACHe possa essere modulata da SNP presenti sui geni coinvolti nel metabolismo dei farmaci.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto offre l'opportunità di ampliare le conoscenze scientifiche relative ai fattori di rischio delle demenze e al ruolo che varianti del DNA possono giocare sull'efficacia dei farmaci inibitori dell'ACHe. Lo studio potrebbe consentire l'identificazione di differenti profili genetici utili per l'elaborazione di target farmacologici mirati ad una terapia individuale con conseguente beneficio non solo per i pazienti ma anche per il sistema erogatore. Infatti, l'incremento delle conoscenze, nell'ambito delle demenze, consentirà all'SSN di attuare una programmazione sanitaria più aderente alle necessità del territorio.

Trasferibilità dei risultati

La trasferibilità dei risultati è da intendersi per i soggetti affetti e le loro famiglie, l'SSN, la comunità scientifica nazionale e internazionale, le agenzie regolatorie dell'industria farmaceutica e le aziende farmaceutiche. I dati che scaturiranno potranno essere inseriti sul sito dell'ISS (www.epicentro.iss.it). I risultati verranno trasferiti ad altri ricercatori o ad operatori dell'SSN, attraverso monografie e note tecniche. I risultati generali che riguardano le patologie, le cause, i meccanismi coinvolti e le implicazioni cliniche saranno oggetto di pubblicazioni su riviste nazionali e internazionali o di comunicazione a congressi. Infine, questo progetto collaborativo, coinvolgendo istituzioni scientifiche di differenti regioni, ma anche un'Associazione del terzo settore, testimonia il forte carattere di integrazione della ricerca scientifica e del suo alto valore sociale ed educativo.

Diagnosi precoce della malattia di Alzheimer mediante integrazione e correlazione di *biomarker* molecolari, funzionali e clinici

Lo sviluppo di nuovi protocolli per l'identificazione precoce dei soggetti colpiti da AD è essenziale per la corretta applicazione dei protocolli di trattamento e assistenza. È importante la definizione dei criteri per l'identificazione di pazienti con compromissione cognitiva lieve (*Mild Cognitive Impairment*: MCI), rispetto ai soggetti che svilupperanno la malattia di Alzheimer (AD) conclamata. Il nostro scopo è di definire meglio questo fenotipo patologico mediante lo studio approfondito di aspetti molecolari, funzionali, clinici in un ristretto gruppo di pazienti con MCI e AD, rispetto ad un gruppo di soggetti con diagnosi di malattia di Creutzfeldt-Jakob: una demenza trasmissibile a rapida progressione; tale confronto ci permetterà di valutare la specificità delle informazioni raccolte. In particolare, ci proponiamo di definire in questi pazienti dei *pattern* qualitativi e quantitativi di espressione genica e proteica mediante analisi a livello trascrizionale e spettrometria di massa del siero. L'analisi genomica e proteomica verrà integrata con analisi di marcatori biochimici dello stress ossidativo utili alla definizione di profili di suscettibilità individuale all'insorgenza dell'AD. I dati strumentali e clinici saranno integrati e analizzati mediante algoritmi matematici che consentiranno di tracciare un identikit caratteristico e specifico per l'identificazione precoce dei soggetti che andranno incontro a demenza di Alzheimer.

Risultati attesi nel triennio

- Identificazione di *pattern* di espressione genica delle popolazioni linfocitarie di pazienti con MCI e AD.
- Identificazione di marcatori biochimici utili alla definizione di profili di suscettibilità individuale all'insorgenza della AD.
- Identificazione di *pattern* sieroproteomici di pazienti con MCI, AD e CJD.
- Definizione di *pattern* diagnostici della AD e *pattern* predittivi dell'evoluzione della malattia e della risposta alla terapia derivanti dalla integrazione di dati genetici, biochimici, proteomici, funzionali e clinici.
- Miglioramento della diagnosi preclinica e precoce di demenza neurodegenerativa tipo Alzheimer e della diagnostica differenziale della malattia di Alzheimer.
- Affinamento della specificità e sensibilità diagnostica di pazienti con sospetto di CJD.

Trasferibilità dei risultati

I risultati che ci proponiamo di ottenere con questo progetto potranno contribuire allo sviluppo delle metodiche diagnostiche cliniche e di laboratorio per l'inquadramento diagnostico precoce dei soggetti che svilupperanno la malattia di Alzheimer permettendo in tal modo sia un tempestivo intervento farmacologico che una consulenza genetica e psicologica adeguata. Questo porterà degli indubbi vantaggi in termini di miglioramento della prestazione sanitaria

offerta al paziente e ai suoi familiari e un apprezzabile riduzione dei costi per l'SSN. Gli studi proposti potranno inoltre permettere sia di valutare l'efficacia terapeutica di nuove molecole che di identificare nuovi bersagli terapeutici attraverso una migliore comprensione dei meccanismi di patogenesi. La possibilità di identificare i soggetti con CJD in fase precoce permetterà inoltre di ridurre il rischio di trasmissione iatrogena della CJD.

Disegni adattativi: metodi statistici innovativi per il disegno e la valutazione dei *trial* clinici

I disegni adattativi (a volte chiamati anche disegni flessibili) consentono di apportare una serie di modificazioni in un *trial* clinico in corso, pur controllando i livelli di probabilità di errore di I e II tipo fissati nella fase di disegno del *trial*. Rispetto a un disegno tradizionale in cui la numerosità campionaria viene fissata in partenza e la valutazione viene condotta quando tutti i pazienti sono stati arruolati e valutati, in un disegno flessibile i dati accumulati nel corso del *trial* vengono monitorati in momenti predefiniti e sono essi a determinare importanti decisioni sul futuro corso del *trial*.

I principi e le metodologie statistiche coinvolti nei disegni adattativi saranno studiati in dettaglio al fine di far emergere vantaggi e svantaggi che potrebbero condizionare il loro impiego nella sperimentazione clinica sui farmaci. In particolare il processo di implementazione di un disegno adattativo sarà analizzato nelle fasi di pianificazione, di simulazione e di esecuzione.

Nella fase della pianificazione è compresa la revisione del piano clinico, l'identificazione dei requisiti del protocollo sperimentale e la progettazione del piano sperimentale che risponde nella maniera più efficiente agli obiettivi della sperimentazione. Nella fase della simulazione, utilizzando dati simulati per una serie di scenari, vengono confrontate diverse opzioni per il disegno, e sulla base delle loro caratteristiche operative vengono definiti i parametri del disegno. La fase esecutiva comprende la definizione del protocollo, la costruzione delle carte di controllo che saranno utilizzate dalla *Data Monitoring Committee*, e la conduzione delle analisi *ad interim* con gli aggiustamenti prescelti.

Risultati attesi nel triennio

Sulla base degli studi condotti nell'ambito di questo progetto saranno definiti i concetti probabilistici e gli strumenti metodologici necessari per l'implementazione dei disegni adattativi nelle sperimentazioni cliniche sui farmaci. L'analisi delle diverse problematiche teorico-pratiche porterà a definire delle raccomandazioni che potranno essere utili per la stesura di linee guida per l'utilizzo dei disegni adattativi.

Il progetto definirà gli strumenti statistico-metodologici di supporto alle decisioni relative ai possibili cambiamenti del disegno nel corso del *trial*.

La maggiore accettazione e utilizzazione dei disegni adattativi riguarda in gran parte la gestione del cambiamento. Non solo un cambiamento nella metodologia statistica ma anche nel supporto logistico e soprattutto nel modo in cui gli studi vengono condotti. I risultati attesi da questo progetto consentiranno di identificare le barriere all'implementazione e trovare strategie e tecnologie per superarle.

Trasferibilità dei risultati

L'applicazione dei disegni adattativi nel processo di sviluppo di un farmaco in generale, o in singole sperimentazioni no profit, soprattutto nell'ambito delle malattie rare, potrebbe portare al raggiungimento di risultati in tempi più rapidi rispetto a quanto avviene con i disegni sperimentali classici. Sul profilo etico un disegno adattativo può contribuire all'ottimizzazione dell'impiego dei pazienti, garantendo ad ogni paziente il trattamento migliore sulla base delle conoscenze accumulate fino al momento dell'arruolamento del paziente nel *trial*.

Diversi metodi adattativi sono oggi disponibili, ma la loro implementazione è limitata dalla complessità delle metodologie statistiche e dalla trasferibilità delle conoscenze teoriche su un piano pratico-organizzativo. I risultati raggiunti in questo progetto potranno trovare applicazione soprattutto nella pianificazione e nella conduzione di trial clinici su patologie rare in cui il numero dei pazienti disponibili rappresenta un limite alle sperimentazioni cliniche condotte con approccio tradizionale, ma la loro utilità investirà anche il campo delle malattie non rare.

Early life-based animal models of depressive disorders at a crossroad: paving the way for a therapy or perpetrating ill-defined experimental protocols?

Il presente progetto ha come scopo quello di analizzare criticamente i modelli sperimentali attualmente in uso nello studio della depressione e proporre uno in grado di colmare le maggiori lacune. La depressione, patologia caratterizzata da umore depresso, sentimenti di auto-svalutazione e disturbi neurovegetativi, dipende sia da cause genetiche (polimorfismo del gene che codifica per il trasportatore della serotonina) sia da cause ambientali (tre o più eventi fortemente stressanti come, ad esempio, l'abbandono del partner, la perdita del posto di lavoro o l'insorgenza di altre patologie). Nonostante queste conoscenze, gli attuali modelli sperimentali di depressione prendono in considerazione solamente uno dei due fattori. Risultano invece assenti modelli sperimentali in cui sia la predisposizione biologica sia quella ambientale facciano parte del disegno sperimentale. Questo progetto ambisce a colmare tale lacuna tramite l'elaborazione di un modello animale in cui la predisposizione biologica (indotta tramite la somministrazione di una dieta priva di triptofano, l'unico aminoacido precursore della serotonina) e la componente ambientale (stress neonatale indotto tramite la somministrazione di corticosterone, l'ormone dello stress) contribuiscano all'insorgenza di sintomi isomorfi alla depressione nei topi di laboratorio.

Risultati attesi nel triennio

Induzione, in topi di laboratorio, di alterazioni comportamentali e neuro-endocrine analoghe alla depressione umana tramite la somministrazione combinata di una dieta priva di triptofano e di dosi elevate di corticosterone tramite il latte materno. In particolare, ci si propone di dimostrare come questo trattamento combinato sia in grado di indurre disturbi neuro-endocrini (concentrazioni plasmatiche di corticosterone; livelli cerebrali di neurotrasmettitori come la serotonina e la dopamina; neurotrofine) e comportamentali (ridotta motivazione nei confronti di stimoli incentivanti; ridotta attività locomotoria; aumentata ansia) analoghi alla depressione umana. Inoltre, come obiettivo secondario, ci si propone di dimostrare come queste osservazioni siano valide in individui e contesti sperimentali diversi (topi di ceppi diversi cresciuti in condizioni di stabulazione differenti). Questo fine ha lo scopo di garantire la possibilità di condurre analoghi esperimenti in strutture diverse (in particolare, altri laboratori di ricerca e industrie farmaceutiche).

Trasferibilità dei risultati

Alla luce della sua natura applicativa, il presente progetto ambisce a fornire alla comunità scientifica uno strumento validato sul quale verificare l'efficacia di nuovi farmaci antidepressivi durante la fase pre-clinica della ricerca. In quest'ottica, i risultati ottenuti potranno essere utilizzati sia da ricercatori di base sia da industrie farmaceutiche coinvolte nello sviluppo di nuovi farmaci antidepressivi tramite l'utilizzo di modelli sperimentali.

ECRIN-PPI – WP 4: GMP facilities for biotherapy

L'attività di seguito descritta si riferisce al *Working Package* (WP) 4 “*GMP facilities for biotherapy*” del progetto di fase preparatoria (ECRIN-PPI) dell'infrastruttura europea ECRIN per gli studi clinici, in grado di fornire servizi integrati per la ricerca clinica multinazionale a ricercatori e sponsor in studi clinici multinazionali.

Nel contesto di ECRIN-PPI, l'ISS ha assunto, in qualità di partner per l'Italia, la responsabilità del WP 4 che, in stretto coordinamento con il progetto di infrastruttura europea per la ricerca traslazionale EATRIS, ha come obiettivi principali: i) la definizione delle risorse esistenti e delle esigenze non ancora soddisfatte in termini di officine in grado di produrre lotti clinici di biofarmaci in conformità alle *Good Manufacturing Practice* (GMP); ii) la decisione riguardo alla connessione delle officine esistenti o alla costruzione di nuove officine sotto l'ombrello di ECRIN o EATRIS.

Tale attività nasce dalla consapevolezza che l'accesso ad officine di produzione di biofarmaci per uso clinico in conformità alle GMP rappresenta spesso un collo di bottiglia per le istituzioni accademiche e per piccole-medie imprese nel settore delle biotecnologie. In particolare, esiste una chiara necessità di officine GMP accademiche in grado di fornire, in un contesto non commerciale, piccole quantità di biofarmaci per studi clinici di fase I-II *proof of concept*.

Risultati attesi nel triennio

L'attività del WP 4 prevede l'esecuzione di un censimento delle officine per la produzione di biofarmaci esistenti in Europa, e di un'indagine conoscitiva ad ampio raggio per identificare le attuali esigenze in Europa, sia delle istituzioni accademiche sia delle PMI biotecnologiche, riguardo all'accesso a tali officine. Sulla base dei risultati del censimento, verrà quindi presa la decisione riguardo alla connessione delle officine GMP esistenti a ECRIN o a EATRIS. Ad EATRIS verranno collegate le officine di produzione di quei biofarmaci che possono essere utilizzati anche in centri clinici distanti e che sono di interesse per il cancro, le malattie neurodegenerative, metaboliche, cardiovascolari e infettive; ECRIN sarà collegata alle officine di produzione dei restanti biofarmaci e il cui uso clinico richiede una prossimità del sito di produzione e del centro clinico (principalmente farmaci basati su cellule). Riguardo alla costruzione di nuove officine GMP, verrà effettuata una valutazione dei costi di costruzione, di mantenimento in operatività, e una stima dei possibili profitti; la strategia di costruzione di nuove officine verrà quindi comparata a quella dell'approvvigionamento esterno presso le officine commerciali. I risultati di tali analisi consentiranno la formulazione di una proposta riguardo: i) alla costruzione di nuove officine GMP, e ii) alla costituzione di una rete di officine, che eviti duplicazioni e garantisca la copertura delle esigenze degli utenti.

Trasferibilità dei risultati

I risultati prodotti consentiranno la compilazione di un inventario delle officine GMP che in Europa producono biofarmaci. Tale inventario rappresenterà una fonte preziosa di informazioni per i centri di ricerca traslazionale, per i centri di ricerca clinica, e per PMI del settore delle biotecnologie.

Inoltre, i risultati contribuiranno alla definizione di un migliore utilizzo delle risorse esistenti in Europa, in termini di officine GMP per la produzione di biofarmaci, e alla individuazione di nuove officine che colmino i vuoti che emergeranno dai risultati delle attività sopra descritte.

Effetti dell'Olio di semi di Canapa sul rapporto tra omega-3 e omega-6 nelle membrane cellulari e sul profilo infiammatorio in pazienti con Ipercolesterolemia Familiare Eterozigote con o senza trattamento di LDL aferesi verso soggetti normolipidemic

L'olio di semi di canapa (OC) è un alimento che si ricava per spremitura a freddo dei frutti della pianta di canapa, ossia *Cannabis Sativa* L. L'OC è particolarmente ricco di acidi grassi essenziali (AGE) polinsaturi della famiglia omega. È noto che nelle società occidentali è ormai diffuso il consumo degli AGE. Molti aspetti relativi alle predette molecole nutritive risultano peraltro essere ancora non ben definiti e la ricerca sull'argomento è ancora in continuo sviluppo. L'OC contiene componenti attivi come gli AGE omega-6 ($\Omega 6$) e omega 3 ($\Omega 3$), con rapporto ottimale tra loro 3 a 1, rispettivamente. Benché molto è noto sulle proprietà degli AGE poco è noto dell'uso di OC nella alimentazione umana e il suo impatto sul rischio di malattia cardiovascolare. Lo scopo principale di tale studio è di valutare se la integrazione alimentare con l'OC può modificare il *pattern* degli acidi grassi plasmatici e se possa influenzare il rapporto tra gli AGE delle membrane cellulari, nonché indurre variazioni dei parametri relativi al profilo infiammatorio.

Lo studio è svolto in collaborazione con l'Università Sapienza di Roma su soggetti normolipidemi, dislipidemic e dislipidemic in terapia di aferesi.

Risultati attesi nel triennio

L'obiettivo è di valutare se e quale effetto ha l'integrazione dietetica con olio di canapa sul *pattern* di acidi grassi di membrana, sul profilo lipoproteico e sull'assetto delle citochine circolanti e dei parametri dell'infiammazione sistemica in soggetti sia normolipidemic che dislipidemic.

Trasferibilità dei risultati

L'uso dell'olio di canapa quale supplemento alimentare è già in uso, ma senza adeguate conoscenze. Tale studio contribuisce a definire se e quali possono essere i vantaggi normo- e dis-lipidemic di un uso alimentare e/o terapeutico dell'olio di canapa.

EU COST Action Neurinfnet "Inflammation in Brain Disease"

La COST Action *Neurinfnet*, comprende gruppi di ricerca interessati allo studio delle componenti infiammatorie e degenerative di patologie neurologiche croniche, quali la sclerosi multipla e la malattia di Alzheimer. NEURINFNET organizza workshop, scuole e corsi educativi e sostiene la mobilità di giovani ricercatori per promuovere la collaborazione scientifica e la crescita culturale e tecnologica a livello europeo, con l'intento di accelerare lo sviluppo di nuovi strumenti terapeutici per le malattie neurodegenerative.

Risultati attesi nel triennio

Creare una rete di esperti europei con lo scopo di avviare studi mirati a sviluppare nuovi reagenti, tecnologie innovative e un approccio multidisciplinare alla ricerca sulle malattie neurologiche.

Trasferibilità dei risultati

Integrazione delle risorse umane e tecnologiche, avanzamento delle conoscenze e migliori prospettive per lo sviluppo di terapie.

Eventi molecolari e cellulari associati ai processi di neurodegenerazione: Interazione funzionale tra geni coinvolti nella malattia di Alzheimer, stress ossidativo, e morte cellulare programmata

La malattia di Alzheimer (AD) si presenta in due forme cliniche, infatti, accanto ad una forma familiare ad esordio precoce, caratterizzata da mutazioni in alcuni geni noti quali l'APP (proteina precursore della β -amiloide) e la Presenilina 1 e 2 (PS1 e PS2), è ben nota una forma sporadica di AD, preponderante nei numeri, ad esordio tardivo. I cambiamenti neuropatologici che accompagnano l'evoluzione delle due forme di AD presentano diversi aspetti comuni, che forse sottendono percorsi patologici condivisi. Recentemente si è discusso sul ruolo che le preseniline potrebbero svolgere attraverso interazioni molecolari con le vie di regolazione del metabolismo ossido riduttivo e l'apoptosi. Scopo del progetto è quello di ampliare le conoscenze alla base della regolazione del processo di morte cellulare neuronale, e di applicare le informazioni ottenute alla comprensione dell'AD mediante l'utilizzo di linee cellulari stabilizzate umane e linee primarie murine ottenute da animali transgenici con mutazione sul gene della PS1 (Tg PSEN1 Δ 9) perseguendo i seguenti obiettivi:

- Stabilire la relazione tra danno cellulare e profili di espressione di alcuni geni coinvolti nella AD.
- Stabilire le alterazioni morfologiche e biochimiche alla base dei processi di morte cellulare.
- Interferire sulle precedenti dinamiche sia mediante “silenzamento genico”, che principi chimici con attività nota (es. antiossidanti) e principi “naturali” derivanti dalla medicina tradizionale, noti per avere effetti migliorativi sul deficit cognitivo.

Risultati attesi nel triennio

Questo progetto intende acquisire maggiori informazioni in merito alle alterazioni cellulari innescate da stimoli di tipo neurodegenerativo, e di procedere alla ricerca di eventuali modificazioni molecolari e correlate e quindi allo sviluppo di nuovi approcci terapeutici. Il progetto, attraverso uno studio multidisciplinare indagherà sulla patologia subcellulare indotta da determinati stimoli pro-neurodegenerativi, e sulla possibilità di rallentare/interferire su tali processi mediante diverse strategie farmacologiche. L'uso di linee cellulari stabilizzate umane e linee primarie murine provenienti da animali transgenici per alcune mutazioni dell'AD, ci consentirà di verificare *in vitro*, la rilevanza terapeutica dei trattamenti potenzialmente protettivi, in relazione alle diverse vie metabolicamente alterate prese in esame (stress ossidativo, apoptosi). L'uso dell'animale transgenico, invece, ci consentirà *in vivo*, attraverso test neurocomportamentali, la verifica dell'efficacia terapeutica dei trattamenti individuati sui deficit cognitivi e dell'apprendimento.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto si propone di ampliare le conoscenze che sono alla base della regolazione del processo di morte neuronale associato alla neurodegenerazione. L'obiettivo che ci si propone è lo sviluppo di modelli cellulari e animali adeguati, che consentano lo studio delle malattie neurodegenerative, in particolare della malattia di Alzheimer, ove si osserva una regolazione alterata del processo di morte cellulare, per tradurre le conoscenze acquisite dalla ricerca di base alla pratica clinica dell'AD e quindi con eventuale beneficio nel trattamento di questa devastante patologia neurodegenerativa.

Funzioni mitocondriali e loro ruolo nella determinazione dello stato di attivazione microgliale

Il presente progetto costituisce il proseguimento di uno studio intrapreso lo scorso triennio (2006-2009) dal titolo “Ruolo della fisiopatologia mitocondriale nelle malattie neurologiche a base infiammatoria e degenerativa”. In base alla recente letteratura sembra che segnali prodotti dai mitocondri, fra i quali i radicali liberi (ROS), possano condizionare la scelta da parte delle cellule di tipo microgliale/macrofagico verso un fenotipo anti- piuttosto che pro-infiammatorio. Da ciò si desume l'importanza dello studio dei processi che hanno sede nei mitocondri della microglia, in considerazione dell'ormai acclarato ruolo di questo tipo cellulare sia nei processi infiammatori che nel controllo e nel recupero dell'omeostasi tissutale nelle patologie neurodegenerative. In particolare, nel precedente triennio abbiamo studiato parametri mitocondriali quali concentrazione di Ca^{2+} e potenziale di membrana (mPM), data la loro correlazione con la produzione di ROS. Brevemente, i mitocondri in microglia a riposo sono caratterizzati da un mPM fortemente iperpolarizzato ma, a differenza delle altre cellule cerebrali analizzate (oligodendrociti e astrociti), sono solo parzialmente capaci di accumulare Ca^{2+} . Data l'importanza del Ca^{2+} nella regolazione della fisiologia mitocondriale, il prosieguo dello studio mirerà alla comprensione dei meccanismi che regolano il Ca^{2+} e la produzione di ROS da parte dei mitocondri nei diversi fenotipi microgliali.

Risultati attesi nel triennio

Si intendono studiare i seguenti aspetti:

- le modalità attraverso le quali viene regolato l'ingresso del Ca^{2+} nella matrice mitocondriale. In particolare verranno studiati i meccanismi di controllo dell'apertura del canale denominato VDAC, al quale si attribuisce la permeabilità, al Ca^{2+} oltre che a diversi metaboliti, della membrana mitocondriale esterna. L'apertura di tale canale è legata alla scelta cellulare fra metabolismo glicolitico ed ossidativo, e sembra condizionare, attraverso il controllo della disponibilità dei substrati, l'attività mitocondriale nel suo complesso.
- la correlazione fra eventi/parametri mitocondriali e l'acquisizione dei diversi stati di attivazione. A questo scopo si utilizzeranno molecole capaci di indurre specifici stati funzionali, in corrispondenza dei quali verranno analizzate le funzioni mitocondriali di interesse. A sua volta, funzioni microgliali proprie dei vari stati di attivazione verranno valutate con le opportune tecniche sperimentali e ne verrà valutata la relazione con funzioni mitocondriali specifiche.
- l'espressione e la funzione della proteina UCP2. La proteina *Un-Coupling Protein 2* (UCP2), presente nella membrana mitocondriale interna, 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.

Trasferibilità dei risultati

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, ed in ultima analisi all'identificazione degli adeguati interventi terapeutici.

Gli RNA interferenti come strumento per l'analisi della funzione genica e la manipolazione della risposta immunitaria: dalla ricerca di base allo sviluppo di strategie terapeutiche

Questa ricerca si propone di sfruttare la capacità degli RNA interferenti di “silenziare” l'espressione genica in maniera specifica per generare cellule dendritiche (DC) più efficaci nell'indurre e mantenere una risposta immunitaria protettiva o immunità terapeutica in diverse patologie umane. Per raggiungere tale obiettivo, i geni candidati al “silenziamento” sono stati selezionati sulla base della nostra ipotesi di lavoro che alterando l'espressione di geni coinvolti nei processi che portano alla tolleranza immunologica (IL-10R1, STAT-3, ILT3 and ILT4) si potrebbero generare DC capaci di stimolare una risposta immunitaria più efficace verso i tumori, mentre bloccando geni coinvolti nell'immunostimolazione (IFN-beta, CD40, CD86, TLR4) si potrebbero ottenere DC tollerogeniche capaci di inibire risposte immunitarie eccessive e deleterie, caratteristiche di malattie infiammatorie croniche e autoimmuni.

Il progetto sarà articolato nei seguenti obiettivi:

- Ottimizzazione di sistemi di espressione degli RNA interferenti in cellule primarie (DC e monociti). In particolare saranno utilizzati sia RNA interferenti chimicamente sintetizzati e trasfettati transientemente, sia quelli espressi endogenamente mediante l'infezione delle cellule primarie con appropriati vettori lentivirali contenenti cassette di espressione degli RNA interferenti;
- Valutazione delle conseguenze fenotipiche e funzionali del silenziamento;
- Valutazione delle capacità delle DC “silenziate” per l'espressione di geni coinvolti nell'induzione di tolleranza immunologica di processare e presentare antigeni associati a tumori e indurre risposte di cellule T effettrici verso questi antigeni.
- Valutazione delle capacità delle DC “silenziate” per l'espressione di geni coinvolti nell'immunostimolazione di attenuare la risposta infiammatoria ed indurre risposte T di tipo regolatorio.

Risultati attesi nel triennio

I risultati ottenuti nell'ambito di questo progetto potrebbero fornire informazioni importanti sulla biologia delle DC, in particolare sulle proprietà fenotipiche e funzionali acquisite da queste cellule a seguito dell'inattivazione di geni specifici. Questi studi contribuiranno inoltre alla ottimizzazione delle condizioni sperimentali per il *delivery* temporaneo o stabile degli RNA interferenti nelle DC, rilevanti per la generazione di DC geneticamente modificate. Collettivamente, i risultati ottenuti consentiranno di stabilire se interventi mirati atti a rompere la tolleranza immunologica possono migliorare la sorveglianza immunologica ai tumori, mentre quelli mirati a ridurre il potenziale immunostimolatorio possono controllare risposte immuni eccessive e deleterie.

Trasferibilità dei risultati

A lungo termine, questi risultati potrebbero fornire informazioni utili per la generazione di nuovi tipi di DC, più efficienti nell'indurre una risposta immunitaria nei pazienti malati di cancro, oppure in grado di ridurre risposte eccessive e deleterie in pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche o autoimmuni, permettendo così di trasferire un approccio di ricerca di base in nuove prospettive cliniche.

Identificazione di parametri biochimici di stress ossidativo e di indici della suscettibilità individuale danno ossidativo in malattie neurodegenerative

Lo scopo della ricerca è di identificare biomarcatori utili alla definizione del fenotipo patologico di soggetti affetti da malattie neurodegenerative quali malattia di Alzheimer (MA) e

di Creutzfeldt-Jakob (MCJ). In particolare il nostro interesse è centrato sull'analisi di marcatori biochimici dello stress ossidativo, utili alla definizione di profili di suscettibilità individuale all'insorgenza della demenza. Lo stress ossidativo è infatti considerato uno dei maggiori fattori coinvolti nei processi neurodegenerativi alla base delle demenze. Questi indicatori, integrati con altre informazioni, in particolare con il *pattern* di espressione genica, possono contribuire alla definizione del fenotipo individuale e essere predittivi del decorso della malattia. Come indice delle capacità individuali di contrastare eventi patologici di tipo infiammatorio o ossidativo verrà misurata la capacità antiossidante plasmatica, risultante dal contributo di ciascuna specie anti-ossidante idrosolubile e liposolubile presente nel plasma. In studi precedenti abbiamo dimostrato che nei soggetti affetti da MA questo indice è diminuito e correlato al tempo sopravvivenza dei soggetti (Minghetti, *et al. J Neuroinflammation*, 2006). In parallelo, intendiamo valutare i livelli di F2-isoprostano, un *marker* di perossidazione lipidica utilizzato in nostri studi precedenti (Minghetti, *et al. J Neuropathol Exp Neurol*, 2000), e di 8-OHdG, un *marker* di ossidazione a carico del DNA.

Risultati attesi nel triennio

Gli studi saranno condotti in collaborazione con altri gruppi di ricerca e clinici, al fine di arruolare un numero sufficiente di soggetti affetti da MA e MCJ e di confrontare i dati biochimici con altri parametri analitici quali *pattern* di espressione genica e presenza di particolari polimorfismi, e con le caratteristiche cliniche dei soggetti. I risultati attesi sono la caratterizzazione dei soggetti dal punto di vista della suscettibilità al danno ossidativo per una migliore comprensione del ruolo delle difese anti-ossidanti nella progressione della malattia.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questo progetto potrebbero contribuire allo sviluppo delle metodiche cliniche e di laboratorio utili per l'inquadramento diagnostico precoce dei soggetti affetti da MA o MCJ.

Tale quadro diagnostico renderebbe possibile un intervento farmacologico mirato alle caratteristiche del soggetto, con miglioramenti nella gestione della malattia e possibili ricadute positive sull'SSN. La disponibilità di indicatori biochimici potrebbe inoltre permettere di valutare l'efficacia terapeutica trattamenti mirati al contenimento del danno ossidativo.

Il comportamento del cane come chiave di lettura del mondo non umano: presupposti per un dialogo darwiniano tra specie diverse

In questo complicato Terzo Millennio i rapporti tra le famiglie italiane che ospitano cani si è fatto complesso, per l'evoluzione socioantropologica delle unità sociali italiane, particolarmente per i piccoli nuclei familiari, spesso composti da un unico individuo, che vivono in area urbana. Il progetto si propone di far riflettere su alcuni principi basilari di etologia applicata insegnanti, studenti e famiglie, e consisterà nell'illustrare i principi basilari dell'evoluzione, tramite selezione artificiale (evento multiplo occorso circa 14.000 anni fa a partire dal gruppo ancestrale), e riguarderà sia le caratteristiche morfologiche e funzionali (selezione per taglie, forme e colori del pelo diverse, muscolatura e dentatura), sia, soprattutto, per le caratteristiche etologiche comportamentali, quali le prestazioni di caccia e di raccolta della preda, quelle di custodia delle proprietà, di ausilio nell'allevamento e nel pascolo del bestiame, ecc. In particolare: i) in base a dati scientifici recenti (Hare, *et al.* 2002; Hare e Tomasello, 2005), saranno sottolineate le peculiarità del *mind-reading* reciproco tra specie umana e specie animale, quel sottile canale semantico che permette al cane, lupo addomesticato, di interpretare gli stati emotivi umani, riuscendo, almeno nel caso del partner affettivo umano principale, a modificarli; ii) a partire da queste nozioni, si rifletterà sulla genetica del cane, per sottolineare i principi bioevolutivi fondamentali, in un'ottica che esalti tanto la genetica mendeliana e non mendeliana, quanto il ruolo avuto dal cane nel pensiero di Carlo Darwin. I dati saranno evinti

dal volume “Variazione degli animali e delle piante allo stato domestico” (Darwin, 1876) e si trarrà occasione per rientrare negli argomenti celebrativi del secondo centenario della nascita, che, augurabilmente, fungerà da perno per molte delle iniziative afferenti alla Legge 6/2000 per l’anno in corso; iii) scopo dichiarato sarà quello di permettere una migliore comprensione del comportamento canino, utilizzando la naturale curiosità di molti cittadini italiani per questa specie, al fine di provvedere gli utenti a cui è rivolto il progetto con alcuni elementi basilari di igiene mentale canina, per diminuire il grave stato di malessere che alcuni soggetti animali soffrono in questi anni. È noto infatti come (si rimanda al sito NeCo: <http://www.iss.it/neco>), soprattutto in aree urbane, i cani padronali siano soggetti a patologie da stress (principalmente da stress da separazione), e il fornire indicazioni sui principali sintomi indicativi del malessere canino appare un’opera eticamente rilevante; iv) in Italia si contano circa 700 eventi di morsicature canine, e purtroppo ogni anno si contano alcuni eventi fatali. Scopo precipuamente socio-sanitario di questo progetto è quello di diminuire questi eventi pericolosi, che vedono bambini, ma anche anziani, come vittime selettive di morsicature gravi e spesso deturpanti. Le stime nazionali rappresentano notoriamente una sottostima, trattandosi della maggioranza dei casi di morsicature avvenute in ambito familiare, o da cani di conoscenti.

Il progetto si articolerà in 12 conferenze/seminario svolte presso scuole, l’ISS e l’Istituto di Scienza e Tecnologia della Comunicazione (area Bioparco di Roma). Le scuole saranno selezionate da un comitato composto da esperti degli enti altrove indicati nel progetto e saranno distribuite quanto più omogeneamente sul territorio nazionale. Apposite linee guida saranno messe in rete all’interno del succitato sito. La loro disponibilità telematica sarà diffusa mediante l’utilizzo di mailing list dedicate, già utilizzate per analoghe iniziative, e che comprendono associazioni di insegnanti, di cinofili, di ricercatori biologi, veterinari ed etologi, nonché otto società scientifiche affini ai temi del progetto.

Il progetto si propone di far riflettere su principi basilari di etologia applicata insegnanti, studenti e famiglie, e consisterà nell’illustrare i principi basilari dell’evoluzione, tramite selezione artificiale, di caratteristiche sia morfologiche e funzionali, sia etologiche comportamentali.

Risultati attesi nel triennio

Nel complesso, si conta di raggiungere circa 8.700 utenti.

Ove nelle disponibilità dell’erogazione, verrà prodotto un CD da distribuire presso le competenti sedi territoriali scolastiche, eventualmente da far pervenire, dietro richiesta, a esperti qualificati come materiale didattico per ulteriori iniziative di diffusione.

Si intende inoltre proporre spunti didattici per una lettura del rapporto uomo-animale attraverso lo sviluppo del pensiero e del metodo scientifico e diffondere un’esperienza didattica in biologia basata sull’osservazione diretta degli animali, replicabile anche in altri ambiti progettuali.

Trasferibilità dei risultati

Sarà costruito un percorso formativo in collaborazione tra i proponenti e un numero ridotto di insegnanti in servizio presso istituti di istruzione secondaria di diversa tipologia (secondari di primo grado, licei, istituti professionali, istituti tecnici) con collocazione geografica diversa (Campania, Lazio, Molise, Sicilia). Conclusa la sperimentazione relativa al percorso didattico, i risultati del lavoro saranno presentati dagli studenti coinvolti in un workshop da tenersi presso l’ISS, e sarà quindi prodotta e diffusa sul territorio nazionale una “dispensa” (in formato cartaceo ed elettronico) che coniugherà una sintetica trattazione degli argomenti affrontati con la presentazione ragionata delle attività di sperimentazione, sostanziata da esempi concreti. Tali esempi saranno costituiti dagli esiti delle sperimentazioni condotte e successivamente discussi e validati collegialmente (dati relativi ad indagini condotte da insegnanti e studenti attraverso schede da compilare, esperienze di osservazione degli animali, prove di verifica e di

valutazione; materiali didattici illustrativi). Sarà raccolto su CD-rom e reso disponibile sul sito web dell'ISS e sui siti web dei singoli Istituti partecipanti al progetto e distribuito presso le sedi didattiche competenti.

Il controllo epigenetico dell'espressione genica come *marker* delle fasi prodromiche della malattia d'Alzheimer

La malattia di Alzheimer (AD) è un disordine progressivo neurodegenerativo che rappresenta la più importante forma di demenza tra la popolazione anziana. La natura sporadica del 90% dei casi della AD, la suscettibilità differenziale tra maschi e femmine, la tarda età d'insorgenza, il modello di ereditarietà non-mendeliana della forma sporadica, le modificazioni aberranti degli istoni, i livelli anomali di folato e omocisteina suggeriscono nel complesso che una componente epigenetica potrebbe essere coinvolta nello sviluppo della malattia. Tuttavia, le nozioni riguardo il ruolo delle alterazioni epigenetiche nella eziologia della malattia restano al momento non esaustive. I meccanismi epigenetici che controllano l'espressione genica e promuovono l'accumulo di alterazioni ossidative del DNA sono mediati da alterazioni nella metilazione dei dinucleotidi CpG. Lo studio intende valutare in soggetti affetti da *Mild Cognitive Impairment* (MCI) e in pazienti affetti da AD nella fase iniziale, il possibile ruolo dello stato di metilazione dei promotori di un set selezionato di geni tra i quali sono individuabili fattori potenziali di suscettibilità per l'AD, geni coinvolti nel processo di metilazione e *loci* associati alla degenerazione neurale. Si cercherà, quindi, di stabilire se, attraverso la definizione di un profilo epigenetico del paziente, sia possibile ricavare informazioni sulla diagnosi e sull'evoluzione della patologia.

Risultati attesi nel triennio

Lo sviluppo dell'AD comprende un intervallo temporale molto esteso, che probabilmente ha inizio in una lunga fase pre-clinica nella quale la malattia non presenta ancora un fenotipo definito. Per tale ragione l'individuazione di *marker* precoci della malattia potrebbe agevolare in modo decisivo le successive strategie terapeutiche evitando l'intervento farmacologico in un contesto di degenerazione neurale divenuto irreversibile. Lo scopo principale dello studio è la comprensione del ruolo della metilazione differenziale dei promotori di alcuni geni direttamente coinvolti nell'eziologia della demenza o nel processo stesso di metilazione nelle fasi pre-diagnostica e iniziale della malattia. La metilazione regola l'espressione genica con una serie di altri meccanismi interconnessi e attivamente controllati, determina quantitativamente i determinanti proteici che costituiscono gli effettori funzionali cellulari. La valutazione di eventuali profili di trascrizione interpretabili come fattori di rischio o protezione potrebbe, quindi, rappresentare un notevole progresso nella comprensione dei meccanismi di sviluppo della malattia, in modo particolare per la forma sporadica della demenza di cui finora non sono state identificate le cause.

Trasferibilità dei risultati

Lo studio è diretto alla comprensione della variabilità degli aspetti epigenetici nelle fasi precoci della malattia d'Alzheimer e nei soggetti affetti da MCI. I risultati parziali e finali dello studio saranno divulgati alla comunità scientifica attraverso la partecipazione a congressi nazionali e internazionali destinati ad un indirizzo biomedico, biotecnologico e farmaceutico. Inoltre, lo studio completo verrà sottoposto alle riviste scientifiche interessate alla comprensione dei meccanismi molecolari fisio-patologici delle demenze e di degenerazione neurale. L'identificazione di profili di metilazione associabili allo sviluppo della malattia potrebbe, inoltre, dopo le opportune verifiche di specificità e sensibilità, essere utilizzata come nuovo *marker* di diagnosi e come tale utilizzata nella pratica clinica nell'SSN.

Imaging molecolare del metabolismo della colina nel carcinoma ovarico: identificazione di indicatori non invasivi di malattia e di nuovi target terapeutici

Tra le neoplasie ginecologiche il carcinoma epiteliale dell'ovaio (EOC) presenta nei Paesi industrializzati il più elevato tasso di mortalità, con sopravvivenza a cinque anni del 44% circa. La maggioranza delle lesioni EOC è asintomatica e oltre due terzi delle pazienti vengono diagnosticate solo a stadi avanzati di malattia. La rivelazione mediante spettroscopia di risonanza magnetica (MRS) di un alterato metabolismo della colina nel carcinoma ovarico (Iorio E, *et al. Cancer Res* 2005) apre rilevanti prospettive di *imaging* molecolare non invasivo per l'identificazione di biomarcatori di progressione tumorale, di *endpoint* farmacologici e di nuovi target di terapia mirata. Il progetto si propone di utilizzare approcci multidisciplinari per caratterizzare: i) espressione genica e attività degli enzimi responsabili del metabolismo aberrante della colina in cellule di EOC umano, in relazione all'attività proliferativa e metastatica e come possibili bersagli terapeutici; ii) il profilo spettrale ottenuto mediante MRS all'angolo magico (HR MAS) da biopsie di pazienti, in relazione a prognosi e storia clinica diverse (collaborazione con l'INT, Milano); iii) il significato di alterazione del segnale della colina in modelli preclinici di carcinoma ovarico umano come indicatori di risposta a terapia. In collaborazione con il Policlinico San Donato e INT di Milano, verrà valutato l'incremento di accuratezza diagnostica associato all'integrazione di metodi di *imaging* (MRI) e MRS *in vivo* su pazienti.

Risultati attesi nel triennio

Mediante le odierne tecnologie di MRS in alta risoluzione, metodi MRI/MRS *in vivo* e analisi bioinformatica *in silico* dei geni coinvolti nel metabolismo della colina, verranno caratterizzati: i) il significato biochimico e fisiopatologico di segnali MRS di metaboliti della colina in cellule e biopsie di carcinoma ovarico; ii) l'attivazione di diversi enzimi del ciclo della fosfatidilcolina (PC) in cellule di EOC e gli effetti della loro *down*-regolazione su proliferazione cellulare e profilo spettrale; in particolare saranno caratterizzate le alterazioni di espressione di colina chinasi, fosfolipasi D e C PC-specifiche e lisofosfolipasi nella progressione da cellule normali dell'epitelio ovarico e sue varianti immortalizzate a linee stabilizzate di EOC e cellule di ascite; iii) il significato prognostico di segnali MRS della colina in campioni chirurgici di carcinoma ovarico, in relazione alla storia clinica della paziente e a diversi gradi di responsività a terapie antitumorali; iv) l'efficacia degli odierni trattamenti farmacologici (cisplatino, tassolo) a confronto con nuovi protocolli terapeutici basati sulla combinazione di questi farmaci con inibitori specifici di *pathway* metabolici, in xenotrapianti di cellule di EOC umano in topi immunodeficienti; v) l'incremento di accuratezza diagnostica derivante dalla combinazione di metodi MRI e MRS nella medesima sessione clinico-diagnostica.

Trasferibilità dei risultati

Validazione e possibile trasferimento all'SSN di nuovi metodi di *imaging* non invasivo per la diagnosi del carcinoma ovarico.

Identificazione di nuovi indicatori di prognosi e di risposta a terapie convenzionali e innovative, al fine di migliorare il management clinico di donne affette da carcinoma ovarico.

Identificazione di nuovi target molecolari per il possibile sviluppo di approcci terapeutici innovativi.

Imaging molecolare mediante MRS di cellule staminali tumorali di neoplasie femminili per lo sviluppo di nuovi approcci diagnostici e terapeutici

Il progetto si propone di caratterizzare mediante MRS e *microimaging* cellule staminali tumorali da carcinomi del sistema riproduttivo femminile e carcinoma della mammella, al fine di integrare metodologie di genomica, proteomica funzionale e metabolomica sviluppate in una

collaborazione tra il nostro Reparto e l'Istituto Nazionale Tumori (INT) di Milano, per l'identificazione di nuovi approcci di terapia antitumorale mirata.

Cellule staminali tumorali di tumori solidi saranno isolate e caratterizzate presso l'INT mediante tecniche di immunofluorescenza e *Real time* PCR. Nell'ambito del piano di ricerca triennale del Reparto di *Imaging* molecolare e cellulare verranno condotti studi di spettroscopia a Risonanza Magnetica (MRS) (utilizzando accessori miniaturizzati per analizzare piccoli campioni di cellule), complementati da studi di biologia cellulare e di microscopia ottica, al fine di caratterizzare attività ed espressione genica di enzimi responsabili delle alterazioni biochimiche del ciclo della fosfatidilcolina (PC) e del metabolismo glucidico e lipidico in cellule staminali tumorali. La caratterizzazione metabolica di cellule staminali tumorali costituirà la base per lo sviluppo di metodi di *imaging* non invasivo e identificazione di nuovi target di terapia mirata.

In particolare verranno condotti studi per valutare l'efficacia terapeutica di inibitori del ciclo della PC, in cellule tumorali staminali e non, a confronto con farmaci convenzionali.

Risultati attesi nel triennio

- Caratterizzazione di specifiche vie metaboliche che distinguano le cellule staminali dalla rimanente componente del tumore e che possano costituire bersagli terapeutici alternativi.
- Analisi biomolecolare e funzionale che consenta di identificare le vie di segnalazione che sostengono il potenziale di auto rinnovamento e proliferazione delle staminali tumorali nella prospettiva di sviluppo di nuove strategie terapeutiche mirate contro specifici *pathway* metabolici.
- Analisi metaboliche della risposta a farmaci convenzionali nelle cellule tumorali staminali e non.
- Identificazione della componente staminale all'interno dei tumori studiati, mediante tecniche di *microimaging* e spettroscopia a risonanza magnetica.

Trasferibilità dei risultati

Identificazione di target molecolari per il possibile sviluppo di nuovi approcci terapeutici nelle neoplasie del sistema riproduttivo femminile e nel carcinoma della mammella, in relazione alla componente staminale e dei problemi legati ad *uptake* di farmaci, polichemioresistenza e risposta al trattamento.

Identificazione di nuovi indicatori di diagnosi, prognosi e risposta alla terapia, al fine di migliorare il management clinico della paziente.

Immunità cellulare e regolazione delle interazioni *Mycobacterium tuberculosis*-ospite: ruolo delle cellule dendritiche e del segnale dell'interferone

La Tuberculosis (TB), malattia causata da *Mycobacterium* (M) *tuberculosis*, è un problema di salute pubblica di grande impatto a causa dell'emergenza di ceppi resistenti a trattamenti convenzionali basati sull'utilizzo di antibiotici. Difatti l'incidenza globale della TB è in aumento con 8,8 milioni di nuovi casi e due milioni di morti all'anno (WHO 2006. *Global tuberculosis control. Surveillance, planning, financing. WHO report* www.who.int/tb/publications/global_report/2006/download_centre/en/index.html). La TB è sostanzialmente una malattia polmonare dell'adulto, caratterizzata da un diffuso danno dei polmoni e dall'efficiente trasmissione del batterio per via aerea. Sebbene la vaccinazione in età neonatale, con il corrente vaccino composto dal bacillo di Calmette-Guérin (BCG)(BCG) derivato da *Mycobacterium bovis*, sia efficace in bambini piccoli a prevenire la malattia primaria, essa è fundamentalmente inefficace nel prevenire la malattia in bambini grandi e negli adulti (malattia da riattivazione). In realtà, interazioni ancora incomprensibili tra il micobatterio e l'ospite determinano l'outcome dell'infezione nell'uomo che varia da un'infezione

asintomatica ad una patologia da trattare per tutto il corso della vita. Tuttavia, nella maggior parte dei casi il sistema immune dell'ospite è in grado di controllare la replicazione del batterio e di prevenire lo sviluppo della malattia attiva. In questo scenario complesso, le componenti del sistema immune che determinano il diverso corso della malattia e l'assenza di risposta al vaccino negli adulti rimangono ancora da essere definite. Le cellule dendritiche (DC) rappresentano componenti chiave del sistema immune e svolgono un ruolo unico nell'induzione della risposta immune adattativa essenziale nel contenere l'infezione da *M. tuberculosis*. Durante l'infezione, la funzione delle diverse sottopopolazioni di DC può essere influenzata dal micobatterio con effetti sulla capacità di indurre una risposta adattativa competente nel limitare la disseminazione del micobatterio stesso.

Negli ultimi anni è stato ampiamente dimostrato che il sistema dell'interferone (IFN) svolge un ruolo determinante nella differenziazione e nell'attivazione delle DC. In particolare, risultati del gruppo di afferenza del responsabile hanno evidenziato che l'IFN di tipo I (IFN-I) induce *in vitro* una rapida differenziazione di monociti umani in DC con una propensione elevata a catturare antigeni di diversa natura e una spiccata capacità di stimolare l'induzione di una risposta immune cellulare di tipo TH1. Inoltre, lo stesso gruppo ha dimostrato che IRF-8, un membro della famiglia degli *interferon-regulatory factor* (IRF) costituita da importanti fattori di trascrizione che agiscono nella trasmissione del segnale degli IFN, rappresenta un fattore fondamentale nel differenziamento e nella funzionalità di alcune sottopopolazioni di DC murine quali le DC plasmacitoidi e le DC convenzionali CD8-alpha+.

Alla luce di queste conoscenze, l'attività di ricerca di questo progetto è finalizzata a: i) studiare il ruolo di ciascun sottotipo di DC nell'induzione della risposta immune all'infezione da *M. tuberculosis* o a strategie vaccinali mirate al suo controllo in modelli murini; ii) delucidare il ruolo di IFN-I e del suo segnale nell'interazione tra DC e *M. tuberculosis*, utilizzando il modello di DC differenziate in presenza di IFN-alpha (IFN-DC) da monociti di sangue periferico umano; iii) studiare la capacità adiuvante di IFN-I e del ruolo degli antigeni Pst-1 e HBHA in protocolli vaccinali per la TB.

Risultati attesi nel triennio

La finalità generale del presente progetto è quella di studiare il ruolo del segnale di IFN-I nel controllare la funzione delle diverse sottopopolazioni di DC nell'induzione della risposta immune durante l'infezione con *M. tuberculosis* o in corso di trattamenti con approcci vaccinali. L'attuazione degli studi proposti permetterà di raggiungere i seguenti risultati: i) la caratterizzazione del fenotipo e delle proprietà funzionali di DC generate, in presenza di IFN-I o secondo protocolli convenzionali, da monociti di sangue periferico di pazienti con TB attiva, di individui infettati asintomatici oppure di individui sani. Il raggiungimento di questo obiettivo permetterà di valutare se le DC da pazienti con TB attiva conservano la capacità di rispondere ad antigeni del micobatterio e se questa proprietà viene modulata dalla presenza di IFN-I, attivando una risposta immune competente incluso l'espansione di linfociti T CD8+ e la produzione di citochine quali IL-12. Nell'ambito di questo studio verranno valutati i seguenti parametri: a) espressione di marcatori di differenziamento, di maturazione e di attivazione di DC; b) capacità di DC di catturare *M. tuberculosis* per mezzo di fagocitosi; c) capacità di DC infettate con *M. tuberculosis* di stimolare una risposta T specifica; d) modulazione d'espressione genica di DC in seguito ad infezione con *M. tuberculosis* per mezzo di *microarray*; e) modulazione dell'espressione dei miR in DC in seguito ad infezione con *M. tuberculosis*; ii) caratterizzazione del ruolo del segnale dell'IFN-I, con particolare riferimento al ruolo di IRF-8, nell'induzione di una risposta immune competente nel corso dell'infezione da *M. tuberculosis* o durante trattamento con diversi approcci vaccinali quali BCG o nuove strategie basate sull'utilizzo di antigeni emergenti come HBHA. Il conseguimento di questo obiettivo permetterà di acquisire nuove conoscenze alla base dei meccanismi immunologici mediati da

DC che consentono una risposta in grado di contenere l'infezione o alternativamente permettere la disseminazione del micobatterio. Inoltre si potranno capire meccanismi immunologici cruciali per disegnare vaccini contro la TB efficaci nell'adulto. Gli esperimenti che permetteranno il raggiungimento di questi risultati sono di seguito elencati: i) caratterizzazione delle caratteristiche fenotipiche e funzionali di DC in topi IRF-8 *knock-out* (KO) e immunocompetenti in seguito ad infezione con *M. tuberculosis* o trattamento con BCG o un vaccino basato sull'utilizzo di HBHA, in assenza o in presenza di IFN-I; ii) valutazione, nei modelli descritti in a), di parametri della risposta immunologica quali induzione di linfociti T CD4+ e CD8+ specifici per antigeni di *M. tuberculosis*, produzione di citochine, induzione di cellule Th17 e/o linfociti T regolatori; iii) valutazione dell'efficacia degli approcci vaccinali menzionati in a) attraverso l'infezione con *M. tuberculosis* dei topi vaccinati.

Trasferibilità dei risultati

La realizzazione del presente progetto permetterà di acquisire nuove e indispensabili conoscenze necessarie a delucidare i meccanismi immunologici alla base della risposta all'infezione da *M. tuberculosis*. Questi studi inoltre consentiranno di delucidare le vie del sistema immunitario che caratterizzano la risposta dell'ospite verso il trattamento con BCG o altri potenziali trattamenti preventivi, chiarendo le basi biologiche per cui il vaccino BCG non genera un'immunità protettiva nell'adulto. Infine, gli studi proposti saranno funzionali al disegno di nuovi vaccini o di trattamenti terapeutici innovativi, oggi particolarmente necessari alla luce dell'emergenza di tutti i paesi industrializzati data dalla comparsa di ceppi di micobatterio resistenti alle terapie convenzionali.

Immunopatologia e visualizzazione delle lesioni cerebrali della sclerosi multipla

Il progetto si propone di studiare i meccanismi immuno-mediati che sottendono ai processi neurodegenerativi nella corteccia cerebrale di pazienti con sclerosi multipla (SM) (ISS), e di utilizzare tecniche avanzate di risonanza magnetica (8 Tesla) negli stessi tessuti cerebrali *post-mortem* da pazienti con SM nel tentativo di visualizzare la componente infiammatoria e le alterazioni tissutali associate (Dott.ssa F. Bagnato, NINDS/NIH).

Risultati attesi nel triennio

Generare le conoscenze e gli strumenti per monitorare nel cervello dei pazienti con sclerosi multipla l'evoluzione del danno corticale e l'impatto delle terapie in uso sui processi immunitari e neurodegenerativi.

Trasferibilità dei risultati

La definizione di parametri di risonanza magnetica correlati ad un substrato immunopatologico e neurodegenerativo potrà avere importanti ricadute nella pratica clinica migliorando il valore diagnostico e prognostico delle tecniche di *imaging*.

Implicazioni funzionali delle modifiche indotte da un insulto ossidativo a carico di proteine delle vescicole sinaptiche: studi *in vitro*

Lo stress ossidativo esercita un ruolo importante nell'insorgenza del danno nelle malattie neurodegenerative. In particolare, il danno eccitotossico mediato dalla eccessiva stimolazione del recettore NMDA è stato correlato alla simultanea produzione dei radicali NO e O₂⁻ e alla conseguente formazione di perossinitrito. La tossicità del perossinitrito è dovuta alle sue proprietà ossidanti e nitranti a carico dei residui di tirosina e triptofano e la presenza di nitrotirosine nelle proteine è considerato un marcatore specifico della produzione di perossinitrito *in vivo* e una delle cause di interferenza nella trasduzione dei segnali mediati dalla fosforilazione in tirosina. Il trattamento di sinaptosomi di ratto con perossinitrito induce sia un

aumento del rilascio del glutammato dalle vescicole sinaptiche sia la formazione di 3-nitrotirosine a carico di specifiche proteine delle vescicole tra cui la sinaptofisina, SNAP25 e MUNC18. La sinaptofisina è una proteina fosforilata in tirosina, substrato della chinasi src, che espone nel versante citoplasmatico la regione C-terminale ricca di residui di tirosina. Tale regione è responsabile delle interazioni con le proteine coinvolte nel processo di esocitosi. Di particolare importanza è il *binding* tra sinaptofisina e sinaptobrevina II e tra sinaptofisina e dinamina I che regolano il processo di eso/endocitosi al terminale sinaptico. Lo scopo del progetto è quello di identificare e caratterizzare le modifiche (fosforilazione e nitratura) indotte dal perossinitrito a carico di specifiche tirosine della sinaptofisina verificando se tali modifiche possano influenzare le interazioni con src e/o con altre proteine coinvolte nel processo di eso/endocitosi.

Risultati attesi nel triennio

Per questo studio *in vitro* saranno utilizzate sia la proteina nativa purificata da sinaptosomi di ratto trattati con perossinitrito sia la regione C-terminale della sinaptofisina (aa 219-307) espressa come proteina fusa alla GST. Esperimenti di *pull-down* permetteranno di studiare l'interazione tra la sinaptofisina e i suoi partner, in particolare verrà ulteriormente caratterizzata l'interazione con la tirosina chinasi src cercando di stabilire, mediante la spettrometria di massa (MALDI-TOF), quale(i) fosfotirosina(e) del dominio C-terminale media il legame con il dominio SH2 di src. Inoltre, la presenza di nitrotirosine in questa regione della proteina potrebbe modificare le interazioni della sinaptofisina con altri componenti del complesso di esocitosi modificando il processo che porta al rilascio del neurotrasmettitore. Infatti, risultati preliminari indicano che la sinaptofisina nitrata associa più sinaptobrevina II, una proteina vescicolare che partecipa alla formazione del complesso SNARE. Mediante MALDI-TOF, in combinazione con mutagenesi sito diretta, si cercherà di identificare la tirosina della coda della sinaptofisina nitrata specificamente dal perossinitrito. L'identificazione del sito di nitratura permetterà la produzione di anticorpi monoclonali e policlonali specifici per la forma nitrata della sinaptofisina da utilizzare come marcatore per le patologie neurodegenerative in cui è stata riscontrata la presenza di nitrotirosine (Alzheimer, Huntington, Parkinson e SLA).

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*.

Individuazione di indici neurobiologici predittivi di vulnerabilità al rischio di sviluppo di sindromi depressive

Scopo principale del progetto è lo studio dei livelli ematici delle neurotrofine NGF e BDNF quali *marker* periferici di vulnerabilità a sindromi depressive. L'analisi dei livelli di tali neurotrofine verrà utilizzata per l'individuazione di sottotipi e per caratterizzare le diverse fasi della patologia, particolarmente quelle precoci.

Da un punto di vista più prettamente metodologico si intende seguire il decorso a breve e medio termine di un set di pazienti per validare la predittività degli indici neurobiologici di interesse. Sarà possibile: i) monitorare il decorso patologico; ii) valutare l'efficacia del trattamento farmacologico al fine di comprendere il ruolo delle neurotrofine quali indicatori di efficacia di strategie terapeutiche, anche innovative e iii) tipizzare nosograficamente sotto-tipi della patologia in base a un'analisi in cui fattori clinici (anamnesi, *life-event*, diagnostica standard, sintomatologia "sporadica", ecc.) siano associati a *marker* neurobiologici o endocrini raramente (o non ancora) valutati su un numero sufficientemente consistente di pazienti.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto permetterà di acquisire nuove conoscenze sulle basi neurobiologiche della depressione, con particolare riguardo al ruolo delle neurotrofine NGF e BDNF. Lo studio dell'andamento dei livelli ematici di tali molecole nei pazienti nelle diverse fasi della malattia, particolarmente nei periodi di remissione, permetterà di valutare il loro potenziale utilizzo quali nuovi *marker* neurobiologici di depressione e come nuovi strumenti per la tipizzazione di specifici quadri sintomatologici. Le indicazioni acquisite sul ruolo di NGF e BDNF come mediatori delle funzioni bioritmiche e neuroendocrine alterate nella patologia depressiva potrebbero essere utilizzate per una valutazione precoce di vulnerabilità e per formulare diagnosi più accurate.

Trasferibilità dei risultati

La partecipazione dell'ISS al Programma strategico favorirà l'integrazione e il *networking* con strutture sanitarie presenti sul territorio nazionale che operano nel campo della salute mentale favorendo il trasferimento di nuove tecnologie sviluppate dall'ISS alla diagnostica medica.

Inflammatione e disfunzioni immunologiche in obesità e loro ruolo nella patogenesi di malattie neoplastiche

L'obesità rappresenta una patologia in crescente aumento nei paesi industrializzati. Questa patologia è un fattore di rischio importante per diverse malattie quali l'ipertensione e le malattie cardiovascolari, il diabete di tipo 2, malattie infettive e neoplastiche. L'obesità è associata ad uno stato di infiammazione cronica che si ritiene essere importante per il successivo sviluppo delle patologie ad essa associate. Al riguardo, il tessuto adiposo viscerale è adesso riconosciuto come un organo secretorio importante costituito non soltanto da adipociti e loro precursori, ma anche da cellule del sistema immunitario quali i macrofagi e le cellule dendritiche (DC). Questo tessuto rilascia numerosi fattori solubili quali le adipochine, nonché numerose citochine e chemochine che agiscono non soltanto a livello locale ma anche sistemico regolando importanti funzioni metaboliche e immunologiche. Sulla base di queste acquisizioni recenti, il presente progetto ha lo scopo di studiare le interazioni tra tessuto adiposo e cellule del sistema immunitario e di definire il ruolo delle alterazioni associate all'obesità nell'insorgenza delle malattie neoplastiche. L'attività proposta si articolerà su tre diversi obiettivi:

- caratterizzazione fenotipica delle DC presenti nel tessuto adiposo e delle loro interazioni con adipociti in soggetti normopeso verso individui obesi;
- identificazione di alterazioni funzionali delle DC di potenziale rilevanza nei tumori del colon associati all'infiammazione;
- valutazione del potenziale terapeutico di composti bioattivi del cibo, quali ad esempio i polifenoli, nell'attenuazione dell'infiammazione e nel ripristino delle funzioni immunitarie.

Risultati attesi nel triennio

I risultati ottenuti nell'ambito di questo progetto forniranno informazioni importanti sulla distribuzione e sui sottotipi di DC presenti nel tessuto adiposo. La caratterizzazione di loro eventuali alterazioni quantitative e qualitative sarà rilevante per una migliore comprensione dei meccanismi che legano l'infiammazione associata all'obesità con la maggiore incidenza di neoplasie del colon osservata in questi soggetti. Infine, la valutazione degli effetti di composti naturali contenuti nel cibo nell'attenuazione dell'infiammazione e nel ripristino delle funzioni immunologiche potrebbe fornire le basi per lo sviluppo di interventi dietetici mirati alla prevenzione di queste malattie neoplastiche.

Trasferibilità dei risultati

È prevedibile che i risultati della ricerca saranno trasferibili a medio e lungo termine all'SSN, in quanto consentiranno di: acquisire elementi importanti nella individuazione degli eventi molecolari e metabolici coinvolti nell'insorgenza dell'obesità e delle complicanze ad essa correlate; fornire indicazioni riguardanti interventi dietetici; individuare target molecolari specifici verso i quali indirizzare eventuali nuove terapie; identificare nuovi *marker* da utilizzare per il monitoraggio di rischio e progressione della malattia, che possono rappresentare strumenti diagnostici e di verifica di efficacia terapeutica.

Insulin Resistance and Coronary Disease: insights into inflammation, thrombosis and metabolic syndromes

Il diabete di tipo 2 e le sindromi più precoci di insulino-resistenza e intolleranza al glucosio sono potenti fattori di rischio di sviluppo precoce di malattia cardiovascolare. La mortalità associata a questi disturbi è più alta di circa quattro volte che la popolazione normale. Paradossalmente la sindrome è associata anche a debolezza ossea che è stata scarsamente studiata. Con tale progetto l'ISS contribuisce allo sviluppo di terapie innovative della sindrome coronarica acuta (ACS) associata al diabete tipo 2, e porre le basi per definire il ruolo di nuovi *biomarker* predittivi delle calcificazioni vascolari. Il materiale derivante da pazienti e la stratificazione clinica, deriveranno dalla collaborazione con l'IRCSS Monzino. Con la realizzazione di tale progetto si intende caratterizzare il metabolismo delle lipoproteine postprandiali in soggetti con sindrome coronarica acuta e angina stabile, mediante: i) lo studio della aterogenità delle lipoproteine di questi pazienti; ii) modulazione dei parametri infiammatori; iii) studiare il ruolo della fetuina A quale *biomarker* delle calcificazioni vasali associate ad ACS e al diabete.

Risultati attesi nel triennio

L'obiettivo generale è quello di identificare nuovi *biomarker* predittivi in pazienti con ACS e diabete. Obiettivo specifico dell'ISS è contribuire allo sviluppo di terapie innovative della ACS associata al diabete tipo 2, e porre le basi per definire il ruolo di nuovi *biomarker* predittivi delle calcificazioni vascolari, contribuendo a definire delle strategie di sanità pubblica che migliorino la qualità della vita e diminuiscano i costi sostenuti dal sistema sanitario per combattere le complicanze cardiovascolari del diabete di tipo 2.

Trasferibilità dei risultati

Con tale progetto l'ISS contribuisce allo sviluppo di terapie innovative della ACS associata al diabete tipo 2, e porre le basi per definire il ruolo di nuovi *biomarker* predittivi delle calcificazioni vascolari, contribuendo a definire delle strategie di sanità pubblica che migliorino la qualità della vita e diminuiscano i costi sostenuti dal sistema sanitario per combattere le complicanze cardiovascolari del diabete di tipo 2.

Intellimaze. High-throughput, fully automated and cost-effective behavioural phenotyping of normal, clinical and genetic mouse models

Obiettivo del progetto è lo sviluppo di un sistema automatizzato di rilevazione del comportamento di piccoli roditori. Obiettivo specifico dell'Unità ISS è lo sviluppo di modelli animali di depressione e sindromi ansiose e la loro fenotipizzazione mediante le gabbie automatizzate sviluppate dal consorzio.

Risultati attesi nel triennio

La rilevazione automatica del comportamento animale permette l'acquisizione di un notevole volume di informazione e la loro efficiente elaborazione mediante sistemi informatici dedicati.

Trasferibilità dei risultati

Lo sviluppo di un sistema automatizzato per la rilevazione del comportamento animale può avere numerose ricadute tra cui:

- un più veloce screening di composti farmacologici per il trattamento dei disordini dell'ansia;
- un'efficiente fenotipizzazione di modelli animali transgenici sviluppato per lo studio della depressione e dell'ansia;
- standardizzazione intra- e inter- laboratorio di metodi comportamentali utilizzati per lo studio delle malattie psichiatriche;
- *animal welfare*: riduzione dello stress associato alla sperimentazione dovuto alla manipolazione da parte dello sperimentatore.

Interazione cellule staminali neurali-microglia: ruolo dell'attivazione microgliale nel controllo della neurogenesi

I processi infiammatori cerebrali, sostenuti dalla microglia e da cellule infiltranti del sistema immunitario, sembrerebbero determinare un microambiente sfavorevole per la neurogenesi nell'adulto e costituirebbero il principale ostacolo al compimento di eventi rigenerativi. Recenti evidenze sperimentali dimostrano tuttavia che le cellule microgliali possono acquisire, in modo dinamico, stati di attivazione funzionalmente variegati, ai quali corrispondono differenti effetti sulle proprietà delle cellule limitrofe, incluse le cellule staminali neurali (NSC). Nel corso degli ultimi anni abbiamo dimostrato che, a differenza della microglia stimolata in modo acuto, la microglia cronicamente stimolata è permissiva per la sopravvivenza delle NSC e per il loro differenziamento a neuroni. L'esito dei processi neurogenici dipenderebbe dunque dallo specifico equilibrio tra le molecole pro- ed anti-infiammatorie prodotte nelle varie condizioni di attivazione (Cacci, *et al. Glia* 2008;56:412-25).

Intendiamo proseguire i nostri studi caratterizzando ulteriormente le proprietà funzionali acquisite dalle cellule microgliali in seguito a stimolazione cronica e cercando di identificare i fattori molecolari responsabili degli effetti pro- o anti-neurogenici sopra descritti.

Risultati attesi nel triennio

Ci avvarremo di colture primarie di microglia e di linee epigeneticamente immortalizzate di NSC embrionali e adulte, già impiegate negli studi sopra citati, e di colture organotipiche ippocampali. Verificheremo se, anche in sistemi cellulari complessi, la microglia assuma fenotipi funzionali differenti a seconda della stimolazione a cui è esposta e se ciò si rifletta in diversi destini differenziativi o di sopravvivenza di NSC endogene o trapiantate. Particolare attenzione sarà rivolta all'espressione di citochine, mediatori lipidici quali la prostaglandina E2 e altri fattori solubili prodotti nelle diverse condizioni di stimolazione e al loro ruolo nella modulazione delle NSC. Intendiamo inoltre esplorare espressione e ruolo di un'ampia famiglia

di enzimi proteolici, le metalloproteasi di matrice, potenzialmente in grado di influenzare molti aspetti del programma neurogenico e delle funzioni microgliali stesse.

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.

Interazioni proteiche della disbindina, una proteina del complesso DPC e BLOC-1, implicata nella biogenesi e nel *trafficking* di organelli e vescicole

Studi recenti volti a chiarire il ruolo funzionale della distrobrevina, una delle componenti citoplasmatiche del complesso di proteine associato alla distrofina (*Dystrophin-associated Protein Complex*, DPC), hanno consentito di identificare diversi partner molecolari di questa proteina, suggerendone un ruolo come molecola *scaffold*. Uno di questi partner, la disbindina, è una proteina ampiamente espressa, in grado di legare sia α che β distrobrevina, sia nel muscolo che nel cervello. La disbindina fa parte di un complesso solubile, BLOC-1 (*Biogenesis of Lysosome related-Organelles Complex-1*) coinvolto nel *trafficking* intracellulare di vescicole. È mutata in un paziente affetto da una malattia rara, la sindrome di Hermansky-Pudlak di tipo7 (HPS7), caratterizzata da difetti nella biogenesi di organelli simili a lisosomi e in un modello murino della malattia, il topo *sandy*. Oltre ad un ruolo come partner di interazione della distrobrevina nel DPC e nei meccanismi di *trafficking*, la disbindina sta emergendo come uno dei maggiori fattori di suscettibilità alla schizofrenia ed è stato ipotizzato un suo possibile coinvolgimento nella regolazione della biogenesi di vescicole e nell'esocitosi. Per il potenziale significato dell'interazione tra distrobrevina e disbindina nella distrofia muscolare, nella schizofrenia e nella HPS, ci si propone di caratterizzare ulteriormente a livello molecolare questa interazione e i segnali cellulari in grado di regolarla.

Risultati attesi nel triennio

L'idea alla base di questo progetto è che l'interazione di una proteina quale la disbindina implicata in disordini psichiatrici, come anche nel determinare le capacità cognitive dei singoli individui, con una proteina del DPC, possa essere rilevante nell'instaurarsi del deficit cognitivo che si riscontra associato alla distrofia muscolare di Duchenne (DMD) in circa un terzo dei pazienti. L'interazione della distrobrevina con la chinesina, uno dei motori molecolari, potrebbe contribuire al ruolo funzionale della disbindina nei meccanismi di *trafficking* intracellulari implicati nella sintesi di organelli e nel rilascio di vescicole. L'espressione della disbindina verrà studiata nel corso del differenziamento neuronale attraverso l'utilizzo multidisciplinare di tecniche biochimiche e di biologia molecolare classiche, di trasfezioni in linee cellulari e in colture neuronali e dell'impiego della risonanza plasmonica di superficie per lo studio dell'interazione proteina-proteina. Risultati preliminari suggeriscono che la disbindina possa essere un target di fosforilazione PKA-dipendente: ci si propone di valutare un eventuale coinvolgimento di meccanismi di fosforilazione nel mediare le interazioni che la disbindina può stabilire con proteine del DPC e/o del complesso BLOC-1.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti saranno inviati per la pubblicazione a riviste internazionali e potranno aiutare nella comprensione del danno cerebrale riscontrato in pazienti affetti da distrofia muscolare di Duchenne, di patologie quali la schizofrenia, e di sindromi caratterizzate da un anomalo traffico vescicolare intracellulare quali la sindrome di Hermansky-Pudlak di tipo 7, suggerendo potenzialmente nuove strategie terapeutiche.

Isoprostani come indici di danno assonale e di membrana nella sclerosi multipla

Nei soggetti con sclerosi multipla (SM) è presente una componente di danno neuronale evidenziabile tramite risonanza magnetica in spettroscopia (RMS) strettamente correlata al grado di disabilità del soggetto. La misurazione dell'N-acetilasparginato tramite questa tecnica ha fornito un utile strumento prognostico, ma a causa delle basse concentrazioni presenti a livello liquorale, questo e altri metaboliti studiati mediante RMS non sono utilizzabili come indicatori periferici di danno assonale. Gli isoprostani (IsoPs) sono lipidi ossidati riconosciuti come indici elettivi di danno ossidativo. In un progetto finanziato dalla Fondazione Italiana Sclerosi Multipla (FISM) recentemente concluso, abbiamo osservato che in 40 soggetti con sospetta SM i valori di IsoP liquorali, ma non plasmatici, rappresentano un utile strumento per valutare la presenza di danno assonale e di membrana, valutato con RMS. Abbiamo confermato che i livelli di IsoP liquorali correlano con il grado di disabilità clinica, e osservato che i valori medi nei maschi sono più elevati rispetto alle femmine. Tale osservazione è in linea con la percentuale maggiore di soggetti maschi esaminati che presentano segni di danno assonale rispetto ai soggetti femmine (50% vs 10%).

A livello plasmatico, abbiamo osservato andamenti dei livelli di IsoP e PGE2 differenti nei due sessi, un'osservazione preliminare di particolare interesse in considerazione della maggiore incidenza della malattia nella popolazione femminile.

Risultati attesi nel triennio

Nel prossimo triennio intendiamo proseguire gli studi in quanto l'ampliamento del numero di soggetti osservati, ottenibile reclutando e analizzando i campioni plasmatici e liquorali provenienti da altri soggetti con sospetta SM, consentirà di:

- confermare la validità dei livelli liquorali di IsoP come marker precoce del danno assonale e mielinico
- approfondire le conoscenze sulle caratteristiche specifiche della malattia nella donna e nell'uomo.

Trasferibilità dei risultati

Questi indici plasmatici e liquorali, se validati come strumenti prognostici nella SM, potranno essere impiegati nella pratica clinica.

Differenze di genere negli andamenti dei livelli di IsoP e PGE2 plasmatici, se riconfermati, potranno suggerire l'impiego di protocolli terapeutici adeguati.

I livelli di IsoP plasmatici potranno essere utilizzati per monitorare l'efficacia di terapie neuroprotettive.

La sclerosi laterale amiotrofica e l'assunzione di aminoacidi ramificati: valutazione degli effetti sulla regolazione dell'espressione genica

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una gravissima malattia neurologica caratterizzata dal punto di vista anatomico-patologico, da degenerazione della via piramidale e dei motoneuroni somatici del midollo spinale e bulbo e, clinicamente, da fascicolazioni, atrofia muscolare, paraparesi spastica, disartria, difficoltà a masticare e deglutire, disturbi respiratori. Gli studi

epidemiologici hanno evidenziato un elevato rischio di SLA tra i calciatori professionisti italiani conducendo ad una stima complessiva del rischio di mortalità circa 30 volte superiore rispetto alla popolazione generale. Tutti i casi osservati sono sporadici, lasciando ipotizzare che l'eventuale contributo di fattori genetici nella eziopatogenesi di questo fenomeno potrebbe verificarsi per interazione con fattori ambientali in soggetti geneticamente suscettibili. Una nuova ipotesi è stata formulata sulla base delle recenti evidenze scientifiche che mettono in relazione l'assorbimento degli integratori alimentari nel tessuto nervoso. In particolare l'assunzione di aminoacidi a catena ramificata (ACR) leucina, isoleucina e valina potrebbe in qualche modo favorire la manifestazione clinica della SLA. Il progetto intende, quindi, verificare in opportuni modelli cellulari e animali se la somministrazione di ACR sia in grado di alterare in senso patologico i livelli di trascrizione di un gruppo selezionato di geni coinvolti nell'eziopatogenesi della malattia.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio si propone di analizzare in modelli cellulari e animali l'effetto del trattamento con aminoacidi a catena ramificata sull'espressione di un set specifico di geni coinvolti nelle vie metaboliche che regolano la risposta cellulare allo stress ossidativo. Il danno indotto dalla dismetabolismo ossidativo nel sistema nervoso centrale è certamente coinvolto nell'eziopatogenesi della malattia. Pertanto, una variazione quantitativa del processo di trascrizione dei geni coinvolti nei processi di regolazione delle vie metaboliche di ossido-riduzione, potrebbe suggerire un ovvio meccanismo molecolare causale. Tale ipotesi consentirebbe d'interpretare i risultati epidemiologici, che mostrano una maggiore incidenza della malattia in alcune coorti di atleti professionisti che utilizzano, in modo continuativo e intenso tali prodotti presenti in alcuni tipi di integratori alimentari, alla luce di un possibile processo cellulare responsabile del fenotipo patologico. Una volta definito il rapporto causa/effetto nella modulazione genica sarà possibile individuare i meccanismi di trasduzione attraverso i quali gli ACR riescono ad influenzare un processo cellulare fondamentale come l'espressione genica. L'utilizzo di modelli semplici di verifica degli effetti trascrizionali della somministrazione cronica di ACR permetterà, inoltre, di accumulare una prima base di evidenze sperimentali utili per elaborare successivi studi più direttamente legati all'utilizzo in soggetti umani.

Trasferibilità dei risultati

Lo studio degli effetti modulatori sull'espressione dei geni legati allo stress ossidativo indotti dagli aminoacidi ramificati potrebbe contribuire a delucidare alcuni aspetti dell'eziologia di alcune forme non famigliari di SLA. Come tale esso rappresenta uno studio sperimentale di base su un possibile fattore di rischio ambientale per la SLA che potrà nelle fasi intermedie essere presentato a congressi scientifici nazionali ed internazionali attraverso poster e comunicazioni orali. I risultati dello studio potranno infine essere sottoposti al processo di peer review per la pubblicazione su riviste internazionali interessate ad argomenti di medicina e prevenzione delle patologie dell'SNC. I risultati dello studio, trasferiti agli organi di controllo della salute pubblica potrebbero, inoltre, contribuire all'elaborazione di eventuali linee guida per il controllo del consumo pubblico degli integratori alimentari contenenti ACR.

La tecnologia dei *microarray* nella ricerca traslazionale in oncologia e nelle infezioni da patogeni: ruolo del LaRiM (Laboratorio di Ricerca dei *Microarray*)

Fra le analisi genomiche *high-throughput*, l'analisi dei profili di espressione genica è forse la metodologia più matura e di successo che ha cambiato l'approccio molecolare alla ricerca biomedica. Questo approccio sperimentale ha subito un processo di profonda ottimizzazione della metodologia, che può oggi avvalersi di *array* di alta qualità, standardizzazione dei

protocolli di ibridazione, tecnologie di analisi delle immagini accurate e analisi computazionali robuste, diventando uno strumento molto potente e relativamente semplice per correlare condizioni fisiologiche e patologiche a profili distintivi di espressione genica, conosciuti come *gene expression signature*. In campo oncologico, l'avvento dei *microarray* ha aperto nuove frontiere nella diagnosi, prognosi e terapia di alcuni tumori. Ad oggi, l'analisi sistematica di profili di espressione genica di campioni tumorali rappresenta l'applicazione del *microarray* più usata e standardizzata, che ha concretamente contribuito ad una più accurata valutazione di molte patologie tumorali attraverso l'identificazione di profili definiti di espressione di gruppi di geni associati con specifiche caratteristiche tumorali. In altri campi biomedici, ad esempio nella infezioni da patogeni, i *microarray* hanno permesso un avanzamento prezioso nelle conoscenze della biologia del patogeno e delle interazioni ospite-patogeno.

In ISS, il gruppo diretto dal responsabile di questo progetto ha costituito e validato il Laboratorio di Ricerca dei *Microarray* (LaRiM). Il LaRiM è una struttura integrata in cui è possibile applicare la tecnologia dei *microarray* avvalendosi dell'approccio sperimentale messo a punto in tutte le sue fasi. Le modalità di accesso al LaRiM sono state stabilite sul principio di rendere disponibili a gruppi dell'ISS e di altri istituti la piattaforma tecnologica e gli approcci tecnologici-scientifici che negli ultimi anni hanno preso piede in questo campo. Nondimeno, il LaRiM si propone di sviluppare dei progetti scientifici propri, mirati per lo più a studiare le vie molecolari delle risposte immuni in oncologia e nelle infezioni da patogeni e dei processi di carcinogenesi. Inoltre, gli studi avviati in questa struttura si prefiggono di caratterizzare nuovi marcatori molecolari predittivi della risposta ad immunoterapie e/o a terapie farmacologiche in pazienti oncologici. Su questa base l'attività scientifica del LaRiM sarà la seguente: i) analisi dei profili di espressione genica correlati alla modulazione di un nuovo antigene tumorale, il *cancer testis antigen Brother of the Regulator of Imprinted Sites* (BORIS)/CTCFL, in cellule di carcinoma mammario trattate con inibitori delle istone-deacetilasi, quali l'apicidina e il depsipeptide, e di farmaci citotossici come il docetaxolo; ii) studio dei profili di espressione genica in linee cellulari di carcinoma renale trattate con Pazopanib, Bevacizumab e AMD3100 già in uso in *trial* clinici (collaborazione con la Dott.ssa Stefania Scala, Istituto Nazionale per lo Studio e la cura dei Tumori Fondazione "G.Pascale", Napoli); iii) studio dei profili di espressione genica in pazienti selezionati di carcinoma prostatico nell'ambito di una collaborazione scientifica con Dr. Cindolo, Urologia – Ospedale "San Pio da Pietrelcina" – Vasto, Chieti; iv) analisi comparativa dei profili di espressione genica di cellule dendritiche infettate con *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) o *Mycobacterium* (M.) *Tuberculosis*; v) analisi comparativa dei profili di espressione genica di cellule dendritiche da pazienti con *Tuberculosis* (TB) attiva, individui infetti asintomatici e individui sani.

Conformemente alla sua mission, il gruppo di lavoro del LaRiM prevede inoltre di attivare nuove collaborazioni finalizzate a dissezionare le basi molecolari di processi fisio-patologici che caratterizzano la risposta immunitaria nel corso di patologie oncologiche o da infezione con patogeni.

Risultati attesi nel triennio

Il presente progetto si propone di realizzare studi finalizzati a definire profili di espressione genica caratterizzanti le basi molecolari dei processi associati alla risposta immunitaria nel cancro, alle patologie infettive e agli eventi di carcinogenesi nell'ambito di alcune patologie oncologiche come il carcinoma mammario, renale e prostatico. Relativamente ai singoli progetti indicati nella sezione precedente, le finalità attese sono di seguito elencate.

Progetto 1. Gli studi proposti si propongono di definire, in linee cellulari di carcinoma mammario, le vie molecolari correlate alla modulazione dell'antigene tumorale CTCFL in seguito a trattamento combinato di inibitori delle istone-deacetilasi, quali l'apicidina e il depsipeptide, e di farmaci citotossici come il docetaxolo. Il raggiungimento di questo obiettivo

permetterà di valutare se la combinazione di farmaci proposta sia efficace nell'induzione di antigeni tumorali, incluso CTCFL, capaci di stimolare una forte risposta immunitaria tumorale e nel contempo assicurare l'attivazione di processi molecolari che determinano la morte di cellule tumorali, finalità primaria alla base di ogni trattamento antitumorale.

Progetto 2. Il raggiungimento degli obiettivi di questo studio permetterà di valutare le vie molecolari attivate da tre differenti trattamenti farmacologici oggi in uso nella terapia del carcinoma renale. Questi dati verranno correlati a parametri fenotipici e funzionali, con particolare attenzione alla capacità metastatica delle linee cellulari di carcinoma renale usate nello studio, con il duplice intento di definire i meccanismi alla base dell'attività antitumore diretta dei singoli farmaci e di valutare la loro capacità di stimolare l'espressione di molecole in grado di innescare una risposta antitumorale dell'ospite.

Progetto 3. Gli studi avviati nell'ambito di questo progetto si propongono di correlare la diversa modulazione delle vie molecolari operanti in cellule tumorali primarie da pazienti con carcinoma prostatico ai diversi stadi della malattia. Inoltre, lo stesso studio consentirà di correlare marcatori molecolari con parametri diagnostici e prognostici biochimici attualmente in uso e di scoprire nuove potenziali molecole bersaglio di terapie innovative.

Progetto 4. Il raggiungimento degli obiettivi di questo progetto, collocato nell'ambito dell'area di ricerca oggi di grande interesse per il controllo della riemergente infezione da *M. Tuberculosis*, consentirà di valutare le vie molecolari che nelle cellule dendritiche sono associate all'infezione con il micobatterio e di verificare se segnali molecolari differenti vengono attivati dall'agente BCG. L'acquisizione di queste conoscenze permetterà di chiarire alcuni aspetti immunologici correlati alla diversa risposta immune evocata in individui differenti dall'infezione con *M. Tuberculosis* e di delucidare alcuni aspetti molecolari potenzialmente correlati all'efficacia del vaccino BCG nel bambino e alla sua inefficacia nell'adulto.

Progetto 5. Questo progetto, come quello di cui al punto 4, permetterà di delucidare meccanismi immunologici potenzialmente fondamentali per l'attività funzionale di cellule dendritiche e di valutare se la capacità di queste cellule nell'indurre una risposta immune all'infezione con *M. Tuberculosis* rappresenti uno dei fattori determinanti il decorso dell'infezione nell'uomo.

Parallelamente allo svolgimento dei progetti scientifici sopraindicati, si prevede che il servizio di collaborazione e consulenza del LaRiM sugli approcci di *microarray* consentirà lo svolgimento di numerosi progetti, finalizzati a definire profili di espressione genica in studi nel campo biomedico, con un forte impatto sull'avanzamento delle conoscenze sulle base molecolari di processi fisio-patologici.

Trasferibilità dei risultati

La realizzazione dei progetti scientifici nell'ambito del LaRiM consentirà di ottenere nuove e fondamentali acquisizioni riguardo alle basi molecolari di processi immunologici e di cancerogenesi. Questo permetterà l'avanzamento delle conoscenze in aree di patologia a forte impatto sulla salute pubblica, quali il cancro e la TB. Complessivamente, il conseguimento di tali obiettivi sarà fondamentale per la definizione di nuovi parametri di diagnosi e prognosi e nel contempo propedeutico al disegno di nuove ed efficaci strategie terapeutiche sia in campo oncologico che nel trattamento preventivo e terapeutico della TB. Inoltre, la possibilità di accesso al LaRiM, struttura idonea e competitiva nel settore per valore scientifico e sostenibilità, rappresenterà uno strumento unico per approfondire gli aspetti molecolari di ricerche in campo biomedico a forte impatto sulla salute pubblica.

L'adattamento degli animali di allevamento: ricadute su patologie e consumi di farmaci

Scopo dell'UO-ISS è l'applicazione di un approccio di tipo olistico alle tematiche della salvaguardia dello stato di salute e benessere degli animali ad interesse zootecnico, secondo anche le indicazioni che derivano dalle aziende di macellazione e distribuzione dei prodotti per l'alimentazione umana. In tale contesto, l'UO-ISS fornirà una elaborazione critica di evidenze dalla letteratura scientifica riguardo i differenti parametri utilizzati per monitorare il grado di benessere. Tali evidenze saranno utili ai fini di una valutazione quantitativa del rischio, così come anche quelle relative ai metodi e all'identificazione dei periodi critici da monitorare durante il ciclo di vita degli animali zootecnici. La promozione di questi aspetti potrà contribuire a una attività di tipo formativo su vari aspetti teorici e pratici specie-specifici, tenendo presente anche il punto di vista del consumatore.

Risultati attesi nel triennio

La popolazione oggetto di studio sarà il suino, nel duplice indirizzo zootecnico allevamento intensivo vs allevamento estensivo/semibrado e la popolazione delle bovine da latte ad alta produzione nel periodo di transizione.

I risultati attesi sono: i) Analisi critica della letteratura di riferimento. Valutazione olistica (etologica, biochimico-clinica, riproduttiva, immunitaria) dello stato di benessere nei momenti critici. ii) La definizione del budget giornaliero comportamentale individuale delle popolazioni di suini oggetti di studio, aggressività e insorgenza di stereotipie; dosaggio di neurosteroidi e degli ormoni legati ai ritmi circadiani dell'appetito, con riflessi sul sistema riproduttivo e immunitario. iii) Valutazione di interferenze da endocrine disruptors mobilizzati in fase di transizione nella bovina, e acquisizione dei dati biochimico-clinici delle popolazioni oggetto di studio in corrispondenza dei momenti critici, e valutazione incrociata con i profili etologici.

Trasferibilità dei risultati

I risultati scientifici previsti sono una serie di indicazioni etologiche e fisiologiche, indirizzate a un funzionale miglioramento delle condizioni di allevamento dei suini in campo zootecnico.

Questi risultati serviranno a mettere in evidenza il ruolo dell'ISS nella sua competenza nel campo del benessere animale in generale, e non solo limitato alla pratica sperimentale di laboratorio.

La UO-ISS proporrà la redazione di una monografia da pubblicare sui rapporti ISTISAN e/o sugli Annali dell'Istituto, in lingua inglese, per garantire la migliore trasferibilità e divulgazione, anche in ambiente internazionale, dei risultati.

Le statine come potenziali agenti terapeutici per le malattie da prioni e per la malattia di Alzheimer: il ruolo centrale del colesterolo cerebrale nei meccanismi patogenetici

Le statine sono ben noti farmaci anticolesterolemici. Esse possiedono anche un'importante azione di tipo antiinfiammatorio e antiossidante definita pleiotropica colesterolo-indipendente. Recentemente abbiamo dimostrato (Vetrugno, *et al.* JGV, 2009) che il trattamento di topini infettati sperimentalmente con un ceppo di scrapie chiamato 139A con una statina idrofila, la Pravastatina, ne prolungava in assenza di tossicità e in maniera significativa il tempo di sopravvivenza. Intendiamo ora estendere ad altre statine ed a diversi modelli di roditori infettati con prioni, questa ricerca preclinica e validare il potenziale terapeutico di queste molecole, cercando anche di rafforzare la loro azione farmacologica in modelli di terapia combinata.

Risultati attesi nel triennio

La dimostrazione che il trattamento farmacologico con statine è in grado di alterare il metabolismo del colesterolo cerebrale rappresentando una valida strategia terapeutica per molte malattie neurodegenerative in modelli animali delle malattie da prioni, Alzheimer e Parkinson.

Trasferibilità dei risultati

Le statine sono farmaci in commercio da molti anni utilizzati con successo per la prevenzione primaria e secondaria delle malattie cardiovascolari. Una crescente letteratura scientifica propone anche un loro utilizzo nel trattamento acuto delle emorragie cerebrali, ictus e numerose malattie neurodegenerative.

Livelli plasmatici di F2-isoprostano come indicatore di sofferenza fetale in neonati ad alto rischio di danno neurologico

Uno dei maggiori problemi della neurologia pediatrica rimane ad oggi l'identificazione di indicatori biochimici precoci che possano essere utilizzati come predittori dell'esito neurologico nei neonati da gravidanza a rischio, quali le gravidanze pre-termine o gestazioni multiple. La disponibilità di indici precoci del danno neurologico consentirebbe di individuare entro le prime ore dalla nascita, i neonati a rischio e di adottare precocemente strategie neuroprotettive efficaci. Infiammazione e stress ossidativo sono tra le principali cause del danno cerebrale. La perossidazione dei lipidi è uno degli eventi di maggiore entità associati al danno ossidativo nel tessuto cerebrale. Tra i prodotti di perossidazione lipidica, gli isoprostani della classe F2 (F2-Isop) sono considerati indici di elezione per monitorare la condizione di stress ossidativo in molte patologie neurologiche dell'adulto. Più recentemente, questi indici sono stati applicati anche alle patologie del neonato e del bambino e sono stati trovati elevati nel liquido cerebrospinale di neonati prematuri con leucomalacia periventricolare e nel liquido amniotico, dove risultano predittivi di ridotta crescita fetale. Infine, in un modello animale di ipossia perinatale, livelli elevati di F2-Isop nel tessuto cerebrale alla nascita sono associati a alterazioni neurocomportamentali che compaiono nella seconda settimana di vita.

Risultati attesi nel triennio

Sulla base di queste osservazioni, abbiamo iniziato uno studio in collaborazione con il Dipartimento di Pediatria dell'Università di Padova, che prevede la raccolta di campioni di sangue dal cordone ombelicale da bambini nati da gestazioni multiple, per i quali il rischio di prematurità e di ritardo nella crescita fetale è particolarmente alto. Risultati preliminari indicano che i livelli cordonali di 15-F2t-IsoP sono significativamente diversi nei gemelli con discordanza di peso (differenza di peso superiore al 25%), essendo più alti nel gemello di peso inferiore, in linea con l'ipotesi di una associazione tra livelli alti di F2-Isop e sofferenza fetale.

I risultati attesi di questo studio sono la validazione della misurazione di F2-Isop nel plasma cordonale come indice affidabile e sensibile di sofferenza fetale, e come parametro predittivo di possibile sviluppo neuropsicologico anormale, valutato fino ad età pre-scolare.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questo progetto potrebbero contribuire all'identificazione di analisi di laboratorio facilmente trasferibili nella pratica clinica, utili per l'inquadramento diagnostico precoce dei neonati a rischio di danno neurologico e per la scelta della strategia terapeutica opportuna, con possibili ricadute positive per l'SSN.

Malattia Niemann-Pick di tipo C: Identificazione di biomarcatori periferici e sviluppo di nuovi approcci terapeutici basati sulla modulazione dei lipidi di membrana

Nella malattia Niemann-Pick di tipo C (NPC), la mutazione del gene NPC1 porta all'accumulo di colesterolo e sfingomieline negli endosomi. Questa caratteristica è associata con la presenza di grovigli neurofibrillari nel cervello, neurodegenerazione e deficit cognitivi. Il colesterolo è cruciale per la formazione dei microdomini di membrana, i *raft* lipidici, che sono essenziali per la corretta morfologia e la funzione delle sinapsi. Infatti, la valutazione delle proprietà elettrofisiologiche dei neuroni derivanti dai topi *knockout* NPC (NPC^{-/-}), che riproducono molte delle caratteristiche cliniche della patologia umana compresi i deficit cognitivi, ha evidenziato la riduzione dell'induzione/mantenimento del potenziamento a lungo termine (LTP) nella regione CA1 delle fettine di ippocampo dei topi NPC^{-/-} indicando una probabile deplezione delle sinapsi, perdita delle spine dendritiche e instabilità dell'espressione sulla superficie della cellula di recettori, nel modello animale della malattia da noi utilizzato. Obiettivo futuro del presente progetto di ricerca è pertanto quello di studiare i meccanismi molecolari coinvolti nella modificazione della trasmissione sinaptica e dell'induzione/mantenimento dell'LTP, correlato elettrofisiologico dei processi di apprendimento e memoria, osservato nei topi *knockout* NPC (NPC^{-/-}).

Risultati attesi nel triennio

- Identificazione dei meccanismi coinvolti nella modificazione della trasmissione sinaptica e dell'induzione/mantenimento della plasticità sinaptica nei topi NPC^{-/-}.
- Approfondimento del ruolo della perturbazione dei *raft* lipidici nei deficit neurologici presenti nei pazienti NPC.
- Identificazione dei microdomini di membrana come bersaglio terapeutico nel trattamento delle patologie legate allo squilibrio del traffico cellulare dei lipidi.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti, oltre a chiarire il ruolo della disregolazione dei *raft* lipidici nell'insorgenza dei disturbi neurologici associati con l'NPC, potrebbe indicare i microdomini di membrana come bersaglio terapeutico nel trattamento di quelle patologie legate allo squilibrio del traffico cellulare dei lipidi.

Malattie neurodegenerative invalidanti del giovane-adulto e il loro impatto sulla qualità della vita. Studio Pilota su tre grandi tematiche: Sclerosi Laterale Amiotrofica, Corea di Huntington, Demenza di Alzheimer Familiare

Le malattie neurodegenerative interessano primariamente, senza cause apparenti, sistemi neuronali o ampie aree corticali. La loro eziologia è spesso sconosciuta, spesso geneticamente determinata. In generale sono caratterizzate dalla scomparsa progressiva di neuroni o loro assoni nel sistema nervoso centrale e periferico. Tra queste, la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), la malattia di Huntington (MH) e la Demenza Alzheimer di tipo Familiare (FAD), colpiscono una ben precisa tipologia di popolazione quale quella del giovane-adulto. Caratteristiche comuni sono rappresentate dalla rilevanza di una diagnosi precoce e dalla necessità di una assistenza estremamente qualificata nelle fasi avanzate della malattia. La malattia di Alzheimer rappresenta la forma più comune di demenza ed in particolare la forma ad esordio presenile (precoce) di tipo Familiare, appare come una delle maggiori cause di disabilità sociale in età giovanile. La FAD ha un notevole impatto socio-sanitario perché un sempre maggior numero di famiglie ne sono drammaticamente coinvolte, e perché richiede una qualificata rete integrata di servizi sanitari e socio-assistenziali. Nonostante per la maggior parte dei casi sia sporadica e abbia probabilmente un'eziologia multifattoriale (interazione di fattori ambientali e genetici)

esistono forme certamente ereditarie causate da mutazioni in alcuni geni noti quali l'APP (Proteina Precursore della b-amiloide), la Presenilina 1 (PSEN1) e la Presenilina 2 (PSEN2).

Risultati attesi nel triennio

I pazienti affetti da Alzheimer familiare rappresentano una tipologia di paziente più fragile rispetto al paziente sporadico: per l'età, per il coinvolgimento della famiglia nell'assistenza, per la gestione del peso dell'ereditarietà della patologia. Questo progetto ha l'obiettivo del perseguimento: della prevenzione, della diagnosi precoce, degli aspetti etici della comunicazione della diagnosi, della cura e della riabilitazione della disabilità, in tre patologie neurodegenerative invalidanti del giovane-adulto. In particolare viene proposta l'impostazione e la costituzione di un Archivio di casi, al fine di caratterizzare la storia naturale della malattia, dalla diagnosi fino al decesso, in una visione di gestione integrata socio-sanitaria. L'Archivio verrà costituito con il set richiesto dal Registro nazionale delle malattie rare, presso l'ISS.

In particolare lo studio è stato disegnato per:

- L'implementazione di un Archivio italiano/regionale per l'Alzheimer di tipo familiare;
- La verifica dei test per la Diagnosi precoce e la valutazione dell'impatto psicologico e dei risvolti etici di una diagnosi preclinica e di una valutazione del rischio in particolare per la FAD.
- Identificazione degli ostacoli burocratici per la gestione assistenziale delle fasi più avanzate della malattia e delineazione di un percorso *user-friendly* per i pazienti e per i *care-givers*;
- Identificazione, sviluppo e verifica dei presidi tecnologici per le fasi avanzate di malattia.

Trasferibilità dei risultati

- Costituzione di un Archivio sulla SLA, MH e FAD e integrazione con le attività del Registro nazionale delle malattie rare
- Redazione di un documento sulla diagnosi precoce nella SLA, MH e FAD
- Definizione degli indicatori di percorso assistenziale.

Meccanismi biomolecolari e aspetti comportamentali in modelli sperimentali di malattia di Parkinson

Nella pratica clinica si è consolidata l'evidenza che la malattia di Parkinson (MP) presenti disturbi a carattere comportamentale che precedono di anni se non di decenni l'insorgenza dei caratteristici sintomi di tipo neuromotorio. I sintomi comportamentali comprendono alterazioni del ritmo circadiano, eventualmente associate a cambiamenti nel tono dell'umore, sindromi francamente depressive e stati d'ansia che dimostrerebbero un'alterazione nella risposta di coping con stressori sociali e non sociali di varia natura.

Al fine di studiare i meccanismi neuropatologici alla base delle alterazioni comportamentali precoci nella MP, abbiamo di recente sviluppato dei modelli animali in cui viene indotta una lesione parziale e progressiva del sistema dopaminergico mediante iniezione di 6-OHDA (Branchi, *et al. under revision*). Tale modello riproduce alcune delle alterazioni neurochimiche e comportamentali che caratterizzano le prime fasi della MP, quali una diminuzione dei livelli di DA attorno al 40% accompagnata da un'alterazione del comportamento.

Nel presente progetto, si prevede di studiare i suddetti modelli animali mediante un'analisi comportamentale e neurochimica al fine di individuare le basi neurobiologiche dell'insorgenza della MP, anche al fine di porre le basi per lo sviluppo di strategie terapeutiche che intervengono precocemente quando l'efficacia di trattamento è più probabile.

Risultati attesi nel triennio

- Sviluppo di un modello di topo delle fasi precoci della MP e quindi trasferimento su questa specie delle tecniche attualmente disponibili per la specie ratto. Ciò permetterà di combinare tecniche di lesione con tecniche di manipolazione genetica.
- Identificazione di indicatori neurobiologici delle fasi precoci della MP.
- Le questioni bioetiche legate alla sperimentazione animale saranno tenuta in seria considerazione e sarà valutato come migliorare il benessere degli animali utilizzati nella sperimentazione biomedica.

Trasferibilità dei risultati

Modelli animali per lo studio delle fasi iniziali della MP; sviluppo di: i) tecniche innovative di lesione di aree cerebrali specifiche in modelli murini; ii) identificazione di *marker* sensibili per la diagnosi precoce della MP al fine di individuare finestre temporali di maggiore efficacia terapeutica; iii) definizione di linee guida per la riduzione dello stress psicofisico in animali di laboratorio.

Modelli *in vitro* di malattie neurodegenerative. Studio di meccanismi patogenetici e fattori neuroprotettivi nella retinopatia diabetica e nelle malattie da *protein misfolding*

L'attività del nostro gruppo è incentrata sullo studio di modelli *in vitro* di malattie neurodegenerative. Nel prossimo triennio focalizzeremo la nostra attenzione su due patologie: la retinopatia diabetica (RD) e le malattie da *protein misfolding*. Utilizzeremo come modello di RD colture primarie di retina embrionale ed espianti di retina adulta di ratto. Sarà riprodotto il *milieu* diabetico sia attraverso l'uso di alto glucosio, sia mediante prodotti di glicazione proteica, e ne saranno studiati gli effetti sulla componente neurogliale. Tra i fattori neuroprotettivi, analizzeremo: i) la curcumina, sostanza naturale di cui abbiamo descritto le proprietà antieccitotossiche nella retina; ii) il *Pigment Epithelium Derived Factor* (PEDF), la cui attività antiangiogenica e antiinfiammatoria lo rende un potenziale farmaco nella RD. Nell'ambito della neurotossicità delle proteine amiloidee, in collaborazione con il Dipartimento TES, proseguiremo lo studio sulla neurotossicità degli Oligomeri di Calcitonina (OC), un ormone tiroideo che va incontro ad aggregazione e *protein misfolding*, acquisendo caratteristiche neurotossiche. Lo studio si focalizzerà sui meccanismi molecolari alla base dell'interazione tra OC, caratterizzati mediante tecniche biofisiche, e membrane cellulari. Saranno inoltre comparati degli effetti indotti dagli OC sulla cellula neuronale e su cellule di diversa origine.

Risultati attesi nel triennio

Nel campo della RD, analizzeremo l'azione protettiva della curcumina e del PEDF studiandone l'effetto nei modelli *in vitro* descritti. Riguardo la curcumina, viste le sue proprietà antiossidanti e antieccitotossiche, ci aspettiamo una protezione contro il danno indotto dal *milieu* diabetico sulle cellule neuronali, soprattutto in termini di riduzione dell'apoptosi. Proseguiremo inoltre lo studio del suo meccanismo d'azione. Il PEDF, che ha invece un'azione prevalentemente antiinfiammatoria, inibirà verosimilmente l'attivazione della glia di Muller, presente nella retina in corso di diabete, che valuteremo con marcatori in immunocitochimica e *Western blotting*.

Il progetto riguardante gli OC cercherà di individuare quali caratteristiche strutturali della proteina (*misfolding* e oligomerizzazione) e della membrana cellulare (*raft* lipidici, in collaborazione con il Dipartimento EOMM) siano determinanti nei meccanismi di citotossicità. I risultati dello studio comparativo sulla tossicità delle proteine amiloidee in neuroni e cellule di diversa origine saranno correlati a quelli ottenuti sui sistemi modello. Ci aspettiamo di trovare

una maggiore vulnerabilità della cellula neuronale, che possa spiegare l'alta frequenza di queste patologie nell'SNC, rispetto al resto dell'organismo.

Trasferibilità dei risultati

Il diabete mellito è una patologia cronica a larghissima diffusione in Italia e destinata ad aumentare con il progressivo invecchiamento della popolazione. Fra le sue complicanze, l'RD riveste un ruolo di particolare rilevanza in quanto rappresenta la causa più frequente di cecità tra gli adulti. L'identificazione di fattori che prevenano e/o rallentino il danno neuronale in corso di RD rappresenta quindi un obiettivo di importanza fondamentale nell'ambito della salute pubblica, sia in termini di miglioramento della qualità di vita dei pazienti che in temi di riduzione del costo sociale della malattia.

Per quanto riguarda le malattie neurodegenerative da *protein misfolding*, esse includono malattie rare, come le encefalopatie spongiformi, e malattie ad alta prevalenza, come la malattia di Alzheimer. Evidenziare le ragioni che rendono il sistema nervoso centrale particolarmente suscettibile a tali patologie può contribuire ad identificare terapie mirate più efficaci.

Modelli sperimentali di studio dei meccanismi patogenetici della disfunzione retinica neurogliale e vascolare in corso di diabete

Studi recenti hanno dimostrato che in corso di retinopatia diabetica è presente, oltre al danno vascolare, una precoce disfunzione neurogliale che potrebbe rappresentare un evento precoce in grado di causare danno visivo sia direttamente che indirettamente, attraverso le interazioni con le strutture vascolari. Ancora non è noto se si tratti di un evento primario oppure secondario al danno vascolare e quali meccanismi e mediatori entrino in gioco. Tra i meccanismi in gioco particolare attenzione meritano i prodotti avanzati della glicazione (AGE) e tra i mediatori il sistema renina-angiotensina (RAS). Di entrambi è già noto il coinvolgimento nel danno vascolare retinico diabetico, e, in base a studi recenti, si può ipotizzare un loro ruolo nel danno neurogliale.

La nostra attività di ricerca è finalizzata allo studio di modelli sperimentali *ex vivo* e *in vivo* che consentano di identificare meccanismi patogenetici operanti nel danno diabetico neurogliale/vascolare retinico. In particolare, in collaborazione con il Reparto di Neurobiologia sperimentale del Dipartimento BCN, saranno utilizzati come modelli sperimentali espunti retinici di ratto esposti al *milieu* diabetico e ratti Sprague-Dawley resi sperimentalmente diabetici. In entrambi i modelli si procederà alla valutazione del ruolo della glicazione non enzimatica e di RAS nelle alterazioni del *signalling* intracellulare correlato all'attivazione di mediatori attivi sul comparto neuro gliale e vascolare.

Risultati attesi nel triennio

Il ruolo della glicazione non enzimatica e di RAS nel danno neurogliale retinico verrà studiato attraverso l'analisi delle modificazioni del segnale intracellulare legate a fattori di trascrizione che regolano la sopravvivenza neuronale e l'attivazione gliale, allo scopo di esaminare le modificazioni indotte dal *milieu* diabetico. L'utilizzo di diversi modelli sperimentali permetterà di stabilire la correlazione tra queste modificazioni e il tempo di esposizione al diabete o alle alterazioni metaboliche correlate all'eccessiva disponibilità di glucosio, permettendo, così, di discriminare gli eventi neuro gliali e vascolari in base alla sequenza temporale. I risultati di questa linea di ricerca potrebbero: i) contribuire alla comprensione dei meccanismi che sono alla base della retinopatia diabetica e del ruolo dell'eccesso di glucosio in tali eventi; ii) indicare potenziali interventi basati sulla manipolazione di queste vie.

Trasferibilità dei risultati

I dati epidemiologici disponibili contano un aumento sia in termini di incidenza che di prevalenza del diabete, stimando un numero pari a 300 milioni di malati nel 2025. Questa cosiddetta “epidemia” di diabete sembra legata a diversi fattori tra cui il cambiamento dello stile di vita e delle condizioni ambientali, ma anche al prolungamento della vita dei malati con il conseguente aumento delle complicanze croniche, rappresentando una vera emergenza socio-sanitaria. Il diabete, infatti, rappresenta la prima causa di cecità nella popolazione in età lavorativa, di amputazioni degli arti inferiori, di danno renale e neurologico, e uno dei principali fattori di rischio per malattie cardiovascolari. Gli studi dedicati alla comprensione dei meccanismi patogenetici delle complicanze del diabete hanno lo scopo di aprire nuove strade per la prevenzione e il trattamento di complicanze invalidanti, che costituiscono una delle principali cause di mortalità e morbilità nei Paesi industrializzati.

Modelli sperimentali *in vivo* e *in vitro* per lo studio degli interferenti tiroidei

Gli studi condotti per accertare l'effetto degli interferenti endocrini sulla salute umana hanno dimostrato che la tiroide è un organo sensibile all'azione di tali sostanze. La maggior parte delle informazioni a riguardo derivano da studi condotti su modelli sperimentali esposti ad alte dosi di interferenti tiroidei (IT) o da studi condotti su soggetti professionalmente esposti. Risultano, quindi, inesplorati gli effetti che esposizioni a basse dosi di miscele di IT possono avere sulla popolazione generale e, visto il ruolo fondamentale svolto dagli ormoni tiroidei nello sviluppo del sistema nervoso centrale e nel mantenimento della omeostasi metabolica nell'adulto, su segmenti di popolazione particolarmente suscettibili come le donne in gravidanza e i bambini. L'impiego di modelli sperimentali consente quindi di valutare l'impatto di una esposizione cronica a basse dosi di miscele di IT (scenario reale di esposizione) in fasi critiche dello sviluppo (modelli *in vivo*), quali la gestazione e l'infanzia, e di identificare nuovi possibili meccanismi d'azione attraverso i quali gli IT possono agire (modelli *in vitro*). In tale ambito le attività previste riguarderanno: i) uno studio *in vivo* condotto su ratte gravide e relativa generazione F1 esposti a basse dosi di una miscela di pesticidi di ampio utilizzo; verrà, inoltre, valutato il possibile effetto cumulativo della simultanea esposizione a dieta iodocarente; ii) uno studio *in vitro* condotto su linee cellulari esposte alla stessa miscela di IT e colture primarie di tireociti di ratto ottenute dallo studio *in vivo*.

Risultati attesi nel triennio

Risultati preliminari ottenuti da studi condotti su modelli sperimentali *in vivo* esposti pre- e post-natalmente a singoli pesticidi supportano l'ipotesi che l'esposizione cronica a basse dosi a tali sostanze induce alterazioni della funzione tiroidea nelle madri e nella generazione F1. Pertanto, attraverso la realizzazione dello studio *in vivo* sopra descritto sarà possibile: i) verificare i possibili effetti additivi/sinergici sulla funzione tiroidea dell'esposizione cronica a basse dosi di una miscela di Etilenbisditiocarbammati, clorpyrifos e metil-tiofanato nelle ratte gravide in fasi critiche dello sviluppo pre- e post-natale; ii) verificare il possibile effetto cumulativo dell'esposizione simultanea a dieta iodocarente e alla miscela di IT.

I risultati attesi dalla realizzazione dello studio *in vitro*, che verrà condotto su cellule FRTL-5 esposte alla stessa miscela di pesticidi riguarderanno la possibilità di mettere a punto un nuovo modello sperimentale *in vitro* per: i) valutare l'*up-take* dello Iodio, la produzione di Tireoglobulina e la capacità cellulare di sopravvivere all'insulto; ii) identificare ulteriori sostanze con potenziale azione tireostatica. Inoltre, attraverso l'impiego di colture primarie di cellule tiroidee isolate dagli animali utilizzati nello studio precedentemente descritto, si avrà la possibilità di verificare il possibile mantenimento della memoria del danno cellulare.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questo studio contribuiranno ad aumentare le conoscenze sul reale impatto sulla salute dell'esposizione cronica ad una miscela di IT in soggetti ad alto rischio 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, i risultati che deriveranno dallo studio *in vivo* potranno essere trasferiti all'SSN in termini di identificazione di nuovi marcatori di esposizione e di effetto da utilizzare nelle attività di biomonitoraggio nell'ambito delle patologie tiroidee, e di individuazione di fasi critiche dello sviluppo particolarmente vulnerabili. Inoltre, la messa a punto di un nuovo modello sperimentale *in vitro* consentirà di trasferire nuove conoscenze in merito a nuovi meccanismi attraverso i quali gli IT svolgono il loro ruolo e di identificare nuovi interferenti tiroidei.

Monitoraggio non invasivo mediante Risonanza Magnetica *in vivo* della risposta di tumori sperimentali a terapie mirate: valutazione di nuovi *end-point* farmacologici

Gli studi sulle anomalie nel metabolismo di fosfolipidi, lipidi e aminoacidi in tumori umani, studiate da alcuni anni nel reparto di *Imaging* Molecolare e Cellulare (ICM) con tecniche di spettroscopia di risonanza magnetica (MRS) consentono di identificare nuovi indicatori di progressione tumorale e di risposta al trattamento e di progettare strategie terapeutiche mirate. Il progetto si propone di valutare il significato di alterazioni nelle immagini di risonanza magnetica (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 del ciclo della fosfatidilcolina. Le caratteristiche anatomico-morfologiche dei tumori saranno studiate con tecniche di fast-MRI. Misure di parametri funzionali (coefficiente di diffusione apparente (ADC) e perfusione) saranno ottenute mediante *imaging* quantitativo.

Gli studi saranno condotti su modelli sperimentali di tumori umani altamente invasivi quali il carcinoma ovarico (k-Ov), mammario (k-Br) e melanomi. Le misure *in vivo* saranno integrate da analisi MRS *in vitro* in alta risoluzione su colture cellulari, prelievi tissutali intatti (con tecniche all'angolo magico) e loro estratti in fase acquosa o organica. Alcuni studi comprenderanno anche misure di pH extracellulare tumorale *in vivo* e sue alterazioni indotte da inibitori delle pompe protoniche al fine di evidenziare il ruolo del pH nella risposta a terapie.

Risultati attesi nel triennio

- Caratterizzazione mediante MRS *in vivo* dei profili metabolici di modelli sottocutanei e ortotopici di carcinoma ovarico e mammario in topi immunodeficienti, 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 k-Ov e k-Br 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 k-Ov e k-Br in topi immunodeficienti.
- Valutazione mediante MRS *in vivo* del ruolo di modulazioni del pH extracellulare nella risposta di tumori sperimentali a terapie convenzionali e immunoterapia.

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.

Neurobiologia del complesso di glicoproteine proteine-associate alla distrofina (DGC): organizzazione molecolare e funzionale e ruolo in neuropatologie

L'attività di ricerca è da tempo focalizzata a chiarire il ruolo della distrofina e delle proteine ad essa associate nel sistema nervoso centrale e autonomo, a definire le interazioni intramolecolari nelle cellule neuronali e gliali e a caratterizzare i componenti del DGC coinvolti negli eventi cellulari attivati in processi neurodegenerativi e da alterazioni dell'adesione cellula-matrice extracellulare. La funzione del DGC è stata studiata in patologie muscolari (distrofia muscolare di Duchenne, distrofie muscolari congenite ecc.) ma la presenza di alterazioni cognitive, disabilità nell'apprendimento e un'augmentata incidenza di alcune malattie neuropsichiatriche e disturbi comportamentali in questi pazienti suggerisce un importante ruolo del DGC nel sistema nervoso. Nei neuroni la distrofina e il DGC partecipano alle densità postsinaptiche all'organizzazione e stabilizzazione di recettori colinergici e GABAergici. Durante lo sviluppo il distroglicano come recettore della matrice extracellulare controlla, tra le altre cose, la migrazione neuronale durante lo sviluppo del cervello e cervelletto. Nella glia, il DGC è coinvolto nell'organizzazione di complessi proteici con funzione recettoriale, di canali o trasporto, che mediano processi di omeostasi del fluido cerebrospinale.

Risultati attesi nel triennio

Dagli studi biochimici con proteine ricombinanti si otterranno informazioni sui determinanti molecolari che regolano le interazioni proteina-proteina. Utilizzando animali modello di distrofie muscolari (topi mdx, che mancano di distrofina ed è un modello di distrofia muscolare di Duchenne, e topi dy/dy che mancano di laminina2 e rappresentano un modello di distrofia muscolare congenita con alterazioni neuronali) si otterranno informazioni sulla localizzazione nelle diverse aree cerebrali e nei gangli simpatici dei componenti specifici del DGC; informazioni sul loro ruolo nei meccanismi molecolari alla base dei processi di plasticità sinaptica si otterranno studiando come modello sperimentale i gangli cervicali simpatici (sia di ratto che di topi distrofici e di controllo) sottoposti a danno assonale o a denervazione. La funzione gliale del DGC verrà studiata in colture primarie di astrociti di ratto in diverse condizioni sperimentali. I risultati di questo studio potranno aiutare a capire come componenti il DGC partecipano ai meccanismi molecolari che concorrono all'instaurarsi di patologie neurodegenerative.

Trasferibilità dei risultati

Questo studio, focalizzato a chiarire il ruolo fisiopatologico del complesso di proteine associate alla distrofina, potrà portare all'identificazione di nuovi bersagli molecolari e vie di trasduzione del segnale quali potenziali siti per strategie neuroprotettive e fornire indicazioni utili per nuove possibili trattamenti terapeutici. I risultati ottenuti saranno inviati per le pubblicazioni a riviste scientifiche internazionali.

Nuove strategie per lo sviluppo di vaccini antitumorali basati su cellule dendritiche e per la combinazione efficace di immunoterapia e chemioterapia

Il progetto afferisce al Programma Integrato Oncologia “Terapie cellulari e molecolari innovative” coordinato dalla Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor (Programma Straordinario Oncologia del Ministero della Salute, DM 21 luglio 2006).

La finalità generale del progetto, che vede la partecipazione di sei Unità Operative (UO), è quella di delucidare i meccanismi alla base di processi cellulari e molecolari attivi in cellule tumorali e/o immuni e di caratterizzare nuove molecole, il cui uso può essere funzionale al disegno di nuovi vaccini basati sull'utilizzo di cellule dendritiche (DC) e di strategie innovative di combinazione di immunoterapia e chemioterapia.

Le UO partecipanti sono elencate di seguito.

UO 1. “*Novel DC-based cancer vaccines*” (Coordinatore Scientifico Dott.ssa Maria Ferrantini, ISS).

UO 2. “*New drugs for cross-presentation*” (Coordinatore Scientifico Prof. Vincenzo Barnaba, Università Sapienza, Roma).

UO 3. “*Neonatal T lymphocytes*” (Coordinatore Scientifico Dott. Giovanni Migliaccio, ISS).

UO 4. “*Silencing IRFs in DC and Treg cells*” (Coordinatore Scientifico Dott.ssa Lucia Gabriele, ISS).

UO 5. “*Preclinical DC vaccines for CRC*” (Coordinatore Scientifico Dott.ssa Annalucia Serafino, CNR).

UO 6. “*Pre-clinical studies in mouse models of spontaneous mammary adenocarcinoma for the definition of novel strategies of effective combination of adoptive immunotherapy with chemotherapy.*” (Coordinatore Scientifico Dott. Enrico Proietti, ISS).

Risultati attesi nel triennio

I seguenti risultati principali sono attesi per il progetto nel suo complesso.

- Sviluppo di strumenti e strategie per la generazione di tipi di DC dotate di proprietà funzionali ottimali per l'induzione e il mantenimento di una risposta immune antitumorale effettrice e di memoria.
- Disegno e valutazione in modelli pre-clinici di nuovi approcci per la manipolazione di cellule T reg umane, efficaci nel favorire l'induzione di una risposta immune protettiva rispetto alla tolleranza immunologica.
- Valutazione del potenziale di BORIS/CTCFI come TAA candidato per l'utilizzo in protocolli di immunoterapia del cancro.
- Identificazione di nuovi composti e fattori biologici da utilizzare come adiuvanti per lo sviluppo di vaccini antitumorali.
- Definizione di protocolli per l'espansione *in vitro* di linfociti T neonatali a specificità antigenica nota, quale prodotto medicinale innovativo da impiegare in *Donor Lymphocyte Infusion* o nel trattamento con linfociti T citotossici di soggetti trapiantati con sangue cordonale e CMV- e/o EBV-positivi al momento del trapianto.
- Definizione in modelli pre-clinici delle strategie ottimali per una efficace combinazione di vaccini antitumorali e/o trasferimento adottivo di linfociti con la chemioterapia.
- Acquisizione di nuove conoscenze sui meccanismi responsabili dell'effetto terapeutico di strategie di combinazione di chemioterapia e immunoterapia.

Trasferibilità dei risultati

I risultati attesi sono potenzialmente trasferibili al Servizio Sanitario Nazionale attraverso l'introduzione di prodotti medicinali innovativi (nuovi adiuvanti, incluse DC come adiuvanti cellulari, vaccini antitumorali basati su DC o su nuovi TAA, linfociti neonatali espansi *in vitro*). La definizione di nuove strategie per una efficace combinazione della vaccinazione antitumorale

e/o del trasferimento adottivo di linfociti con la chemioterapia avranno effetti positivi in termini di un nuovo e più efficace utilizzo di agenti chemioterapici, con una ricaduta positiva per l'SSN.

I risultati attesi hanno inoltre il potenziale di dare origine a brevetti, con particolare riguardo a: i) metodi e reagenti per l'espansione *in vitro* di linfociti T neonatali; ii) vaccini antitumorali; iii) adiuvanti per vaccini; iv) TAA.

Patogenesi, diagnosi e terapia della sclerosi multipla alla luce di ipotesi emergenti sul ruolo di alterate interazioni tra geni e ambiente nello sviluppo della malattia

L'ISS avvierà le attività di coordinamento e di ricerca del progetto, al quale afferiscono 12 gruppi di ricerca, 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" esplorerà il coinvolgimento nella SM del virus di Epstein-Barr e di elementi retrovirali, e i processi di attivazione immunitaria cronica. Nel progetto "Genetica ed epidemiologia" verrà studiata l'associazione tra rischio di sviluppare la SM e geni che regolano la risposta immunitaria, e saranno effettuate indagini epidemiologiche su possibili associazioni tra SM, infezioni e malattie allergiche. Il progetto "Marcatori biologici e diagnosi" si avvarrà 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, e di valutare l'efficacia e la tossicità di nuovi trattamenti per le forme maligne e progressive di SM e di possibili terapie antivirali.

Risultati attesi nel triennio

Acquisire informazioni sui fattori predisponenti alla SM (genetici e ambientali), identificare nuovi marcatori diagnostici e prognostici, contribuire al disegno di terapie preventive, e acquisire 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.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti saranno di interesse per ricercatori e pazienti in quanto contribuiranno ad aumentare le conoscenze sulle relazioni tra varianti geniche, risposta ad agenti infettivi e meccanismi di disregolazione della risposta immunitaria nella SM, e per l'SSN interessato ad integrare il rapporto beneficio/rischio delle terapie in uso con una valutazione delle risorse e dei costi.

Promozione della ricerca sulle bioterapie dei tumori attraverso la promozione della comunicazione. Comunicazione esterna

La presente attività afferisce al progetto "Rete nazionale per studi clinici e di strutture GMP per le bioterapie dei tumori", e prevede l'attuazione di iniziative atte a promuovere la comunicazione tra la rete italiana partecipante al progetto e gli altri referenti che a livello nazionale e internazionale sono coinvolti nel settore delle bioterapie dei tumori.

L'attività prevede l'organizzazione di convegni per la presentazione e la discussione di risultati della ricerca di base, traslazionale e clinica nel settore dell'immunobiologia dei tumori e della bio-immunoterapia del cancro. Verrà data particolare attenzione ad aspetti cruciali per il progresso del settore, quali:

- la formazione di figure professionali in grado di eseguire tutte le fasi necessarie alla conduzione di una sperimentazione clinica di bioterapia del cancro in conformità alle linee guida esistenti o che verranno elaborate a livello nazionale ed europeo;
- la definizione dei piani di sviluppo pre-clinico e clinico di particolari tipi di biofarmaci;
- i criteri, le metodologie, l'organizzazione infrastrutturale per la gestione e condivisione dei dati derivanti dagli studi clinici;
- l'ottimizzazione della interazione con l'industria a livello nazionale ed europeo.

Nella pianificazione di tali eventi verranno recepite le indicazioni derivanti dall'attività della UO 1 di questo WP dedicata alla comunicazione interna alla rete e quindi, per suo tramite, dagli altri WP del presente progetto.

Risultati attesi nel triennio

L'attività descritta di promozione della comunicazione contribuirà a:

- stimolare il dibattito su aspetti cruciali della ricerca nel settore delle bioterapie dei tumori e a definire posizioni di consenso sulle iniziative da intraprendere per rendere più efficiente e coordinato il processo di trasferimento dei risultati della ricerca in applicazioni cliniche;
- promuovere la diffusione dell'informazione ai pazienti e alla comunità in generale sulle nuove strategie terapeutiche antitumorali basate su prodotti biologici.

È prevista l'elaborazione di documenti consensus che verranno diffusi a quelle istituzioni, agenzie ed enti pubblici e privati, nazionali ed internazionali che si riterrà opportuno coinvolgere. Per alcuni aspetti e temi particolari, è possibile prevedere anche la comunicazione alla stampa.

I risultati conseguiti dal presente progetto alla sua conclusione verranno inoltre elaborati in documenti, nella forma che verrà ritenuta più adeguata per i diversi aspetti o temi (articoli, rapporti tecnici, editoriali), che la rete come tale sottometterà a riviste scientifiche nazionali e internazionali.

Trasferibilità dei risultati

I risultati prodotti dall'attività di comunicazione verranno trasferiti a tutti gli attori rilevanti e alla comunità in generale attraverso l'elaborazione di documenti, proposte di linee guida, e articoli.

Proteomica

La spettrometria di massa per l'indagine delle proteine è stata utilizzata dal gruppo sin dal 2002. Le indagini in corso e previste includono la ricerca di biomarcatori precoci della malattia di Creutzfeldt-Jakob con metodi di sieroproteomica, l'indagine sistematica delle componenti strutturali e regolatrici della cromatina e l'analisi di complessi contenenti le ciclina D nel muscolo scheletrico. Continuerà inoltre 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 verranno trasferiti all'SSN.

Ruolo del recettore purinergico P2Y12 nel processo di attivazione microgliale

Le cellule microgliali rappresentano la principale popolazione macrofagica del sistema nervoso centrale (SNC), e sono coinvolte nella risposta immunitaria e infiammatoria verso insulti di varia natura, sia endogena che esogena. Numerose patologie dell'SNC sono caratterizzate da una precoce risposta microgliale che consiste nel rapido cambiamento della morfologia, nella proliferazione e migrazione verso il sito di lesione, e nella sintesi e rilascio di citochine, fattori di crescita e mediatori solubili che permettono di innescare e sostenere una risposta infiammatoria.

È stato recentemente dimostrato che i recettori purinergici P2Y sono coinvolti nei meccanismi che controllano l'attivazione delle cellule microgliali in seguito a danno cerebrale. In particolare, la stimolazione del recettore metabotropico P2Y12 da parte dei nucleotidi ATP e ADP induce una rapida risposta di chemiotassi durante le prime fasi della risposta microgliale al danno cerebrale. L'espressione del recettore viene poi spenta nel corso del processo di attivazione microgliale. Abbiamo recentemente osservato che la stimolazione acuta di cellule microgliali con agenti pro- o anti-infiammatori regola in misura diversa l'espressione del messaggero per il recettore P2Y12 e la risposta chemiotattica indotta dal nucleotide ADP.

Risultati attesi nel triennio

Si intende approfondire lo studio della regolazione del recettore P2Y12 nelle diverse fasi del processo di attivazione microgliale, attraverso la caratterizzazione biochimica e funzionale del recettore in diversi paradigmi di attivazione microgliale. Verranno impiegate colture purificate di cellule microgliali e co-culture di cellule microgliali e neuronali, correntemente utilizzate nel nostro laboratorio. Verranno impiegate tecniche di estrazione di RNA e *real time* PCR per studiare l'espressione dei geni in esame; un saggio di migrazione cellulare per valutare, nelle varie condizioni sperimentali, la risposta funzionale all'attivazione del recettore P2Y12; saggi immuno-enzimatici per individuare eventuali marcatori rilasciati dalle cellule microgliali nei diversi stati di attivazione.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti dagli studi *in vitro* dovranno essere validati in modelli più complessi di patologie neurodegenerative in cui la componente infiammatoria è preponderante. La caratterizzazione degli effetti di specifici agonisti e/o antagonisti del recettore P2Y12 potrebbe portare all'identificazione di strategie terapeutiche mirate alla modulazione della risposta infiammatoria.

Ruolo dell'ipertensione arteriosa nell'induzione del danno cerebrovascolare: meccanismi molecolari

L'identificazione di fattori di rischio per l'insorgenza e la progressione della demenza e in particolare della forma sporadica malattia di Alzheimer (MA) è cruciale per la comprensione dei meccanismi patogenetici della demenza e lo sviluppo di terapie efficaci. Numerose evidenze cliniche e sperimentali indicano che l'ipertensione esercita effetti dannosi sulla circolazione cerebrale, favorendo l'instaurarsi di una condizione di ipoperfusione, mettendo a rischio il necessario approvvigionamento energetico del tessuto cerebrale. Tuttavia, la dimostrazione di una relazione di causalità tra ipertensione e MA non è stata ancora fornita. Allo scopo di comprendere meglio tale relazione, abbiamo avviato uno studio che utilizza un modello di ipertensione nel topo adulto ottenuta mediante coartazione dell'aorta traversa (*Transverse Aorta Coarctation*, TAC), in cui la persistente ipertensione causa dopo alcune settimane, ipoperfusione cerebrale e formazione di depositi amiloidei nel parenchima e attorno ai vasi cerebrali della corteccia frontale e dell'ippocampo. In queste aree cerebrali abbiamo osservato una rapida reazione della microglia, la principale popolazione macrofagica del cervello, e

l'aumento dell'espressione di alcune citochine infiammatorie, che precedono l'accumulo di beta-amiloide, suggerendo che eventi di tipo infiammatorio, probabilmente mediati dall'unità neuro vascolare, siano importanti per l'accumulo di beta amiloide e l'istaurasi della patologia .

Risultati attesi nel triennio

In collaborazione con l'IRCCS Neuromed (prof. Lembo), intendiamo approfondire lo studio di questo modello di ipertensione focalizzandoci su: i) il ruolo dell'infiammazione e dello stress ossidativo nel danno associato all'ipoperfusione cerebrale; ii) il ruolo dell'"unità neurovascolare" costituita da neuroni, astrociti e dalle cellule endoteliali dei microvasi cerebrali nella formazione dei depositi di beta-amiloide; iii) i fenomeni neurodegenerativi e gli effetti a livello comportamentale ad essi associati; iv) gli effetti di condizioni di stress aggiuntivi, quali stimoli infiammatori sistemici o stress psicologici sulla progressione della patologia a livello cerebrale. I risultati di questo studio porteranno ad una migliore comprensione degli eventi coinvolti nell'insorgenza della MA in forma sporadica e potranno essere impiegati per lo sviluppo di paradigmi sperimentali più complessi, propedeutici all'identificazione di nuovi bersagli farmacologici per prevenire e/o rallentare i processi neurodegenerativi alla base della MA.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti dal modello animale dovranno essere validati nella patologia umana sia attraverso studi di tipo epidemiologico, in cui l'ipertensione venga analizzata come fattore di rischio per l'insorgenza di demenza e in particolare di MA, sia con studi istopatologici su materiale umano *post-mortem* in cui vengano confermate le alterazioni riscontrate nel modello animale. Se confermati i risultati potranno essere impiegati per sviluppare strategie di intervento per prevenire e/o rallentare i processi neurodegenerativi alla base della MA.

Ruolo della Distrobrevina, una proteina del complesso associato alla distrofina, nel trasporto intracellulare, trasduzione del segnale e differenziamento neuronale

Diverse forme di distrofia muscolare sono causate da mutazioni in proteine del complesso associato alla distrofina (DPC), un complesso di membrana che connette il citoscheletro alla matrice extracellulare ed è coinvolto nella trasduzione del segnale. Il DPC è espresso anche nel cervello, oltre che nel muscolo, e il consistente numero di pazienti distrofici con deficit cognitivi e disordini neuropsichiatrici ha portato ad ipotizzare un suo coinvolgimento nelle funzioni cerebrali.

Nel nostro laboratorio abbiamo dimostrato che alcune componenti del DPC, le distrobrevine alfa e beta, sono coinvolte nel trasporto intracellulare e nella trasduzione del segnale, rispettivamente attraverso le interazioni con la chinesina (Macioce, *et al. J Cell Sci* 2003), e con la protein chinasi A (PKA; Ceccarini, *et al. J Mol Biol* 2005; Ceccarini, *et al. J Mol Biol* 2007). Abbiamo inoltre descritto l'associazione specifica tra distrobrevina beta e una glicoproteina dei neuroni corticali coinvolta nella neurogenesi, la pancortina (Veroni, *et al. J Neurosci Res* 2007). I dati da noi pubblicati suggeriscono che la distrobrevina, oltre al suo ruolo nel DPC, sia coinvolta in altre funzioni cellulari fondamentali: lo scopo del progetto sarà contribuire a chiarire le interazioni ed il ruolo del complesso DPC, e della distrobrevina, nel sistema nervoso in situazioni fisiologiche e patologiche.

Risultati attesi nel triennio

Le modalità di interazione della distrobrevina con la chinesina e con la PKA suggeriscono che la fosforilazione possa avere un ruolo nella regolazione del trasporto intracellulare 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 possedendone interamente

le caratteristiche. Nel progetto ci proponiamo di 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 più approfondita dei meccanismi di trasduzione del segnale.

Lo screening di una libreria di cDNA da cervello di topo condotto nel nostro laboratorio ha evidenziato l'associazione specifica tra isoforma beta della distrobrevina e iBRAF, una HMG-domain protein coinvolta nei meccanismi epigenetici, la cui espressione contribuisce a superare gli effetti repressivi del *silencer* REST e ad avviare il programma di differenziamento neuronale. Un altro partner specifico della beta-distrobrevina da noi descritto, la pancortina, sembra coinvolto nello sviluppo del cervello. Il secondo obiettivo del progetto consisterà nel caratterizzare l'interazione della beta-distrobrevina con iBRAF dal punto di vista strutturale e funzionale, allo scopo di chiarire se la distrobrevina abbia, come suggerito dalla sua interazione con iBRAF e pancortina, un ruolo effettivo nella neurogenesi e nello sviluppo cerebrale.

Trasferibilità dei risultati

Poiché si tratta di ricerca di base, le sue applicazioni non saranno immediatamente trasferibili alla sanità pubblica. Ciò nonostante il progetto potrebbe contribuire in maniera significativa a chiarire il ruolo del DPC, e in particolare della distrobrevina, nel trasporto intracellulare, nella trasduzione del segnale e nel differenziamento neuronale. I risultati, che saranno inviati per la pubblicazione a riviste internazionali, aiuteranno a chiarire i meccanismi patogenetici alla base dei disordini muscolari e neurologici associati alla distrofia muscolare, 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.

Ruolo della DNA-dependent protein kinase nella degenerazione neuronale e nella plasticità sinaptica

La DNA-PK è una serina/treonina chinasi essenziale per il riparo delle rotture a doppio filamento del DNA (DSB). Diversi studi evidenziano una significativa diminuzione dei livelli proteici della DNA-PK, che si correla con una ridotta attività di riparo del DNA, nella corteccia di pazienti affetti da malattia di Alzheimer (AD). Tali osservazioni delineano la DNA-PK come un potenziale biomarcatore per la diagnosi e per il monitoraggio di AD. Obiettivo del presente progetto è pertanto la valutazione della DNA-PK come marcatore di AD nei fluidi biologici. A tale scopo sarà effettuata un'analisi dei livelli proteici della DNA-PK sia in cellule mononucleate derivanti dal sangue periferico (PBMC) sia nel siero proveniente da pazienti AD.

Al fine di valutare se la riduzione dei livelli proteici della DNA-PK osservata nella corteccia di pazienti AD possa essere almeno in parte responsabile della riduzione della plasticità neuronale osservata in modelli animali di AD, sono stati effettuati esperimenti per analizzare la *Long Term Potentiation* (LTP), correlato elettrofisiologico dei processi di apprendimento e memoria, in topi mutanti per la DNA-PK (*scid*) e in topi di controllo. Poiché l'analisi dei fenomeni di plasticità sinaptica ippocampale ha dimostrato che l'LTP è compromessa nei topi *scid*, obiettivo futuro sarà quello di identificare l'interazione diretta della DNA-PK con molecole chiave per il corretto funzionamento delle attività sinaptiche.

Risultati attesi nel triennio

- Identificazione della DNA-PK come marcatore periferico della malattia di Alzheimer.
- Approfondimento del ruolo delle proteine coinvolte nei meccanismi di riparo del DNA nella malattia di Alzheimer.
- Identificazione di un nuovo ruolo della DNA-PK nella plasticità neuronale.
- Identificazione di substrati specifici fosforilati dalla DNA-PK nelle membrane sinaptiche.

Trasferibilità dei risultati

- Definizione di procedure diagnostiche e predittive di AD del tipo illustrato dall'SSN.
- Identificazione di nuovi *marker* biochimici per la diagnosi di AD.

Ruolo delle cellule gliali nella patogenesi della Sclerosi Laterale Amiotrofica: aminoacidi a catena ramificata, eccitotossicità glutamatergica e stress ossidativo

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una patologia neurodegenerativa che colpisce in età adulta ed è caratterizzata dalla perdita dei motoneuroni corticali, bulbari e spinali. Numerose evidenze indicano che le cellule gliali, quali astrociti e microglia, contribuiscano all'insorgenza e alla progressione della malattia. È stato ipotizzato che tale contributo si realizzi sia attraverso un danno sia eccitotossico, dovuto al malfunzionamento dei meccanismi astrocitari di recupero del glutammato, che ossidativo, dovuto principalmente ad una incontrollata attivazione microgliale. Recenti studi epidemiologici hanno evidenziato un elevato rischio di SLA per i calciatori professionisti italiani; tutti i casi osservati sono sporadici, lasciando ipotizzare che l'eventuale 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 aminoacidi a catena ramificata (AACR) 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, condotto in collaborazione con il Reparto di Neurobiologia molecolare, è di valutare l'impatto della sovra-esposizione a AACR sul sistema glutamatergico e sui livelli di stress ossidativo in modelli sperimentali *in vitro*.

Risultati attesi nel triennio

L'assunzione cronica di AACR (leucina, isoleucina e valina) potrebbe influenzare significativamente la sopravvivenza dei motoneuroni, in quanto capace di: i) interferire con la sintesi/captazione del glutammico, ii) condizionare la produzione e rilascio di citochine di tipo pro-infiammatorio, iii) di interferire con il metabolismo mitocondriale, riconosciuto come possibile fattore coinvolto nel processo d'attivazione macrofagico/microgliale. Intendiamo quindi verificare le ipotesi sopraesposte valutando gli effetti di una esposizione cronica a AACR in modelli sperimentali *in vitro*, quali colture purificate di astrociti e microglia e co-colture di neuroni e cellule gliali.

Trasferibilità dei risultati

I risultati dello studio contribuiranno a verificare l'ipotesi che gli AACR, abitualmente assunti in dosi massicce dai calciatori come integratori alimentari, possano contribuire ad aumentare il rischio di SLA in questi soggetti e porranno le basi per studi in modelli più complessi, quali modelli animali di SLA familiare.

Ruolo delle chemochine nella biologia del monocita/macrofago e nell'infezione da HIV-1

I monociti/macrofagi svolgono un ruolo importante nell'immunità dell'ospite. Infatti, queste cellule sono in grado di iniziare, attraverso la fagocitosi di patogeni, la risposta immune innata e di reclutare e attivare effettori cellulari dell'immunità acquisita. Inoltre, i monociti/macrofagi sono sia produttori sia bersagli cellulari di mediatori solubili della risposta immune, quali chemochine e citochine. Questi fattori solubili, insieme a prodotti microbici, sono in grado di modulare in modo differenziale le funzioni macrofagiche, dando luogo a diverse popolazioni cellulari con funzioni distinte. In particolare, l'espressione differenziale di alcune chemochine

nei macrofagi è in grado di dirigere queste cellule verso circuiti polarizzati di resistenza o promozione nei confronti di patogeni, tumori, infiammazione. Sulla base di tali considerazioni e di studi precedenti del nostro gruppo, l'obiettivo principale del progetto è caratterizzare il ruolo svolto da alcune chemochine, in particolare CCL2 e CCL1, nelle funzioni di queste cellule e i circuiti regolatori coinvolti. Il progetto è focalizzato su: i) studio dei meccanismi cellulari e molecolari che regolano l'espressione di CCL1 e CCL2 nel monocita/macrofago; ii) studio del ruolo di queste chemochine nella regolazione dell'espressione di altri fattori solubili e nelle funzioni macrofagiche; iii) studio del ruolo svolto da CCL2 e CCL1 in un modello di malattia infettiva quale l'infezione da HIV-1 nel macrofago.

Risultati attesi nel triennio

Gli studi proposti porteranno ad una dettagliata caratterizzazione della regolazione dell'espressione di CCL1 e CCL2, chemochine la cui produzione è stata associata con diverse forme di attivazione dei monociti/macrofagi, e del ruolo che esse svolgono nella regolazione delle funzioni macrofagiche e nell'infezione da HIV-1 di queste cellule. In particolare, saranno definiti: i) il ruolo di citochine, prodotti microbici e agenti immunomodulatori, in particolare vitamina D3 e lattoferrina, nella regolazione dell'espressione di CCL1 e CCL2 nei monociti/macrofagi; ii) le vie di trasduzione del segnale coinvolte nell'espressione di queste chemochine e il ruolo che esse svolgono nella regolazione delle funzioni macrofagiche, iii) i determinanti cellulari e molecolari che regolano la loro espressione differenziale associata al diverso stadio differenziativo e al diverso tipo di attivazione cellulare; iv) il ruolo svolto da queste chemochine nella regolazione dell'espressione di altri mediatori solubili e di fattori dell'ospite importanti per la regolazione delle funzioni macrofagiche e per la resistenza/suscettibilità all'infezione da HIV-1; v) l'effetto di CCL2 e CCL1 sulla replicazione di HIV-1 e i meccanismi responsabili di tali effetti. L'insieme di questi risultati contribuirà ad ampliare le conoscenze sui meccanismi mediante i quali le chemochine svolgono un importante ruolo di regolazione della risposta immune in condizioni fisiologiche e patologiche.

Trasferibilità dei risultati

È atteso che quest'area di ricerca possa avanzare lo stato delle conoscenze attuali dei meccanismi attraverso i quali viene regolata la produzione e l'attività di mediatori cruciali nelle risposte immuni e negli stati infiammatori, e potrebbe rappresentare la base per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici per una vasta gamma di patologie. In particolare, gli studi riguardanti il ruolo svolto dalle chemochine nell'infezione da HIV-1 potrebbero portare all'identificazione di nuovi bersagli molecolari per lo sviluppo di interventi terapeutici per la prevenzione/cura dell'AIDS.

Ruolo delle interazioni di HIV-1 con cellule dell'immunità innata nella patogenesi dell'AIDS

Le alterazioni funzionali di cellule dell'immunità innata sembrano essere una componente critica nell'immunodeficienza HIV-associata e un gran numero di alterazioni sono state riportate in macrofagi e cellule dendritiche (DC) isolati da pazienti sieropositivi. Si ritiene che un ruolo importante nell'alterata funzionalità di queste cellule sia svolto da fattori virali solubili, rilasciati in circolo o ai siti di replicazione, in grado di svolgere potenti effetti immunomodulatori anche su cellule non infettate produttivamente. Il presente progetto di ricerca si propone di studiare l'effetto delle interazioni precoci di HIV-1 con macrofagi e DC, e in particolare gli effetti della glicoproteina di superficie gp120, allo scopo di identificare alterazioni funzionali rilevanti per la patogenesi della malattia da HIV-1. Il progetto si svilupperà su tre obiettivi principali: i) caratterizzazione delle vie di trasduzione del segnale attivate dalla gp120 in macrofagi e DC e loro ruolo nella replicazione di HIV-1 e nella risposta immunitaria; ii) studio della risposta di

macrofagi e DC alla stimolazione coordinata di HIV o gp120 e agonisti di *Pattern Recognition Receptors*, in particolare *Toll-like receptors* (TLR), in termini di produzione di citochine/chemochine pro-infiammatorie e loro effetto su replicazione virale, suscettibilità all'infezione e alterazioni funzionali della cellula ospite; iii) identificazione dei microRNA modulati da HIV o gp120 in macrofagi e DC, che regolano le interazioni cellula ospite-patogeno e il loro coinvolgimento nelle funzioni immunitarie.

Risultati attesi nel triennio

Studi rivolti alla caratterizzazione del ruolo dei TLR nell'infezione di HIV-1 possono essere rilevanti per la comprensione delle interazioni HIV-cellula ospite e per particolari aspetti della patogenesi quali le infezioni opportunistiche. 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, consentiranno di identificare i TLR presenti su macrofagi e DC potenzialmente coinvolti in questa attivazione, e forniranno indicazioni sui geni regolati da microRNA che modulano la risposta cellulare ad HIV-1 e la propagazione del virus nella cellula ospite. Tale studio permetterà inoltre di associare l'attivazione di specifiche vie di traduzione del segnale con alcune delle alterazioni funzionali osservate in queste cellule in risposta alla gp120. Il raggiungimento degli obiettivi proposti porterà ad 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 del signaling dei TLR come potenziali target di intervento).

Ruolo delle interazioni tra linfociti T gamma delta e cellule dendritiche nella regolazione della risposta immunitaria

I linfociti T gamma delta rappresentano una popolazione cellulare importante dell'immunità innata e contribuiscono attivamente alla sorveglianza immunitaria ai tumori e alle infezioni batteriche. Studi precedenti del gruppo hanno dimostrato che tali cellule sono in grado di interagire funzionalmente con le cellule dendritiche (DC) e che questa interazione porta ad una attivazione bidirezionale con conseguente sviluppo di una risposta Th1. Sulla base di queste osservazioni, il presente progetto di ricerca si propone di studiare i meccanismi che regolano le interazioni funzionali tra linfociti gamma delta e DC in condizioni fisiologiche, così come eventuali alterazioni a carico di questo *cross-talk* indotte da virus, in particolare HIV-1, o da sostanze ad azione immunosoppressoria o immunoregolatoria, quali la vitamina D3 o la lattoferrina. Il progetto si articolerà in tre obiettivi principali:

- studio dell'espressione genica e dei meccanismi molecolari coinvolti nell'interazione fisiologica tra DC e linfociti T gamma delta stimolati da fosfoantigeni;
- caratterizzazione degli effetti dell'esposizione diretta dei linfociti T gamma delta a HIV-1, a vitamina D3 o a lattoferrina sulla loro capacità di attivare le DC e sul tipo di risposta immunitaria, T alfa beta-mediata, indotta;
- valutazione della capacità delle DC, esposte al virus o a lattoferrina o rese tollerogeniche dalla vitamina D3, di indurre l'attivazione dei linfociti T gamma delta e di modularne l'espressione genica e le funzioni.

Risultati attesi nel triennio

I risultati ottenuti nell'ambito di questo progetto contribuiranno ad aumentare le nostre conoscenze sulla biologia dei linfociti T gamma delta e sui meccanismi che regolano il *cross-talk* tra questi ultimi e le DC. Poiché il *cross-talk* tra DC e linfociti innati (T gamma delta, cellule NK e NKT) è ora considerato un importante meccanismo, alternativo al riconoscimento dei recettori *Toll-like*, di controllo dell'immunità, lo studio proposto potrà fornire un ulteriore contributo alla comprensione dei complessi circuiti attraverso cui la risposta immunitaria è regolata. Ci si attende, inoltre, di ottenere informazioni su come l'interazione tra DC e linfociti T gamma delta può essere modulata in situazioni di immunità o di tolleranza indotte da agenti immunomodulatori o immunosoppressivi, con particolare attenzione allo stato di attivazione delle DC e al tipo di risposta T alfa beta indotta (T *helper* verso T regolatoria). Ulteriore obiettivo del progetto è quello di valutare l'impatto dell'infezione da HIV-1 sul *cross-talk* DC/linfociti T gamma delta. I risultati di questa parte dello studio potranno contribuire a spiegare le alterazioni funzionali descritte per i linfociti T gamma delta che non sono bersaglio diretto del virus, negli individui HIV-infetti, nonché a comprendere il ruolo del loro *cross-talk* con le DC nella patogenesi e nel controllo dell'infezione.

Trasferibilità dei risultati

A lungo termine, la comprensione della regolazione del *cross-talk* DC/linfociti T gamma delta da virus o da agenti immunomodulatori potrà portare all'identificazione di nuovi target terapeutici per il controllo di patologie di origine virale o immuno-mediate. Inoltre, la definizione dei meccanismi che regolano il *cross-talk* fisiologico potrà fornire informazioni importanti per la manipolazione di queste popolazioni cellulari e il loro possibile utilizzo in protocolli di immunoterapia.

Ruolo di mediatori solubili e recettori per il riconoscimento di patogeni in macrofagi e cellule dendritiche nella regolazione della risposta immunitaria

I macrofagi e le cellule dendritiche (DC) sono cellule essenziali per la risposta immune innata. Mentre i macrofagi svolgono un ruolo chiave nell'omeostasi dei tessuti come cellule fagocitiche specializzate capaci di produrre fattori trofici, citotossici e molecole regolatorie che mediano l'infiammazione e il riparo tissutale, le DC organizzano e trasferiscono l'informazione dall'ambiente esterno alle cellule dell'immunità adattativa, iniziando la risposta immunitaria e orientandola verso l'immunità attiva o la tolleranza immunologica. La risposta immune è finemente controllata da numerosi mediatori solubili, principalmente citochine/chemochine, prodotte in gran parte da cellule dell'immunità innata, in grado di regolare il differenziamento, l'attivazione e le funzioni dei diversi tipi di cellule immuni. La produzione di questi mediatori solubili è generalmente innescata in macrofagi e DC dal riconoscimento di patogeni tramite recettori denominati *Pathogen Recognition Receptor* (PRR). Questi riconoscono strutture molecolari patogeno- associate e comprendono recettori della famiglia *Toll-like* (TLR) e altri non-TLR appartenenti alla famiglia *C-type lectin*, quali il recettore del mannosio e il DC-SIGN. Obiettivi principali di questo progetto sono:

- definire il ruolo di fattori solubili e di regolatori dell'espressione genica (microRNA) nel differenziamento/attivazione di macrofagi e DC e nell'interazione ospite/patogeno (espressione/attivazione di PRR);
- studiare i fenomeni di sinergismo/antagonismo tra diversi membri della famiglia TLR, così come con recettori non-TLR, nella regolazione della risposta infiammatoria, e la regolazione dell'attività di PRR da parte di citochine/chemochine;
- definire il ruolo di PRR nella polarizzazione della risposta immune adattativa mediata dalle DC e nell'attività fagocitica del macrofago.

Risultati attesi nel triennio

I risultati ottenuti nell'ambito di questo progetto forniranno una migliore comprensione della biologia di due importanti componenti dell'immunità innata, i macrofagi e le DC, e dei fattori esogeni ed endogeni che ne regolano il differenziamento/attivazione. Inoltre, consentiranno di migliorare le conoscenze sul ruolo di recettori specifici, quali i PRR, espressi da queste cellule nella regolazione della risposta immune, così come di associare l'attivazione di certe vie di trasduzione del segnale all'induzione di risposte immuni specifiche.

Trasferibilità dei risultati

Identificazione di nuovi bersagli molecolari per interventi terapeutici mirati al ripristino di risposte immuni protettive.

Ruolo fisiopatologico di MLC1, una proteina 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 (MLC). 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 terapia per curare la leucoencefalopatia megalencefalica. La strategia adottata per studiare la funzione di MLC1 consiste in un approccio combinato di tecniche di biologia molecolare, biochimica, elettrofisiologia e proteomica, utilizzando modelli sperimentali e tessuti patologici. Attraverso questo approccio, stiamo cercando di comprendere la specifica funzione di MLC1 e di studiarne le interazioni con altre proteine cellulari. Inoltre, a seguito di recenti dati sperimentali da noi ottenuti sull'interazione tra la proteina MLC1 e il complesso distrofina-distroglicano stiamo cercando di comprendere se esistano correlazioni fisiopatologiche tra la malattia MLC e alcune distrofie muscolari congenite con interessamento cerebrale. Una volta chiarito il ruolo fisiologico di MLC1 e identificato un saggio per valutarne l'attività funzionale, si cercherà di capire in che modo le mutazioni patogeniche di MLC1 influenzino la funzione della proteina e se sia possibile sviluppare approcci terapeutici mirati al ripristino di tale funzionalità.

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: i) la caratterizzazione biochimica e funzionale della proteina MLC1; ii) l'identificazione di proteine che interagiscono con MLC1; iii) l'analisi biochimica e funzionale della proteina MLC1 mutata; e iv) possibili correlazioni con distrofie muscolari congenite.

Trasferibilità dei risultati

Una migliore comprensione della funzione della proteina MLC1 nella fisiologia cerebrale e del suo ruolo nella patogenesi della leucoencefalopatia megalencefalica può contribuire a identificare nuovi biomarcatori e bersagli terapeutici per questa malattia genetica rara.

Sindrome di Gerstmann-Sträussler-Scheinker legata alla mutazione p102I nel gene della proteina prionica: fondatore comune e variabilità fenotipica

La sindrome di Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) è una malattia rara a trasmissione autosomica dominante che appartiene alle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST) o Malattie da Prioni, insieme alla Malattia di Creutzfeldt-Jakob (MCJ), l'Insonnia fatale sporadica

e familiare (SFI, FFI) e il Kuru. La mutazione più frequentemente associata alla GSS è la sostituzione prolina-leucina al codone 102 (P102L) della PrP umana. Sperimentalmente, omogenati cerebrali da pazienti affetti con P102L-GSS trasmettono la malattia ad animali di laboratorio caratterizzando questa malattia come genetica e trasmissibile allo stesso tempo.

I pazienti affetti da GSS presentano una grande variabilità di espressione clinica (classicamente una sindrome cerebellare lentamente progressiva, ma a volte una demenza a rapida progressione) e neuropatologica (placche amiloidee multicentriche ma con grado variabile di degenerazione spongiforme o neurofibrillare e differenti isoforme di PrP). Questa variabilità è considerata una prova che altri fattori oltre la mutazione P102L possano modulare le caratteristiche clinico-patologiche di questa malattia.

L'obiettivo principale è lo studio di altri fattori genetici (polimorfismi dei geni tau, catepsina D, preseniline e progranuline) ed epigenetici che possano modulare la malattia. Questo sarà possibile mediante la combinazione di dati provenienti dagli studi genealogici e quelli di caratterizzazione degli aplotipi dei pazienti e dei *carrier* non affetti.

Risultati attesi nel triennio

- Ricondurre mediante gli studi genealogici ad un unico pedigree i soggetti affetti da GSS, portatori della mutazione P102L, appartenenti a famiglie individuate in Italia, Germania e Stati Uniti;
- riunificare dal punto di vista molecolare, attraverso analisi degli aplotipi, tutti i soggetti con la mutazione delle diverse regioni geografiche, per individuare il fondatore comune in cui si è verificato il primo singolo evento mutazionale indipendente;
- seguire i soggetti a rischio di GSS e l'analisi accurata della variabilità fenotipica dei pazienti con GSS. Ciò permetterà di stabilire l'esatta progressione dei sintomi durante la malattia. Questo risultato permetterà di avere informazioni prognostiche più accurate per i pazienti e di migliorare la qualità del "counseling genetico";
- analizzare la correlazione tra i profili genetici dei soggetti arruolati e la variabilità del fenotipo clinico per comprendere meglio il *pathway* metabolico che regola l'esordio e la progressione della malattia;
- studiare i possibili *marker* epigenetici anomali per poter caratterizzare nuove strategie di prevenzione, per poter caratterizzare la patogenesi e sviluppare nuove strategie terapeutiche più mirate.

Trasferibilità dei risultati

Per la lunga durata media della malattia e per la necessità di *counseling* "genetico per i soggetti a rischio di essere portatori della mutazione, la GSS ha un impatto maggiore sul Servizio Sanitario Nazionale e sui servizi di assistenza ai pazienti in confronto ad altre forme di malattie da prioni. Sarà discusso e sviluppato un protocollo comune per il *counseling* in collaborazione con gli altri centri partecipanti e l'associazione italiana per questo documento sarà proposto alla comunità medica come linea guida per il *counseling* genetico e per il test diagnostico nelle forme genetiche di malattie da prioni.

I dati scientifici ottenuti nel progetto saranno presentati e discussi ai congressi nazionali e internazionali delle società di Neurologia, Neuroscienze e Neuropatologia. Mediante la pubblicazione dei risultati su riviste scientifiche nazionali e internazionali i dati saranno messi a disposizione della comunità scientifica.

Sindrome di iperattività e deficit di attenzione (ADHD): modellizzazione dei sintomi tramite lentivirus, e ricerca di nuovi target per la terapia

L'ADHD si associa con disfunzioni centrali del trasportatore della dopamina (DAT) e della serotonina (SERT). Non vi è ad oggi un modello animale universalmente accettato per l'ADHD:

il più utilizzato in laboratorio è l'SHR (Sagvolden, *et al. Biol Psychiatry* 2005), privo però di *construct validity*. Ci si propone di validare un modello animale innovativo per l'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). Inoltre, la somministrazione di un farmaco Htr7 antagonista era in grado di contrastare pienamente tale riduzione del comportamento impulsivo, prodotta dal MPH (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: i) nel profilo comportamentale (attenzione/cognizione; auto-controllo/impulsività; motivazione/depressione; emotività/ansia), per valutare se i sintomi dell'ADHD siano riproducibili e in qual misura, ii) utilizzando la tecnica MR *in vivo* della spettroscopia (MRS) e dell'*imaging* farmacologico (ph-MRI), due approcci non invasivi (BCN-ISS). Inoltre, saranno saggiate nuove molecole che agiscono sul Htr7, un potenziale nuovo target per taluni sintomi psichiatrici (Università di Bari). Infine, per quanto riguarda studi clinici, sarà valutata la risposta emodinamica della corteccia prefrontale, incluse sia tecniche di MR (Stella Maris) che la spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso (fNIRS, PTV+Univ.AQ). 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 dell'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 dell'ADHD, i cui interventi verranno pubblicati in un fascicolo monografico;
- la ricerca di nuovi *marker* diagnostici in campioni di sangue di provenienza clinica (PTV, Roma), 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.

Sorveglianza di donne ad alto rischio genetico-familiare di tumore mammario: network nazionale italiano

Sebbene a carattere prevalentemente sporadico, il carcinoma mammario (CM) presenta in alcune famiglie una incidenza più elevata della media, con una percentuale stimata di forme eredo-familiari del 15-20%. Circa il 5% dei CM è clusterizzato in famiglie con predisposizione ereditaria multifattoriale (*lifetime risk* superiore al 50-60%) ad esordio precoce, tipicamente premenopausale, riferibile, per un 50% circa, a mutazioni deleterie dei geni BRCA1 o BRCA2 con trasmissione autosomica dominante a penetranza incompleta. Rispetto allo screening di popolazione (basato in Europa sulla sola mammografia a cadenza biennale dopo i 50 anni), la sorveglianza delle donne ad alto rischio genetico-familiare richiede programmi di sorveglianza ad esordio più precoce, intervalli più ravvicinati tra eventi di screening, e uso integrato di modalità diagnostiche adattate per fascia di età, al fine di minimizzare gli effetti della densità ghiandolare, ottimizzare l'accuratezza diagnostica e contenere opportunamente l'esposizione globale a radiazioni ionizzanti. Il presente progetto si propone la definizione, a livello nazionale e multicentrico, di adeguati protocolli di monitoraggio per la diagnosi precoce di tumori mammari in donne ad alto rischio genetico, sulla base di uno studio pilota nazionale, di tipo prospettico e non-randomizzato, basato sull'uso integrato di visita senologica, mammografia, ecografia e risonanza magnetica a contrasto dinamico (RM) con cadenza annuale.

Risultati attesi nel triennio

Costituzione di un Network nazionale formato da Centri distribuiti sul territorio, in grado di offrire servizi integrati di consulenza genetica, radiologia senologica multimodale (inclusa RM), oncologia clinica, chirurgia oncologica e supporto psico-oncologico.

Armonizzazione e validazione dei protocolli di *imaging* per la diagnosi precoce del carcinoma mammario in donne ad alto rischio genetico (selezionate in base a mutazione accertata nei geni BRCA1 o BRCA2 o TP53 nel soggetto stesso o in parente di primo grado o sulla base della storia familiare).

Valutazione comparativa della performance diagnostica delle quattro modalità in termini di sensibilità, specificità, valori predittivi, accuratezza diagnostica, *ROC analysis* e *likelihood ratio* positivo e negativo. Valutazione del numero di CM diagnosticati per *round* di sorveglianza e per fasce di età: del numero dei CM di intervallo; del numero di biopsie con esito negativo per modalità diagnostica che ne ha posto l'indicazione; del tasso di adesione nei *round* successivi al primo; del costo economico per CM diagnosticato. I risultati ottenuti da questo progetto pilota di sorveglianza verranno confrontati con quelli ottenuti da analoghi progetti in altri Paesi, al fine di proporre all'SSN un piano di sorveglianza integrato per le donne a rischio genetico di carcinoma mammario, basato su solide ed ampie evidenze mediche, tecnologiche ed epidemiologiche.

Trasferibilità dei risultati

- Costituzione in ISS di un polo di coordinamento a livello nazionale di un network di eccellenza per la diagnosi precoce del carcinoma mammario in soggetti a rischio genetico-familiare;
- Consolidamento di una struttura operativa di ricerca avanzata già attiva in ISS sin dal 2000, per la valutazione dei percorsi diagnostici e assistenziali da proporre ai soggetti a rischio genetico di carcinoma mammario, basata sull'armonizzazione sul territorio italiano dei metodi di stratificazione del rischio, e sulla raccolta e analisi dei risultati di esami diagnostici ottenuti in Centri diversi;
- Validazione e trasferimento all'SSN, e a livello clinico/radiologico, di un piano di prevenzione secondaria delle donne a rischio di CM ereditario, basato sull'uso integrato

di mammografia, ecografia e RM, definito per fasce di età e in relazione all'età dell'esordio del caso familiare più precoce.

Studi preclinici per lo sviluppo di vaccini per il carcinoma della cervice

È noto che i Papillomavirus umani (HPV) sono collegati eziologicamente all'insorgenza del carcinoma della cervice uterina. Le proteine oncogeniche E6 ed E7 sono espresse nella quasi totalità dei tumori HPV-associati, e numerosi epitopi di E6 ed E7 riconosciuti da linfociti T *helper* o citotossici (CTL) sono stati identificati.

Il gruppo responsabile del progetto ha precedentemente dimostrato l'efficienza di cellule dendritiche generate da monociti umani in presenza di GM-CSF e IFN-alfa (IFN-DC) nell'induzione di una risposta TH1 e di una risposta cellulare CD8-mediata. Il presente progetto è finalizzato alla valutazione della risposta immune indotta verso la proteina E7 di HPV16, mediante uso di IFN-DC, sia *in vitro* che *in vivo* nel modello xenochimerico Hu-PBL-SCID di topi SCID ricostituiti con linfociti del sangue periferico (PBL) umani. Nell'ambito di questa ricerca verranno valutate comparativamente diverse strategie di caricamento dell'antigene E7 su IFN-DC.

Particolare interesse sarà rivolto all'analisi comparativa dell'entità e della qualità della risposta immune cellulare (profilo TH1 vs TH2, induzione di linfociti effettori e di memoria). Inoltre, sarà effettuata la valutazione dell'efficacia protettiva della vaccinazione con E7 nel modello xenochimerico Hu-PBL-SCID. A tale scopo, topi SCID ricostituiti con PBL umani HLA-A2+ saranno vaccinati con IFN-DC autologhe caricate con E7 e inoculati con linee cellulari derivate da tumori cervicali HLA-A2+.

Risultati attesi nel triennio

Gli studi descritti contribuiranno a definire il disegno di nuovi vaccini terapeutici basati su DC e diretti contro il carcinoma della cervice uterina associato a HPV ad alto rischio.

Trasferibilità dei risultati

Nel 2007 l'Agenzia italiana del farmaco (AIFA) ha deliberato la commercializzazione del vaccino per la prevenzione delle lesioni causate da HPV di tipo 6,11,16 e 18. Tuttavia, la vaccinazione preventiva deve essere effettuata prima dell'inizio dell'attività sessuale e non risulta pertanto in grado di prevenire i cinque milioni di casi di morte per carcinoma della cervice uterina stimati nei prossimi 20 anni in conseguenza delle infezioni da HPV ad alto rischio già esistenti. Non esiste, per ora, alcuna terapia che elimini l'infezione da HPV. I vaccini terapeutici diretti contro le proteine E6 ed E7, espresse dalle lesioni di alto grado laddove il genoma virale si è integrato nel DNA dell'ospite, troverebbero la loro applicazione nell'immunizzazione di pazienti che siano già infettate da HPV e ad alto rischio per lo sviluppo di cancro della cervice uterina, così come di soggetti che già presentino lesioni HPV-indotte o già sottoposti a trattamento chirurgico.

Studi sull'attività antiinfiammatoria della lattoferrina bovina sulle cellule della risposta innata

La lattoferrina (LF) è una glicoproteina appartenente alla famiglia delle transferrine rilasciata nelle secrezioni esocrine e dai neutrofilo durante i processi infiammatori. Questa molecola, prodotta fisiologicamente dall'organismo, esplica molteplici attività che includono la modulazione della risposta immunitaria, l'attività antimicrobica e la capacità di legare il ferro. In questo contesto, le cellule dendritiche (DC) e i monociti rappresentano un target cellulare d'elezione per la LF, in quanto svolgono un ruolo chiave nella induzione e orientamento della risposta immune alle infezioni o in condizioni fisiologiche, nella fagocitosi microbica e

nell'omeostasi tissutale e del ferro, rispettivamente. Malgrado sia noto come l'insorgenza dello "stato infiammatorio" sia la causa diretta di malattie cronicoinfiammatorie o indiretta di patologie considerate importanti emergenze sanitarie quali i tumori e le malattie cardiovascolari, ancora poco studiati sono i meccanismi e i target molecolari che innescano l'infiammazione. Lo stato infiammatorio è un fattore che predispone all'insorgenza di anemia. In questo scenario citochine quali l'IL-6 attivano un processo di regolazione del ferro che determina il ridotto assorbimento di ferro a livello intestinale e un suo accumulo nei tessuti. In tale contesto il monocita potrebbe svolgere un ruolo chiave nella produzione di fattori pro-infiammatori e nella distribuzione del ferro ai tessuti.

L'attività di ricerca qui descritta si propone il raggiungimento di due obiettivi:

- Valutare la capacità della LF bovina di orientare l'attività immunomodulatoria delle DC attraverso l'attivazione di meccanismi/processi che controllano l'eccessiva infiammazione.
- Definire gli effetti della bLF sul monocita/macrofago nella attivazione/regolazione di bersagli molecolari che regolano l'omeostasi del ferro.

Risultati attesi nel triennio

Con questa ricerca intendiamo indagare a livello molecolare e cellulare i meccanismi d'azione messi in atto dalla bLF nella attenuazione dello stato infiammatorio in diverse tipologie di DC (differenziate *in vitro* in presenza di diversi cocktail di fattori o isolate *ex vivo* dal sangue periferico) ottenute da donatori sani o da pazienti affetti da malattie cronicoinfiammatorie. Riteniamo che lo studio degli effetti della bLF su fattori di trascrizione, fattori solubili (citochine e chemiochine) e molecole di superficie necessari per lo sviluppo e le funzioni delle DC, possano contribuire ad avanzare le nostre conoscenze sui meccanismi molecolari alla base dell'infiammazione. Inoltre, l'interazione della bLf con i bersagli molecolari che regolano il metabolismo del ferro saranno, in una fase iniziale, indagati nel monocita/macrofago di donatori sani e successivamente estesi a pazienti affetti da anemia cronica infiammatoria. Nel complesso questi studi consentiranno una migliore comprensione delle basi molecolari della infiammazione e sua interferenza con il metabolismo del ferro aprendo nuove prospettive per lo disegno di terapie più mirate e prive di effetti collaterali per la cura dell'anemia e delle malattie cronicoinfiammatorie.

Trasferibilità dei risultati

Lo stato infiammatorio cronico e l'anemia che ne deriva sono alla base di molte patologie di grande impatto sanitario, quali le malattie immunomediate, i tumori, e le malattie cardiovascolari. La comprensione dei target molecolari e dei meccanismi alla base di una patologia è condizione necessaria per il disegno di più efficaci e tollerate opzioni terapeutiche. Per questi motivi crediamo che la definizione degli effetti di un composto naturale quale la bLF possa contribuire alla messa a punto di interventi terapeutici mirati all'attenuazione dello stato infiammatorio alla base di molte patologie di forte emergenza sanitaria.

Studio degli effetti di terapie assistite con il cane sul benessere psicologico e fisico dell'anziano

Scopo del progetto è verificare l'efficacia di terapie assistite con animali (TAA) in pazienti anziani mediante valutazione neuropsicologica e l'analisi di parametri ormonali indici di stress. Il progetto sarà coordinato dall'ISS e condotto in collaborazione con l'Associazione Nazionale Utilizzo del cane per scopi sociali (ANUCSS).

Sebbene esistano numerose iniziative sia a livello nazionale che internazionale, allo stato attuale le terapie assistite con gli animali rappresentano un'attraente potenzialità terapeutica, che però necessita di ulteriori verifiche scientifiche. La finalità ultima della ricerca è quella di

migliorare la qualità della vita del soggetto, favorendo la capacità relazionale e le strategie di *coping*, nel rispetto del benessere dei soggetti canini coinvolti.

Obiettivi specifici:

- Sperimentare l'uso di terapie effettuate utilizzando il cane, come ausilio nella vita dell'anziano ospite in casa di riposo, anche mediante valutazione degli effetti su indicatori di ansia e stress;
- Promuovere attività assistenziali innovative che riducano lo stato di solitudine dell'anziano, migliorandone le capacità relazionali e attenzionali e il mantenimento o il recupero di autonomie.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto permetterà di acquisire dati scientifici rigorosi riguardo la potenziale efficacia delle terapie svolte con l'ausilio di animali, validandone l'uso come uno strumento innovativo all'interno del Sistema Sanitario Nazionale. Tali informazioni potranno essere utilizzate per accreditare alcune tipologie di terapie assistite con gli animali come ausilio per il miglioramento della qualità della vita dell'anziano. I risultati verranno divulgati tramite workshop specifici organizzati presso l'ISS indirizzati a personale afferente al Sistema Sanitario Nazionale, agli operatori del settore, alle associazioni di volontariato, sanitarie, socio-assistenziali, in aggiunta alle associazioni degli anziani e di soggetti con handicap.

Trasferibilità dei risultati

La partecipazione dell'ISS al progetto favorirà l'integrazione e il *networking* con strutture sanitarie presenti sul territorio nazionale (RSA e IRCSS) che operano nel campo delle patologie dell'invecchiamento, favorendo il trasferimento di *know-how* acquisito dall'ISS per lo sviluppo e la diffusione di terapie innovative e per il miglioramento della qualità della vita dell'anziano.

Studio degli effetti sulla salute umana dell'esposizione a interferenti tiroidei

La tiroide rappresenta uno dei principali bersagli di alcuni Interferenti Endocrini, ovvero sostanze chimiche di sintesi in grado di interferire con la normale funzione endocrina. L'interesse della comunità scientifica per sostanze interferenti con la funzione tiroidea deriva dal fatto che gli ormoni tiroidei svolgono un ruolo fondamentale nel promuovere la proliferazione e il differenziamento cellulare durante lo sviluppo pre- e post-natale, e nel mantenere l'omeostasi metabolica durante la vita adulta. Pertanto, risulta prioritario stabilire il reale impatto sulla salute umana delle esposizioni a tali sostanze e identificare possibili segmenti di popolazione particolarmente sensibili, quali donne in età riproduttiva, donne in gravidanza, neonati e bambini in genere. Nell'ambito di tale problematica si attuerà: i) il completamento di un'ampia indagine epidemiologica avviata nell'area rurale del Comune di Maddaloni e finalizzata a stabilire il possibile rapporto di causa-effetto tra esposizione a pesticidi (organofosforici e etilenbisditiocarbamati) e insorgenza di patologie tiroidee, e a stabilire l'eventuale effetto additivo della carenza nutrizionale di iodio; ii) l'attivazione di uno studio finalizzato a verificare il possibile effetto sulla funzione tiroidea neonatale dell'esposizione a ftalati, plasticizzanti ubiquitari rilasciati in maniera massiva da dispositivi medici (cateteri, sacche di sangue, ecc.), e per i quali è stata ipotizzata un'azione tireostatica.

Risultati attesi nel triennio

Funzione tiroidea ed esposizione a pesticidi. I risultati preliminari finora ottenuti (rischio di patologie tiroidee due volte più elevato per gli agricoltori rispetto ai soggetti con altre attività lavorative) supportano fortemente l'ipotesi che l'esposizione a sostanze comunemente utilizzate nell'attività agricola, quali fertilizzanti e pesticidi, possano aumentare il rischio di patologia tiroidea. Pertanto, i risultati attesi dal completamento dello studio saranno: i) la verifica del rapporto di causa/effetto tra esposizione a pesticidi (valutazione di marcatori di esposizione) e

funzione tiroidea (valutazione di marcatori di effetto) sia in soggetti professionalmente esposti che in soggetti della popolazione generale; ii) la valutazione del possibile ruolo additivo della carenza nutrizionale di iodio (valutazione delle iodurie); iii) la valutazione della suscettibilità genetica nella manifestazione di eventuali effetti tireostatici dovuti all'esposizione (studio dei poliformismi di geni codificanti per proteine coinvolte nel metabolismo di tali sostanze).

Funzione tiroidea neonatale ed esposizione a ftalati. I risultati attesi dalla realizzazione di questo studio, che verrà condotto su neonati prematuri e/o di basso peso alla nascita particolarmente esposti al rischio di cateterizzazione, riguardano fundamentalmente la possibilità di accertare un'associazione tra l'esposizione a ftalati e ipotiroidismo e/o ritardato innalzamento del TSH, eventi particolarmente frequenti nei neonati di basso peso e che la sola immaturità dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide non può spiegare completamente.

Trasferibilità dei risultati

Funzione tiroidea ed esposizione a pesticidi. I risultati di questo studio contribuiranno ad aumentare la base conoscitiva necessaria a stabilire il ruolo delle esposizioni a pesticidi nell'insorgenza delle malattie tiroidee, non solo in soggetti professionalmente esposti ma anche in soggetti della popolazione generale, e consentirà di individuare eventuali segmenti di popolazione a maggior rischio. Lo studio, inoltre, avrà dirette implicazioni per la salute dei cittadini dell'area geografica studiata in quanto sarà possibile accertare la possibile esistenza di fattori di rischio ambientali, e quindi modificabili, per le patologie tiroidee strettamente legati al territorio.

Funzione tiroidea neonatale ed esposizione a ftalati. I risultati che si otterranno attraverso la realizzazione di questo studio consentiranno di accertare la potenzialità degli ftalati quali interferenti tiroidei, e di comprendere meglio le cause delle alterazioni funzionali della tiroide in neonati prematuri e di basso peso alla nascita.

Studio dei meccanismi di *signalling* indotti da eccitotossicità e da stress ossidativo nel Sistema Nervoso Centrale

Un numero sempre crescente di studi sperimentali e clinici identifica nello stress ossidativo, generato da una sostenuta stimolazione dei recettori per gli amminoacidi eccitatori (EAA), uno dei meccanismi in grado di innescare fenomeni degenerativi correlati direttamente alla produzione di specie radicaliche dell'azoto (NO) e dell'ossigeno (ROS). Il coinvolgimento di queste specie radicaliche nell'insorgenza dei fenomeni neurodegenerativi è stato dimostrato sia nelle sindromi neuropatologiche acute (ischemia, trauma, ipossia) che croniche, come la malattia di Alzheimer, di Huntington, il morbo di Parkinson e la Sclerosi Laterale Amiotrofica. In particolare, il danno eccitotossico mediato dalla eccessiva stimolazione del recettore NMDA, è correlato alla simultanea produzione del radicale superossido e del radicale NO e alla conseguente formazione di una specie ossidante, il perossinitrito. La tossicità del perossinitrito è stata attribuita alle sue proprietà ossidanti e nitranti a carico dei residui in tirosina e triptofano che insieme alle cisteine ne costituiscono i *target* preferenziali. La presenza di nitrotirosine è stata riscontrata in lesioni tissutali delle principali patologie neurodegenerative ed è considerata un marcatore del danno ossidativo. Le modifiche indotte dal perossinitrito a carico dei residui di tirosina possono interferire nella corretta trasduzione dei segnali tirosina-dipendenti. Nei neuroni il perossinitrito è in grado di stimolare il rilascio di glutammato, di modulare le attività di specifiche fosfotirosina fosfatasi e di tirosin chinasi della famiglia di src, di modificare selettivamente complessi macromolecolari che regolano il rilascio e la fusione delle vescicole sinaptiche.

Risultati attesi nel triennio

Questo progetto intende portare un contributo alla comprensione dei meccanismi di *signalling* indotti da eccitotossicità e dallo stress ossidativo in condizioni fisiopatologiche 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 Sclerosi Laterale Amiotrofica), topi R6/2 (modello transgenico per la malattia di Huntington), per gli studi *in vitro* verranno allestite colture primarie di neuroni embrionali di ippocampo e di neuroni postnatali di cervelletto di ratto. Si analizzeranno la formazione di nitrotirosine, le attività di specifiche fosfotirosina fosfatasi e di tirosin chinasi della famiglia src coinvolte nella funzionalità recettoriale glutammatergica e come tali modifiche possano intervenire nella regolazione delle interazioni tra proteine associate ai recettori per gli EAA. Verranno 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 Sclerosi Laterale Amiotrofica. In questo programma, l'identificazione di bersagli molecolari, di vie di *signalling* selettivamente modificati 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 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*.

Studio dei meccanismi molecolari che regolano il differenziamento e le attività funzionali di cellule dendritiche differenziate in presenza di IFN-Alpha (IFN-DC): ruolo dei fattori di trascrizione IRF-1 e IRF-8

Nell'uomo, così come nel topo, sono stati descritti diversi sottotipi di cellule dendritiche (DC). Vie diverse di differenziamento, in risposta a segnali del microambiente come le citochine, portano alla generazione di popolazioni distinte di DC con diversa capacità di svolgere alcune funzioni come captare l'antigene e stimolare popolazioni definite di linfociti T con il risultato finale di indurre risposte immuni oppure tolleranza. La comprensione di questi fenomeni è particolarmente importante per migliorare gli approcci di immunoterapia basati sull'utilizzo delle DC nel trattamento di patologie oncologiche. Negli ultimi anni, studi effettuati nel nostro laboratorio così come da altri gruppi hanno mostrato che i fattori di trascrizione IRF-1 e IRF-8, membri della famiglia degli *interferon-regulatory factor* (IRF) che agiscono nella trasmissione del segnale degli interferoni (IFN), svolgono un ruolo cruciale nel determinare il differenziamento e la funzione di alcuni sottotipi di DC e modulano considerevolmente l'attività di cellule T regolatorie (Treg). Studi paralleli sono stati finalizzati a definire nel dettaglio alcuni processi di cattura e processamento dell'antigene da parte di DC differenziate in presenza di GM-CSF e IFN-alpha (IFN-DC), che è stato precedentemente dimostrato da un gruppo di ricercatori afferenti al Reparto Immunoterapia sperimentale essere particolarmente efficienti nell'innescare della risposta immune. I risultati finora ottenuti hanno rivelato che in seguito alla cattura di antigeni di linfociti allogenici apoptotici attraverso recettori della famiglia degli *scavenger receptor* (SR), le IFN-DC diventano particolarmente abili a stimolare la risposta di linfociti CD8+ T autologhi. Queste caratteristiche rafforzano

ulteriormente il potenziale vantaggio dell'utilizzo delle IFN-DC in protocolli di immunoterapia e motivano l'ulteriore approfondimento dei meccanismi responsabili di queste peculiari funzionalità, che è stato avviato mediante diversi studi tra cui l'analisi di espressione di microRNA (miR), regolatori post-trascrizionali di proteine implicate nel controllo della maggior parte dei processi biologici. Sulla base di queste conoscenze il presente progetto è finalizzato a: i) definire il ruolo di IRF-1 e IRF-8 nel differenziamento e nell'attività funzionale di IFN-DC; ii) caratterizzare il ruolo di IRF-1 e IRF-8 nel *cross-talk* tra DC e Treg; iii) dissezionare i *pathway* molecolari implicati nella cattura di linfociti apoptotici e nella presentazione di antigeni ad essi associati in IFN-DC.

Risultati attesi nel triennio

Sulla base delle conoscenze acquisite nel corso dei nostri precedenti studi, gli obiettivi del progetto possono essere riassunti come segue: i) studiare le caratteristiche fenotipiche e funzionali di IFN-DC umane differenziate da monociti ottenuti da donatori sani, silenziate per o iper-esprimenti i fattori IRF-8 e IRF-1; ii) stabilire potenziali correlazioni tra le caratteristiche funzionali di IFN-DC silenziate/ipер-esprimenti IRF-8/IRF-1 e il tipo di risposta di linfociti T da esse indotta. Nel loro complesso, questi studi ci permetteranno di valutare se anche nell'uomo, così come è stato dimostrato nel topo, il segnale mediato da IFN di tipo I è cruciale nel determinare il differenziamento e l'attività funzionale di DC, o di alcuni sottotipi, determinandone le caratteristiche peculiarmente necessarie ad indurre una risposta immune oppure tolleranza. Queste conoscenze saranno quindi funzionali a disegnare vaccini basati sull'utilizzo di DC più potenti. Nella seconda parte di questo progetto si proseguiranno gli studi di caratterizzazione dei meccanismi molecolari che rendono le IFN-DC particolarmente efficienti nell'innescare della risposta immune, caratterizzandole come potenzialmente molto interessanti per protocolli di immunoterapia. A questo fine e sulla base di esperimenti attualmente in corso, l'attività sperimentale verrà finalizzata a: i) definire il profilo di espressione dei miR nelle IFN-DC e valutare se l'eventuale espressione differenziale con rispetto a DC convenzionali di riferimento possa giustificare le proprietà distintive delle IFN-DC nell'induzione della risposta immune; ii) chiarire le vie molecolari coinvolte nella peculiare capacità di IFN-DC di catturare linfociti allogenici apoptotici e stimolare la proliferazione di linfociti T CD8+ autologhi. Nel loro insieme, tali studi permetteranno di acquisire conoscenze essenziali per chiarire i meccanismi molecolari alla base delle diverse funzioni delle DC e il ruolo dell'IFN nel controllo di queste attività. Alla stessa stregua, l'attività scientifica, condotta nella prima fase di questo studio consentirà di valutare il ruolo del segnale dell'IFN nel differenziamento di sottotipi di DC e il coinvolgimento dei fattori di trascrizione IRF-1 e IRF-8 nel determinare le vie di differenziamento delle DC nell'uomo.

Trasferibilità dei risultati

Il presente progetto permetterà di acquisire nuove e indispensabili conoscenze necessarie a delucidare i meccanismi alla base del differenziamento e dell'attività funzionale di DC. Tali conoscenze avranno un forte impatto sull'avanzamento della ricerca in questo campo perchè ad oggi rimangono ancora oscure le componenti che determinano la generazione di popolazioni distinte di DC, con diversa capacità di svolgere alcune funzioni come captare l'antigene e stimolare popolazioni definite di linfociti T, e quindi di indurre risposte immuni oppure tolleranza. Inoltre, il presente progetto consentirà di valutare il ruolo dell'IFN, e del suo segnale, nel controllo del differenziamento e dell'attivazione funzionale delle DC, delucidando l'impatto di questa citochina nell'induzione della risposta immune in condizioni fisio-patologiche. Nel loro insieme, questi studi permetteranno di valutare se e come modulare le proprietà di DC per disegnare nuovi e più efficaci vaccini e protocolli di immunoterapia del cancro e di malattie infettive croniche, e nel contempo forniranno importanti suggerimenti per chiarire i meccanismi alla base di alcune patologie autoimmuni associate ad interventi immunoterapici.

Studio dei meccanismi patogenetici delle malattie degenerative per la diagnosi e lo sviluppo di approcci terapeutici

La ricerca sui marcatori biologici dell'Alzheimer è focalizzata sulle molecole che giocano un ruolo centrale nella sua patogenesi: la proteina beta-amiloide (Ab), l'isoforma Ab42, e la proteina tau. Nell'AD, le concentrazioni di Ab42 nel CSF sono ridotte, e la concentrazione totale di Tau e di fosfo-tau sono aumentate rispetto ai controlli non dementi. Tuttavia, cambiamenti simili sono osservati in altri disordini neurologici e la specificità del dato è ancor meno significativa quando Ab42 e tau vengono usati per predire la conversione da *Mild Cognitive Impairment* (MCI) ad AD. Attualmente sono previsti almeno tre approcci terapeutici capaci di alterare il decorso della malattia, risulta quindi rilevante l'individuazione di ulteriori marcatori che, in combinazione con quelli correntemente utilizzati, abbiano quella specificità diagnostica necessaria per definire il passaggio da AD incipiente a prodromico. Numerosi studi di proteomica e di genetica sui fluidi biologici, hanno identificato alcuni marcatori del CSF e del plasma che risultano essere diversamente espressi nell'AD e nel MCI, rispetto a soggetti di controllo. Tuttavia, il maggiore fattore di rischio conosciuto (l'aplotipo ApoE4) non possiede quel valore predittivo per la conversione da MCI ad AD. Il progetto si propone di valutare quindi, marcatori più promettenti, quali l'aplotipo H1c del locus della tau e le varianti alleliche dei geni associati con il *processing* dell'Ab e dei geni coinvolti nella neuroinfiammazione.

Risultati attesi nel triennio

I principali *output* del progetto saranno:

- Definizione di Procedure Standard per la determinazione dell'Ab42, la tau totale e la fosfo-tau nel CSF, e quindi la loro diffusione ai laboratori dell'SSN;
- Produzione di Report sull'efficacia diagnostica e prognostica dei marcatori genetici recentemente riconosciuti (nel CSF e plasma) oltre a nuovi biomarcatori per l'AD;
- Produzione di un Protocollo molecolare multivariato per la diagnosi di AD incipiente e la predizione della conversione da MCI ad AD, e quindi il loro trasferimento ai Centri Alzheimer dell'SSN;
- Produzione di un Protocollo multi-fattoriale comprendenti dati molecolari, dati di *imaging*, neurofisiologici, neuropsicologici e comportamentali per la diagnosi di AD prodromico o incipiente;

Questi risultati aumenteranno l'accuratezza diagnostica e prognostica degli stadi precoci di AD, definendo i profili genetici e biochimici predittivi per la conversione da MCI ad AD, consentendo la possibilità di un intervento precoce, preventivo, terapeutico e riabilitativo.

Ulteriori *output* saranno:

- La pubblicazione di dati significativi su giornali scientifici con alto *impact factor*;
- Generazione di un database condiviso tra i partners del progetto, come piattaforma di un database nazionale;
- Istituzione di una banca di DNA e fluidi biologici da pazienti con differenti forme di demenza a stadi differenti e controlli non-dementi.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto stabilirà un protocollo molecolare multivariato con altissima sensibilità, specificità e riproducibilità per la diagnosi precoce della malattia di Alzheimer ad uno stadio pre-demenza.

In particolare lo studio è stato disegnato per:

- definire procedure standard per la corretta analisi del CSF su biomarcatori già noti (Ab, tau totale e fosfo-tau);
- validare l'impiego di marcatori genetici e biochimici recentemente individuati;
- identificare nuovi biomarcatori diagnostici per l'AD incipiente.

Studio del ruolo delle infezioni da *Herpes Simplex Virus-1* nella compromissione dei meccanismi di riparo del DNA associata alla Malattia di Alzheimer

Il danno del DNA è stato ampiamente evidenziato in diversi processi patologici, comprese le malattie neurodegenerative. In particolare, le rotture a doppio filamento del DNA (DSB) costituiscono un evento cruciale nella morte neuronale associata a molte malattie neurodegenerative, tra le quali la malattia di Alzheimer (AD). Obiettivo generale del progetto è quello di identificare il ruolo delle infezioni erpetiche recidivanti nella patogenesi delle malattie neurodegenerative, inclusa la Malattia di Alzheimer (AD), e in particolare investigare se le infezioni da *Herpes Simplex Virus-1* (HSV-1) sono in grado di alterare i meccanismi di riparo del DNA nei neuroni contribuendo in tal modo al processo neurodegenerativo. È infatti stato dimostrato che le infezioni da HSV-1 inducono una diminuzione dei livelli proteici della subunità catalitica delle DNA-PK in cellule HeLa S3 e MCF-7 e diminuiti livelli proteici della DNA-PK sono stati rilevati in tessuti cerebrali autoptici di pazienti affetti da AD.

Risultati attesi nel triennio

- Identificazione del ruolo svolto dalle infezioni da HSV-1 nel compromettere i meccanismi di riparo del DNA nei neuroni.
- Identificazione del ruolo svolto dalle infezioni da HSV-1 nel compromettere la trasmissione sinaptica basale e la plasticità sinaptica nei neuroni.

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 dell'infezione da *Herpes simplex virus-1* (HSV-1) nella genesi dei principali *marker* molecolari della malattia di Alzheimer

L'esposizione cronica e persistente a HSV-1 è stata proposta come possibile fattore di rischio per lo sviluppo della malattia di Alzheimer (AD). Oltre a studi epidemiologici che riportano la presenza di materiale genomico di HSV-1 in reperti autoptici cerebrali di pazienti affetti da AD, alcune evidenze sperimentali supportano l'ipotesi di un ruolo eziopatologico di HSV-1 in AD, dimostrando il coinvolgimento diretto di alcune proteine virali nei *pathway* cellulari che portano a neurodegenerazione. Tuttavia, i meccanismi molecolari mediante i quali HSV-1 può contribuire alla neurodegenerazione tipica di AD non sono stati ancora identificati. È noto che le infezioni virali alterano il *redox* intracellulare inducendo uno stato pro-ossidante e condizioni di stress ossidativo sono state descritte come uno dei fattori implicati nello sviluppo di AD, in particolare nei processi che portano alla iperproduzione del peptide Abeta e all'iperfosforilazione di tau, eventi cui consegue la genesi dei principali *marker* istopatologici di AD. Risultati ottenuti dagli studi condotti collaborando con il gruppo di ricerca della Prof. Palamara in cellule neuronali mostrano il coinvolgimento diretto di HSV-1 nel processo che porta al clivaggio della proteina precursore di Abeta APP. Pertanto, obiettivo del presente studio è quello di definire e caratterizzare gli effetti dell'infezione da HSV-1 sul clivaggio di APP e la fosforilazione di tau e di identificarne i meccanismi molecolari coinvolti.

Risultati attesi nel triennio

Identificazione dei frammenti di APP prodotti in seguito ad infezione da HSV-1 e caratterizzazione dei principali meccanismi coinvolti nel suo processo.

Identificazione del ruolo svolto dalle infezioni da HSV-1 nella iperfosforilazione di tau.

Trasferibilità dei risultati

I risultati attesi dallo studio consentiranno di comprendere se e con quali meccanismi infezioni recidivanti da HSV-1 possono contribuire alla degenerazione neuronale tipica di AD, 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 suggerire l'introduzione di una vaccinazione contro HSV-1 in età infantile, al fine di ridurre il rischio di sviluppare AD in età adulta. Inoltre, lo 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 di IFN di tipo I e di IRF-8 nella modulazione dell'espressione di antigeni tumorali e nella risposta anti-tumorale mediata da cellule dendritiche

L'IFN di tipo I (IFN-I) gioca un ruolo importante sia diretto contro la crescita tumorale sia indiretto attraverso la stimolazione della risposta immune contro tumori e agenti patogeni. Il segnale indotto dall'IFN-I attraverso il proprio recettore porta all'attivazione di una serie di fattori trascrizionali, tra cui membri della famiglia degli *Interferon Regulatory Factors* (IRF). Di questi, IRF-8 è un importante regolatore della mielopoiesi e agisce come gene soppressore tumorale. Studi recenti del nostro laboratorio e di altri gruppi hanno evidenziato come molte delle attività stimulate dall'IFN-I nel sistema immunitario passano attraverso l'attivazione funzionale delle cellule dendritiche (DC). Nel topo sono conosciute diverse sottopopolazioni di DC, caratterizzate da fenotipo e funzionalità definiti. In particolare, le DC CD8-alpha+ presenti nella milza e nei linfonodi sono le uniche APC in grado di stimolare il *cross-priming* dei linfociti T CD8+ contro antigeni esogeni. Questo processo riveste enorme importanza nell'induzione della risposta citotossica contro gli antigeni tumorali, che sono di derivazione esogena. Recentemente, è stato riportato che l'IFN-I è in grado di promuovere il *cross-priming* dei linfociti T CD8+ contro antigeni solubili o di derivazione virale sia stimolando direttamente i linfociti sia attraverso l'attivazione delle DC. Inoltre, IRF-8 è un fattore essenziale per il differenziamento delle DC CD8-alpha+. Il gruppo coordinato dal responsabile ha una consolidata esperienza nell'utilizzo di modelli sperimentali murini per lo studio dello sviluppo e delle funzioni delle sottopopolazioni di DC nell'ambito della modulazione della risposta immune anti-tumorale. In questo ambito, questo progetto sarà strutturato in due parti finalizzate a valutare: i) l'efficacia dell'IFN-I nella stimolazione del *cross-priming* dei linfociti T CD8+ verso antigeni derivati da cellule tumorali, e ii) il ruolo di IRF-8 nell'immunosorveglianza dei tumori e nella regolazione dell'espressione genica di antigeni tumorali.

Risultati attesi nel triennio

Al fine di valutare l'effetto dell'IFN-I sul *cross-priming* mediato da DC, verranno utilizzate le cellule tumorali EG7.OVA, una linea di timoma murino che esprime il peptide SIINFEKL dell'ovalbumina (OVA) nel contesto di MHC-I, indotte all'apoptosi mediante esposizione a raggi UV. Le DC verranno coltivate con cellule EG7.OVA apoptotiche e saggiate per la loro capacità di fagocitare i corpi apoptotici e di *cross-presentare* l'antigene di OVA a linfociti T CD8+ OVA-specifici di topi transgenici OT-I, in presenza o in assenza di IFN-I. Studi preliminari indicano che il trattamento con IFN-I aumenta sia l'attività fagocitica delle DC, in particolare delle DC CD8-alpha+, sia la permanenza dei corpi apoptotici all'interno dei compartimenti intracellulari. Questo fenomeno, secondo i dati della letteratura recente, potrebbe favorire la via di *cross-presentazione* in MHC di classe I rispetto alla via classica di presentazione degli antigeni esogeni in MHC di classe II. Esperimenti *in vitro* indicano che le cellule dendritiche caricate con i corpi apoptotici di EG7.OVA in presenza di IFN-I sono in

grado di *cross*-presentare con maggior efficienza l'antigene di OVA ai linfociti T OT-I. Ci aspettiamo quindi di osservare una maggiore risposta CD8 OVA-specifica anche in esperimenti di immunizzazione *in vivo*.

Per quanto riguarda lo studio del ruolo di IRF-8 nell'immunosorveglianza dei tumori e nella regolazione dell'espressione di antigeni tumorali, abbiamo messo a punto un modello tumorale murino nel quale sono espressi ad elevati livelli sia IRF-8 che l'antigene tumorale CTCFL/BORIS (*Brother Of the Regulator of Imprinted Sites*), un gene recentemente scoperto e appartenente alla famiglia dei cosiddetti *Cancer Testis Antigen*. Questo modello consiste in linee cellulari di melanoma B16 trattate con farmaci demetilanti il DNA. I nostri esperimenti preliminari su cellule B16 trattate *in vitro* con il farmaco ad azione ipometilante del DNA 5-deossi-2'-Azacitidina (detto anche decitabina) hanno evidenziato che il trattamento con questo farmaco induce in modo transiente un rallentamento della proliferazione delle cellule B16 e apoptosi e, allo stesso tempo, una drastica iper-espressione simultanea di CTCFL e di IRF-8. Dato la nota attività demetilante della decitabina, questo risultato ci ha indotto ad ipotizzare che l'induzione di apoptosi e la demetilazione del DNA, fenomeni entrambi indotti da decitabina nel nostro modello, possano essere considerati due meccanismi il cui effetto ultimo è quello di promuovere un incremento generale dell'espressione genica, inclusi i geni che codificano per CTCFL e IRF-8. Esperimenti di trapianto di cellule di melanoma B16 in topi deficienti per IRF-8 (IRF-8^{-/-}) e immunocompetenti (WT) indicano una maggiore progressione tumorale nei topi IRF-8^{-/-} rispetto ai topi WT, con conseguente riduzione della sopravvivenza dei primi. Inoltre, dati preliminari hanno indicato una forte iper-espressione sia di CTCFL che di IRF-8 in tumori prelevati dai topi WT, mentre livelli molto bassi di ambedue le proteine sono stati rilevati in tumori espianati dai topi IRF-8^{-/-}. Sulla base di questi dati andremo ad analizzare se IRF-8, in qualità di fattore di trascrizione, sia direttamente coinvolto nella modulazione dell'espressione di CTCFL e se questa attività possa essere correlata alle caratteristiche di crescita del tumore. Come approccio a questa strategia, nella prima fase di questo progetto effettueremo esperimenti di *ChIP assay* per verificare le interazioni molecolari dirette tra CTCFL e IRF-8. Nella seconda fase di questi studi valuteremo il ruolo di IRF-8 come gene soppressore tumorale nell'immunosorveglianza dei tumori. A tale fine, utilizzeremo topi MT/ret-tg, transgenici per l'oncogene umano ret fuso al *promoter-enhancer* del gene della metallotionina (MT) murina; tale ceppo, la cui colonia verrà allestita nello stabulario per topi transgenici dell'ISS grazie alla collaborazione con il laboratorio del Dott. V. Umansky (*Skin Cancer Unit, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany*) che fornirà le coppie, rappresenta un modello particolarmente adatto allo studio del melanoma cutaneo maligno umano.

Trasferibilità dei risultati

L'esecuzione di questo progetto permetterà di acquisire informazioni cruciali nella comprensione dei meccanismi molecolari alla base di processi biologici quali la presentazione di antigeni tumorali da parte di DC che è necessaria per la stimolazione di una risposta antitumorale efficace. L'acquisizione di queste conoscenze sarà funzionale al disegno di strategie antitumorali mirate alla modulazione della risposta immune. Parallelamente, gli studi finalizzati a comprendere le interazioni molecolari tra fattori che regolano i processi di carcinogenesi, quali CTCFL e IRF-8, consentiranno di definire nuove molecole potenzialmente utili nel disegno di terapie molecolari innovative per il trattamento di patologie oncologiche.

Studio della risposta infiammatoria e del metabolismo dell'acido arachidonico nei neutrofili di pazienti con Fibrosi Cistica (FC)

Nella Fibrosi Cistica (FC) si riscontra una carenza e uno squilibrio di acidi grassi essenziali, che sono strettamente correlati con la risposta infiammatoria delle cellule. La lesione polmonare

nella FC è caratterizzata da un processo auto-perpetuantesi di ostruzione delle vie aeree, infezione e infiammazione e recenti studi suggeriscono che ci sia un'esagerata risposta infiammatoria.

Ci sono anche evidenze sperimentali ed epidemiologiche che nella CF ci sia un'associazione tra il difetto genetico e l'alterato metabolismo degli acidi grassi insaturi. Le alterazioni più frequenti riguardano gli acidi grassi poliinsaturi, in particolare si evidenzia una diminuzione dell'acido linolenico (LA: 18:3) e dell'acido decosaesaenoico (DHA: 22:6). È noto che il metabolismo di questi acidi grassi polinsaturi è strettamente legato alla produzione di mediatori dell'infiammazione.

È stato dimostrato che l'integrazione alimentare con olio di pesce, che è una miscela di acidi grassi poliinsaturi che include anche il DHA, tende a diminuire la risposta pro-infiammatoria in diverse patologie umane inclusa la FC. Nella FC, pertanto, c'è una forte indicazione terapeutica per una integrazione alimentare con preparazioni arricchite di solo DHA possano essere benefiche per la risposta all'infezione in questi pazienti.

Risultati attesi nel triennio

L'infezione polmonare nella fibrosi cistica è dominata dai neutrofili. Tuttavia, poche sono le conoscenze sulle relazioni tra metabolismo degli acidi grassi polinsaturi, e in particolare del solo DHA e risposta infiammatoria del neutrofilo nella FC. Dal 2007 è iniziato uno studio sulla risposta infiammatoria e del metabolismo dell'acido arachidonico nei neutrofili di pazienti con FC in collaborazione con il Centro di riferimento del Lazio per lo studio della fibrosi cistica.

In particolare, sono stati già arruolati dieci pazienti che saranno studiati prima e dopo la supplementazione alimentare con una preparazione purificata di DHA per 12 mesi. Si stanno valutando in questi pazienti gli effetti della integrazione alimentare sulla cascata metabolica dell'acido arachidonico, la sintesi di citochine e le proprietà adesive del neutrofilo nonché la risposta immuno-infiammatoria sistemica. Inoltre, stiamo correlando tali variazioni al genotipo e il fenotipo clinico della malattia.

Lo scopo è quello di dare un contributo alla conoscenza sui fattori che modulano la infezione leucocitaria nei pazienti FC.

Trasferibilità dei risultati

Queste conoscenze, in breve tempo, si potranno tradurre in interventi terapeutici/dietetici mirati a modulare/attenuare la risposta infiammatoria posta in atto dai neutrofili in risposta alle infezioni batteriche, mediante supplementazione dietetica con acidi grassi polinsaturi. La stretta collaborazione con il centro clinico della fibrosi cistica in Roma sta permettendo, inoltre, un utilizzo immediato delle conoscenze acquisite nella pratica clinica del centro clinico stesso.

Studio delle caratteristiche immunogeniche del nuovo antigene tumorale CTCFL e del suo potenziale utilizzo in strategie innovative di immunoterapia del cancro

Il gene CTCFL/BORIS (*Brother of the Regulator of Imprinted Site*), è un gene *cancer testis* (CT) la cui espressione è limitata ad alcuni stadi dello sviluppo delle cellule germinali maschili e ad una grande varietà di cellule neoplastiche, siano esse linee cellulari o tumori primari. L'espressione condizionata di CTCFL in cellule normali determina la demetilazione e la derepressione di MAGE-A1 e la riattivazione di altri geni CT come NY-ESO-1 e Oct-4, quest'ultimo di notevole interesse perché considerato un fattore caratterizzante (marcatore diagnostico?) di cellule staminali tumorali. Di conseguenza, è stato suggerito che CTCFL possa agire come oncogene e che la sua espressione a stadi precoci del processo di carcinogenesi determini la deregolazione e l'attivazione di molti geni CT. Evidenze iniziali suggeriscono che CTCFL stesso è regolato dalla metilazione del DNA poiché la sua espressione è indotta in cellule tumorali dal trattamento con un agente modulatore epigenetico quale l'inibitore della

metil-trasferasi (DNMT) 5-aza-2'-deossicitidina. È di notevole interesse la recente dimostrazione che, in un modello murino di carcinoma mammario metastatico, un vaccino a DNA del gene CTCFL è in grado di indurre linfociti T CD8+ citotossici con una potente attività antitumorale, capaci di lisare, in modo ristretto da molecole MHC di classe I, linee cellulari tumorali di origine istologica distinta. Nel loro insieme, queste evidenze suggeriscono che CTCFL è un antigene espresso molto precocemente nei tumori, e che può controllare l'induzione di altri geni CT e aumentare l'immunogenicità di alcuni tumori. Conseguentemente, CTCFL rappresenta un nuovo bersaglio potenzialmente di interesse nel disegno di strategie di immunoterapie innovative per il trattamento di patologie oncologiche.

Dal punto di vista clinico, gli agenti modulatori epigenetici, recentemente al centro di grande interesse come farmaci antitumorali, promuovono fortemente l'espressione di antigeni CT così come di molecole MHC di classe I e di altre molecole costimolatorie. Conseguentemente, nonostante l'iniziale preoccupazione sulla capacità dei farmaci epigenetici di attivare antigeni CT, sono sempre più considerate, per l'utilizzo clinico, terapie combinate basate sull'utilizzo di diverse classi di questi farmaci e di vaccini diretti verso antigeni CT. In relazione a ciò, un grande sforzo scientifico è diretto a sviluppare una seconda generazione di farmaci epigenetici più efficaci e più selettivi. Tra essi l'apicidina così come il depsipeptide sono considerati promettenti candidati. Tuttavia, resta da delucidare le vie molecolari attraverso cui questi farmaci possono esplicare attività antitumorali congiunte.

Alla luce di tutto ciò, i principali obiettivi del presente studio possono essere riassunti come segue: i) indagare le caratteristiche immunologiche di CTCFL come potenziale bersaglio di nuove strategie di immunoterapia del cancro; ii) stabilire potenziali correlazioni tra l'induzione di CTCFL da parte di agenti epigenetici e l'aumento della risposta immunologica e clinica a vaccini diretti contro CTCFL, nel tentativo di disegnare nuove terapie basate sull'uso combinato di farmaci convenzionali ed immunoterapie; iii) analizzare l'espressione di CTCFL e dei segnali cellulari ad esso correlati in cellule staminali tumorali.

Risultati attesi nel triennio

La realizzazione del presente progetto permetterà di acquisire importanti e fondamentali conoscenze per la caratterizzazione delle proprietà del nuovo antigene tumorale CTCFL e il disegno di nuovi ed efficaci approcci terapeutici basati sul suo utilizzo. In particolare, nella prima parte dello svolgimento dell'attività di ricerca descritta ci si attende di identificare peptidi antigenici della proteina CTCFL riconosciuti da linfociti T CD8+ e di caratterizzarne il potenziale immunogenico. A riguardo, studi preliminari hanno indicato la presenza di una sequenza peptidica della proteina CTCFL che presentata da molecole HLA-A(*)02.01 è capace di stimolare linfociti T CD8+ *in vivo* in un modello di topi transgenici per l'HLA-A(*)02.01 umano. La prosecuzione di questi studi permetterà di verificare se CTCFL può essere naturalmente processato in cellule umane e presentato a linfociti T, e quindi rappresentare effettivamente un bersaglio verso cui stimolare la risposta immune antitumorale. Studi successivi permetteranno inoltre di valutare se i peptidi antigenici di CTCFL identificati hanno la capacità di stimolare linfociti T CD8+ da sangue periferico di pazienti oncologici CTCFL+, inclusi pazienti con leucemia acuta linfoblastica BCR-ABL+/-, già testati e risultati positivi per l'espressione di questa proteina in saggi di RT-qPCR e *Western Blot* effettuati nel laboratorio del gruppo responsabile.

La seconda parte del progetto sarà focalizzata a studiare la modulazione dell'espressione di CTCFL e dei segnali molecolari ad essa associati da parte di farmaci epigenetici quali l'apicidina e il depsipeptide in cellule di carcinoma mammario e melanoma, due patologie oncologiche in cui vengono utilizzati farmaci epigenetici per il trattamento terapeutico. A questo scopo verranno svolti anche esperimenti *in vivo* utilizzando modelli xeno-chimerici in topi SCID. Dati preliminari indicano che ambedue i farmaci considerati hanno la capacità di

modulare l'espressione di CTCFL in linee di carcinoma mammario. Gli studi proposti permetteranno di valutare se la modulazione di CTCFL da parte di farmaci epigenetici può essere correlata ad un aumento dell'immunogenicità del tumore. A questo riguardo, mediante esperimenti di *microarray* verranno chiarite le vie molecolari associate alla modulazione di questo antigene tumorale e verrà verificato il potenziale valore terapeutico di terapie antitumorali basate sull'utilizzo di farmaci in combinazione. Nell'ultima fase sperimentale della presente proposta, verrà valutata la modulazione dell'espressione di CTCFL in cellule staminali tumorali da tumori del colon-retto e da carcinoma prostatico e verranno studiate le vie molecolari ad essa associate con l'obiettivo di raccogliere nuove conoscenze sui processi di carcinogenesi e sulle basi molecolari correlate alle diverse fasi di sviluppo del tumore.

Trasferibilità dei risultati

Il conseguimento degli obiettivi del presente progetto permetterà di raccogliere nuove conoscenze fondamentali per la comprensione di fenomeni complessi come le vie di segnale associate alla modulazione di antigeni tumorali, quali CTCFL, sotto il potenziale controllo di terapie epigenetiche. In aggiunta, questi studi permetteranno di capire se terapie basate sull'utilizzo di farmaci epigenetici possono essere vantaggiosamente combinate con approcci di immunoterapia per ottenere simultaneamente un'attività antitumorale diretta e una risposta immunitaria antitumorale efficace. La comprensione dei meccanismi molecolari associati all'attivazione dell'antigene tumorale CTCFL, esaminata in tutti gli stadi di carcinogenesi a partire dalle cellule staminali, permetterà quindi di chiarire alcuni aspetti dei processi molecolari alla base dello sviluppo dei tumori e consentirà di valutare un potenziale utilizzo di CTCFL in approcci di immunoterapia.

Sviluppo del *Nerve Growth Factor* (NGF) come farmaco per il trattamento di patologie oculari e neurodegenerative

Il presente progetto, presentato dall'Unità CNR coordinata dal Dott. Luigi Aloe, ha come scopo principale quello di valutare il possibile uso terapeutico della somministrazione di *Nerve Growth Factor* (NGF) come collirio. Obiettivi specifici del progetto sono: i) analizzare gli effetti neurobiologici e neurocomportamentali dell'NGF murino somministrato come collirio in modelli animali di patologie neurodegenerative e in animali anziani; ii) caratterizzare le popolazioni neuronali del sistema nervoso centrale che rispondono all'NGF in collirio mediante l'uso di tecniche di doppia immunoistochimica e/o di sonde marcate con radioisotopi; iii) comparare l'efficienza biologica dell'NGF murino con la forma ricombinante umana (RhNGF) e studiarne l'azione neuroprotettiva in modelli animali.

Risultati attesi nel triennio

Descrizione dei meccanismi attraverso i quali l'NGF murino e/o l'hrNGF, somministrati come collirio in modelli animali di malattie neurodegenerative, raggiungono il sistema nervoso centrale e ne promuovono il trofismo, migliorando le prestazioni cognitive. Un importante output è rappresentato da un approfondimento dei processi alla base della neurodegenerazione, che caratterizza i fenomeni di invecchiamento, grazie allo studio del ruolo dell'NGF su indici comportamentali/cognitivi e su *marker* neurobiologici di plasticità cerebrale.

Trasferibilità dei risultati

Questo studio potrebbe permettere lo sviluppo industriale di un farmaco con potenziale applicazione clinica.

Sviluppo delle lesioni vascolari nell'arteriosclerosi: interazione tra processi metabolici e infiammatori e le lipoproteine aterogene. Studio sui meccanismi cellulari e molecolari alla base del ruolo aterogenico dei trigliceridi e del colesterolo trasportati dai *remnant* dei chilomicroni

Questa linea di ricerca è in continuità con l'attività perseguita da molti anni che è quella dello studio dei meccanismi che conducono all'accumulo lipidico nei macrofagi vascolari. Oltre alla ricerca sulle LDL, lo studio dei *remnant* dei chilomicroni e dei meccanismi che regolano il loro metabolismo stanno assumendo un ruolo sempre più rilevante nel comprendere le relazioni tra lipidi, lipidi alimentari e sviluppo della malattie cardiovascolare. È ormai chiaro che gli studi sul metabolismo lipoproteico a digiuno non rispecchiano il metabolismo nell'uomo, che passa circa i $\frac{3}{4}$ della propria vita in fase post-prandiale. I nostri studi precedenti hanno chiaramente mostrato che i *remnant* dei chilomicroni interagiscono con le cellule vasali e che l'interazione macrofago-*remnant* induce la formazione di *foam* mediante accumulo sia di trigliceride che di colesterolo, indipendente dall'ossidazione e determinati da meccanismi di *uptake* lipidico diversi, parzialmente concomitanti e indipendenti e modulati da molti fattori cellulari. Tali processi hanno anche un effetto sulle funzioni immunitarie del macrofago. Abbiamo anche dimostrato che molti micronutrienti influenzano tali eventi. C'è un grande interesse sanitario, economico e sociale per capire il meccanismo cellulare e molecolare di prevenzione della malattia cardiovascolare mediante appropriata alimentazione e supplementazione dietetica con micronutrienti. Tale interesse è anche testimoniato dal mercato fiorente, ma non sempre controllato nell'efficacia e nella sicurezza, di micronutrienti, integratori e di antiossidanti presente sui banchi di farmacie, profumerie e supermercati.

Risultati attesi nel triennio

I nostri studi perseguono l'obiettivo di aumentare le conoscenze sulle relazioni metaboliche e cellulari che ci sono tra la nostra alimentazione e i micronutrienti in essa contenuti e lo sviluppo di malattie ad alto rischio cardiovascolare, quali le dislipidemie, la sindrome metabolica, l'obesità e il diabete. Infatti, è ormai noto che molte abitudini di stile di vita influenzano profondamente lo sviluppo di malattie croniche tipiche delle popolazioni occidentali, ma i meccanismi cellulari e molecolari con cui l'organismo opera tale regolazione sono per lo più ignoti.

Ci si aspetta che una maggiore conoscenza sui meccanismi di regolazione cellulare da parte dei componenti dei *remnant* dei chilomicroni possano fornire un utile *tool* cognitivo per lo sviluppo di nuovi approcci preventivi e terapeutici per le malattie associate ad un maggior rischio di malattie cardiovascolari.

Trasferibilità dei risultati

Ampio e non sopito è il dibattito sul ruolo aterogenico dei trigliceridi. Se l'ipotesi di diverso fattore di rischio per le due componenti lipidiche principali dei *remnant* dei chilomicroni sarà confermata, ne deriverà un diretto suggerimento per la pratica clinica. Fino ad oggi si utilizza come parametro clinico di riferimento il livello plasmatico di trigliceridi e di colesterolo a digiuno. Le evidenze sempre più marcate della aterogenicità dei *remnant* alimentari, presenti solo nella fase post-prandiale, e di un diverso ruolo patogenico dei trigliceridi e del colesterolo trasportati dalla stessa particella, suggeriscono che la determinazione dei livelli di lipidi in questa fase potrebbero essere più informativi rispetto al rischio di malattia cardiovascolare attribuibile ai trigliceridi.

Sviluppo e ottimizzazione di procedure compatibili con l'uso clinico per la preparazione di cellule dendritiche differenziate in presenza di interferone- alfa, di cellule NK e di linfociti T regolatori

Partendo dalla valutazione dell'importanza di creare un centro pubblico di riferimento in grado di produrre cellule in condizioni GMP per lo sviluppo di progetti clinici innovativi il gruppo ha portato avanti il progetto di costruzione e attivazione dell'"officina farmaceutica" FaBioCell, dedicata alla preparazione di farmaci cellulari per sperimentazione clinica. L'attività principale di FaBioCell consisterà nella preparazione in condizioni GMP di cellule e reagenti per sperimentazioni cliniche innovative soprattutto nel settore dell'immunoterapia dei tumori in collaborazione con centri clinici. Attualmente sono state completate le fasi di convalida della struttura e del processo di produzione di cellule dendritiche (DC) ottenute mediante la coltivazione di monociti umani con GM-CSF e IFN-alfa (IFN-DC) che sono oggetto di un brevetto del nostro gruppo approvato e in fase di registrazione negli Stati Uniti. I risultati di queste attività costituiscono la documentazione propedeutica alla richiesta di ispezione all'autorità regolatoria competente (AIFA) per l'ottenimento dell'autorizzazione alla produzione di farmaci cellulari presso FaBioCell. Il primo impiego clinico delle IFN-DC prevede il loro inoculo, successivo a trattamento chemioterapico, in lesioni neoplastiche accessibili di pazienti affetti da diversi tipi di tumori solidi. Il rationale alla base di tale approccio prevede che gli antigeni tumorali liberati a seguito dell'azione citotossica dell'agente chemioterapico vengano catturati dalle IFN-DC inoculate nella lesione, con conseguente induzione di risposta immune antitumorale (vaccinazione *in situ*). L'attuale fase di disegno dello studio clinico di fase I considera l'arruolamento di pazienti affetti dalle seguenti neoplasie: i) melanoma metastatico cutaneo (inoculo di IFN-DC nelle lesioni cutanee); ii) melanoma stadio III con metastasi nel linfonodo regionale in assenza di metastasi diffuse (inoculo di IFN-DC nel linfonodo); iii) carcinoma dell'ano recidivante; iv) carcinoma della cervice uterina (inoculo di IFN-DC nelle lesioni tumorali residuali dopo chirurgia); v) metastasi locali dei tumori della testa e del collo.

Sarà inoltre completato lo sviluppo delle procedure per l'espansione su larga scala di cellule NK e di cellule T regolatorie umane, in collaborazione con il gruppo del Prof. Robin Foà (Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università Sapienza, Roma). La convalida verrà effettuata mediante l'utilizzo di raccolte aferetiche ottenute da donatori sani. Scopo di queste procedure è l'ottenimento di prodotti cellulari compatibili con l'uso clinico da utilizzarsi in protocolli sperimentali per il controllo della malattia residua minima in pazienti con leucemia mieloide acuta (AML) o leucemia linfoide acuta (ALL).

Le attività sopra descritte sono attualmente finanziate nell'ambito del Programma Integrato Oncologia coordinato dall'ISS (Programma Straordinario Oncologia, DM 21 luglio 2006, Ministero della Salute).

Risultati attesi nel triennio

- Ottenimento dell'autorizzazione alla produzione di farmaci sperimentali, in primo luogo IFN-DC.
- Avvio del primo studio clinico basato sull'inoculo intralesionale di IFN-DC dopo trattamento chemioterapico in pazienti oncologici.
- Sviluppo e convalida del metodo di produzione compatibile con l'uso clinico di cellule NK e linfociti Treg.

Trasferibilità dei risultati

Lo studio clinico proposto permetterà di valutare la capacità funzionale di IFN-DC di catturare *in vivo* antigeni esogeni come i corpi apoptotici prodotti dalle cellule tumorali dopo il trattamento chemioterapico. Questa modalità di incorporazione di antigeni può portare alla presentazione di un ampio spettro di antigeni tumore associati (TAA), inclusi gli antigeni unici,

e quindi all'induzione di un più ampio e potenzialmente più selettivo ed efficace repertorio di risposte mediate dalle cellule T.

Lo sviluppo dei metodi di produzione di cellule NK e linfociti Treg, compatibili con l'uso clinico, porterà allo sviluppo di ulteriori protocolli di immunoterapia in campo oncologico.

Terapia cellulare delle malattie neurodegenerative e delle lesioni spinali attraverso l'utilizzo di cellule staminali neurali ingegnerizzate a produrre ridotti livelli di Timosina beta4

La Timosina beta4 (Tb4) è un piccolo peptide capace di influenzare i delicati equilibri di polimerizzazione dell'actina citoscheletrica. La Tb4 è ampiamente espressa nel sistema nervoso centrale sia embrionale che adulto ma il suo ruolo nel differenziamento neuronale e nella crescita neuritica risulta contraddittorio. È stato infatti dimostrato che, in colture primarie neuronali, la sovraespressione di Tb4 incrementa la ramificazione neuritica mentre, nei neuroni pedali di *Lymnaea stagnalis* la sua riduzione favorisce la crescita neuritica. Il possibile ruolo della Tb4 nel differenziamento e nella crescita neuritica delle cellule staminali neurali (NSC) è attualmente sconosciuto.

I nostri studi indicano che la riduzione dei livelli di Tb4 nelle NSC embrionali murine promuove il differenziamento verso un fenotipo neuronale, portando ad un aumento significativo dei neuroni in coltura. Inoltre, i neuroni che si sviluppano possiedono un maggior numero di neuriti, significativamente più estesi, a formare una rete elaborata di connessioni. Obiettivo del presente progetto è quindi la valutazione delle capacità riparative e integrative delle NSC con ridotti livelli di Tb4 *in vivo*, in seguito al trapianto in roditori con danno cerebrale o spinale indotto.

Risultati attesi nel triennio

- Ruolo della Tb4 nel promuovere il differenziamento neuronale delle NSC *in vitro*.
- Capacità riparativa e integrativa delle NSC murine e umane, con ridotti livelli di Tb4, dopo trapianto in roditori con danno cerebrale o spinale indotto.

Trasferibilità dei risultati

La rigenerazione del tessuto nervoso mediante l'utilizzo di cellule staminali è oggi la speranza di numerosi pazienti affetti da malattie neurodegenerative o da lesioni al midollo spinale. I costi umani e sociali di tali patologie sono elevatissimi, poiché quelle neurodegenerative sono a lenta progressione mentre, per i traumi spinali, l'80% dei casi riguarda giovani tra i 10 e i 40 anni. Qualora la realizzazione del presente progetto dimostrasse un'efficacia terapeutica *in vivo* delle NSC ingegnerizzate a produrre ridotti livelli di Tb4, le ricadute sul Servizio Sanitario Nazionale sarebbero estremamente rilevabili.

Terapia sperimentale delle malattie da prioni: un approccio basato sull'utilizzo degli anticorpi intracellulari

Le Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST) o malattie da prioni sono un gruppo eterogeneo di malattie neurodegenerative dell'uomo (per es. Malattia di Creutzfeldt-Jakob) e degli animali (per es. Scrapie). L'accumulo di una proteina amiloidea denominata PrPsc è il *marker* di tutte le EST. La PrPsc è l'isoforma alterata nella conformazione della PrPc, una glicoproteina di membrana codificata dall'ospite. La conversione della PrPc nella PrPsc è l'evento chiave di queste malattie. Per interferire con i meccanismi cellulari alla base della neurodegenerazione nelle malattie da prioni ci proponiamo di utilizzare la tecnologia degli anticorpi intracellulari. Questo approccio si basa sulla possibilità di manipolare i geni per gli

anticorpi in modo da ottenere nuove molecole più efficaci e permettere la loro espressione in diversi organismi, tessuti e compartimenti intracellulari. In particolare, frammenti anticorpali anti-prione a singola catena (scFv) saranno utilizzati per inibire specificamente la proteina prionica cellulare a livello del reticolo endoplasmico e bloccare la formazione e l'accumulo della isoforma patogenetica. Ci proponiamo di creare topi transgenici che esprimono i frammenti anticorpali anti-prione nel sistema nervoso centrale (SNC) e caratterizzare il loro fenotipo. Questi animali verranno inoculati con i prioni per verificare se la mancata esposizione in membrana della PrPc, dovuta alla presenza dell'anticorpo intracellulare, riesce a prevenire e/o ritardare la malattia.

Risultati attesi nel triennio

Questa strategia sperimentale permetterà, da una parte, di studiare la biogenesi, il traffico intracellulare e il sito di conversione della proteina prionica cellulare nella isoforma patologica scrapie e, dall'altra, aprirà la strada alla ricerca di molecole anti-prioniche, utili allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per le malattie da prioni nell'uomo (in particolare per le forme familiari e iatrogene).

Trasferibilità dei risultati

Mediante vettori specifici (adeno o retrovirali) targettati per l'SNC è possibile ipotizzare il trasferimento sull'uomo della terapia con intracellulari.

Valutazione di nuovi target terapeutici in modelli preclinici di tumori della mammella e dell'ovaio over-esprimenti HER2

L'over-espressione del proto-oncogene HER2/neu, codificante per il TCR di EGF p185 (o ErbB2 o HER2) si presenta in ca. il 30% dei casi di carcinoma della mammella, in cui correlano con il grado del tumore, la dimensione della lesione, la metastasi linfonodale e la sopravvivenza della paziente. Il prodotto di HER2/neu rappresenta un utile target terapeutico sia per anticorpi monoclonali umanizzati (Trastuzumab) diretti contro domini specifici della glicoproteina che per inibitori di tirosin chinasi, con conseguenti effetti su proliferazione cellulare, differenziamento e risposta a chemioterapici. Il possibile potenziamento delle attuali terapie mirate contro tumori over-esprimenti HER2 è considerato un obiettivo importante per superare le limitazioni associate a possibili effetti collaterali o all'eventuale insorgenza di resistenza. Uno studio pilota condotto nel nostro laboratorio ha dimostrato per la prima volta che l'inibizione di una fosfolipasi specifica del ciclo della fosfatidilcolina (PC) induce *down*-modulazione, internalizzazione e rallenta il riciclo di ErbB2 in cellule di carcinoma mammario, con forte ritardo nella ri-espressione del recettore, e accentuato effetto antiproliferativo. Obiettivo del presente progetto è la valutazione degli effetti dell'inibitore già testato e di altri inibitori di enzimi del ciclo della PC sulla amplificazione genica e overespressione di HER2, in tumori mammari e ovarici *over*-esprimenti questo recettore.

Risultati attesi nel triennio

- Caratterizzazione, in cellule di tumore mammario e ovarico *over*-esprimenti HER2, delle modifiche indotte da inibitori del ciclo della PC su: i) formazione di eterodimeri di HER2 con altri membri della famiglia dei recettori di EGR (EGFR, HER3, HER4); ii) fosforilazione di HER2, fosfoproteomica dei *pathway* di proliferazione e sopravvivenza cellulare, e iii) amplificazione di HER2/neu a livello trascrizionale.
- Valutazione con metodi MRS e di biologia cellulare degli effetti antiproliferativi e apoptotici dell'esposizione delle cellule tumorali a detti inibitori, come tali o in combinazione a Trastuzumab e/o a farmaci.
- Valutazione (con metodi MRI e MRS) degli effetti antiproliferativi e antimetastatici *in vivo* associati al trattamento di xenotrapianti di cellule *over*-esprimenti HER2 in topi

immunodeficienti con inibitori di enzimi del ciclo della PC, a confronto o in combinazione con terapie correnti (chemoterapici, Trastuzumab).

Trasferibilità dei risultati

Il progetto ha una elevata potenzialità di trasferibilità dei risultati dal laboratorio alla clinica, in relazione alla possibilità di *down*-modulazione e de-amplificazione di HER2 in tumori mammari *over*-esprimenti questo recettore, con l'aspettativa di potenziare le odierne terapie mirate adottate contro questo tipo di tumori, sia in fase precoce che avanzata e limitandone alcuni effetti collaterali. I risultati della ricerca potrebbero avere un impatto di forte rilievo anche sul carcinoma ovarico *over*-esprimente HER2, su cui le odierne terapie basate sull'utilizzo di Trastuzumab hanno sinora dimostrato scarsa efficacia. Infine, gli effetti di terapie basate sull'uso di inibitori di enzimi del ciclo della PC possono essere monitorizzati con metodi non invasivi di spettroscopia a risonanza magnetica, basati sulle alterazioni dei profili metabolici della colina e suoi derivati *in vivo*.

Valutazione *in vivo* del potenziale immunogenico e terapeutico della vaccinazione con la proteina VK3-20 nel modello chimerico di topi SCID ricostituiti con linfociti del sangue periferico umani

La presente linea di ricerca afferisce al progetto "Sviluppo di vaccini idiotipici per studi di fase I/II di immunoterapia *subset*-specifico per pazienti con disordini linfoproliferativi a cellule B" (Responsabile: Dott. Riccardo Dolcetti, CRO, Aviano). Studi precedenti hanno dimostrato che la proteina VK3-20, frequentemente espressa in linfomi B Non-Hodgkin HCV-associati, è immunogenica in sistemi *ex vivo* ed è in grado di indurre risposte citotossiche specifiche nei riguardi di proteine VK correlate ed utilizzate anche da altri di linfomi/leucemie a cellule B. La presente linea di ricerca ha l'obiettivo di valutare l'immunogenicità di VK3-20 nel modello xeno-chimerico Hu-PBL-SCID di topi totalmente immunodeficienti SCID ricostituiti con PBL umani. Topi SCID verranno ricostituiti con PBL umani e immunizzati con cellule dendritiche (DC) autologhe, differenziate in presenza di GM-CSF e IFN-alfa (IFN-DC), caricate con VK3-20 ricombinante. Dopo due vaccinazioni di richiamo, verrà valutata l'entità e la qualità (profilo TH1 vs TH2) della risposta umorale e cellulare dei linfociti umani recuperati dal peritoneo e dalla milza delle xeno-chimere.

L'efficacia protettiva di tali risposte sarà quindi valutata dopo inoculo delle xenochimere immunizzate con linee cellulari di linfomi o leucemie B, HLA classe I-compatibili con il sistema DC-PBL.

Risultati attesi nel triennio

Valutazione della capacità di Ig clonotipiche ricombinanti di indurre risposte immuni specifiche e protettive *in vivo*, nel modello Hu-PBL-SCID. Verrà effettuata un'accurata valutazione immunofenotipica e funzionale dei linfociti recuperati dalle xenochimere vaccinate con VK3-20 vs VK3-20 coniugata con KLH. Verrà studiata anche la possibilità di potenziare la risposta immune attraverso adiuvanti quali i ligandi dei *Toll-like Receptor* (TLR). Lo stadio differenziativo e di attivazione dei linfociti T recuperati dalle xeno-chimere immunizzate saranno valutati mediante analisi citofluorimetrica e saggi funzionali. In particolare, la funzione effettrice dei linfociti T CD8+ sarà valutata sia tramite saggio ELISPOT, sia tramite saggi citofluorimetrici per la determinazione della produzione di citochine.

Particolare interesse sarà rivolto alla valutazione dell'efficacia protettiva della vaccinazione, e cioè alla capacità dei linfociti T Id-specifici indotti ed espansi nelle xenochimere di esercitare *in vivo* attività citotossica *cross*-reattiva nei confronti di linee cellulari presentanti epitopi Id-correlati nel contesto di definiti alleli HLA di classe I, che verranno inoculate nelle xenochimere immunizzate.

Trasferibilità dei risultati

L'impiego su larga scala di vaccinazioni anti-idiotipiche per il trattamento di linfomi/leucemie è ostacolato dal fatto che i vaccini devono essere prodotti singolarmente e in maniera individualizzata per ciascun paziente, con una notevole complessità di produzione e costi difficilmente sostenibili. È stato recentemente dimostrato che vari istotipi di neoplasie a cellule B possono utilizzare gli stessi segmenti genici Ig. Il progetto a cui afferisce la presente linea di ricerca ha come obiettivo l'attivazione di uno studio clinico di fase I/II basato sull'utilizzo della proteina idiopica VK3-20 quale vaccino per il trattamento di linfomi a basso grado di malignità esprimenti catene leggere molecolarmente correlate. I risultati della attività di ricerca saranno quindi funzionali allo sviluppo di nuovi vaccini idiotipici ricombinanti da applicarsi in schemi di immunoterapia "subset-specifica" per disordini linfoproliferativi.

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 (TSE). Il GESTISS riceve richieste di pareri dal Ministero della Salute, dall'AIFA, da altri Ministeri, dai vari Dipartimenti dell'ISS.

Il gruppo, in particolare è impegnato nelle seguenti attività:

- valutazione delle autorizzazioni all'immissione in commercio di prodotti medicinali per uso umano e veterinario contenenti materiali di origine umana e animale;
- valutazione dei problemi di sicurezza del sangue e suoi derivati in relazione al rischio TSE;
- fornisce indicazioni sulle metodiche diagnostiche in uso umano e veterinario;
- risposte ad interrogazioni parlamentari che riguardino le TSE umane o animali;
- esprime pareri su proposte di direttive comunitarie.

Tutte le pratiche che richiedono un parere sulle TSE vengono inviate con un'unica classificazione d'archivio al GESTISS che provvede tramite il proprio Coordinatore ad esprimere parere congiunto.

Piano triennale

L'attività del GESTISS è andata incrementandosi nel triennio 2006-2008 e si prevede che il flusso di pareri richiesti al GESTISS continuerà in considerazione dei problemi di sanità pubblica umana e veterinaria legati al rischio di trasmissione delle TSE nell'uomo e negli animali. Questo rischio richiede comunque ancora la valutazione dei prodotti medicinali, dispositivi medici, prodotti alimentari, sangue e derivati in relazione al rischio di trasmissione.

Il GESTISS farà quindi fronte alle richieste di valutazione di:

- Valutazione dei dossier “*Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE) compliance*” contenuti nella documentazione AIC nazionali o di mutuo riconoscimento o per autorizzazioni a livello centralizzato europeo per l'adempimento all'art. 3, comma 1, lettera b) del DM del 28 dicembre 2000 “Misure finalizzate alla minimizzazione del rischio di trasmissione all'uomo, tramite farmaci, degli agenti che causano l'encefalopatia spongiforme animale”.
- Valutazione dei rischi connessi alla trasmissione di agenti non convenzionali delle TSE umane e animali tramite farmaci su richiesta dell'AIFA o del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali. L'attività svolta riguarda soprattutto i rischi relativi ai plasmaderivati prodotti da *pool* di plasma nei quali è confluita una donazione da paziente affetto da malattia di Creutzfeldt-Jakob (MCJ).
- Certificazioni di farmaci.
- Eventuali interrogazioni parlamentari sulle TSE.
- Pareri richiesti da vari Ministeri sulle TSE.
- Pareri richiesti dalle strutture ospedaliere riguardo alle modalità di decontaminazione dei dispositivi medici.

Coordinamento di Registri di patologia: Registro nazionale dell'ipotiroidismo congenito e Registro nazionale degli assuntori dell'ormone della crescita. Attività di controllo nel settore endocrino-metabolico

L'attività di controllo afferente al Reparto riguarda fundamentalmente l'attività di sorveglianza connessa al Registro nazionale degli ipotiroidi congeniti e al Registro nazionale degli assuntori dell'ormone della crescita. Relativamente al Registro nazionale degli ipotiroidi

congeniti, 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 congenito (IC) che operano nel nostro Paese. Come previsto dal PSN e dal DPC del 9 luglio 1999 (GU n. 170 del 22 luglio 1999) il coordinamento del Registro è affidato all'ISS. In Italia la realizzazione di un programma su scala nazionale per la prevenzione delle sequele neuropsichiche dell'IC si è resa possibile grazie all'introduzione nel 1977 dello screening neonatale tiroideo di massa. Nel corso degli anni lo screening si è esteso a tutto il territorio nazionale, raggiungendo velocemente livelli eccellenti di copertura della popolazione neonatale. Dalla seconda metà degli anni '90 la totalità dei nati in Italia viene sottoposta a screening grazie all'esistenza di 26 Centri accreditati per la diagnosi precoce dell'IC, regionali o interregionali, dislocati su tutto il territorio nazionale (Legge naz. n.104 del 05/02/1992 che prevede, nell'ambito degli interventi di medicina preventiva, lo screening neonatale per l'IC). 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 il Registro. Questo infatti, 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, nonché la valutazione dell'efficienza del programma di prevenzione cui fa riferimento.

Per ciò che riguarda invece il Registro nazionale degli assuntori dell'ormone della crescita, questo è operativo in Istituto sulla base di un DM del 29 novembre 1993, (GU n. 290 dell'11 dicembre 1993). Negli anni successivi, la Commissione Unica del Farmaco (organo del Ministero della Salute) e in seguito l'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), hanno adottato note relative alla prescrizione e al controllo delle confezioni di alcuni medicinali inquadrandoli in classi di rimborsabilità. Queste disposizioni vengono periodicamente aggiornate e attualmente sono in vigore le note AIFA 2006-2007 pubblicate sul Supplemento Ordinario alla Gazzetta Ufficiale n. 7 del 10 gennaio 2007, che con la nota 39 indicano le limitazioni di prescrivibilità, i criteri diagnostici e le avvertenze alla prescrizione della terapia con ormone della crescita, e ribadiscono l'incarico all'ISS della sorveglianza epidemiologica nazionale mediante un Registro informatizzato dell'ormone della crescita. Il Registro nazionale dell'ormone della crescita rappresenta, quindi, un importante strumento di sanità pubblica, che si propone di garantire la correttezza diagnostica e l'appropriatezza d'uso dell'ormone, attraverso le segnalazioni provenienti dai Centri, accreditati dalle Regioni e dalle Province autonome per la diagnosi del deficit di GH e per la prescrizione della terapia sostitutiva con ormone della crescita. L'attività del Registro nazionale degli assuntori dell'ormone della crescita è, quindi, indirizzata a realizzare e gestire la piattaforma comune cui hanno accesso le gestioni locali, ad effettuare il coordinamento nazionale di tali procedure attraverso lo strumento del Registro nazionale, e offrire la propria sede come punto di incontro, a cadenze regolari, delle realtà cliniche e amministrative coinvolte in tale progetto.

Piano triennale

Nell'ambito della programmazione triennale 2009-2011 le attività di controllo relative al coordinamento del Registro nazionale degli ipotiroidici congeniti riguarderanno la sorveglianza della patologia sull'intero territorio nazionale con particolare attenzione all'analisi delle fluttuazioni spazio-temporali dell'incidenza della patologia. In particolare, verranno verificati eventuali incrementi di incidenza su scala nazionale, tenendo tuttavia in considerazione il miglioramento delle capacità diagnostiche ottenuto negli ultimi anni grazie all'avanzamento tecnologico dei sistemi di dosaggio del TSH neonatale (riduzione dei valori di *cut off*), quale test primario per lo screening dell'ipotiroidismo congenito. Verrà inoltre valutata l'efficienza

delle procedure di screening su tutto il territorio nazionale, al fine di verificare eventuali differenze geografiche in termini di organizzazione e funzionamento, e l'efficacia delle azioni di prevenzione intraprese e delle scelte sanitarie effettuate per la prevenzione delle sequele neurocognitive della patologia. Verranno inoltre promossi studi collaborativi di tipo eziologico che possano originare dall'attività del Registro, sia per ciò che riguarda la ricerca epidemiologica che la ricerca di base. 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.

Per ciò che riguarda le attività del Registro nazionale degli assuntori dell'ormone della crescita, nel prossimo triennio queste saranno indirizzate all'attivazione della scheda di segnalazione compilabile in ambiente web, attraverso una prima fase di sperimentazione e al successivo progressivo inserimento, mediante procedure di accreditamento, dei centri autorizzati dalle Regioni alla prescrizione di farmaci contenenti ormone somatotropo. Sarà anche disponibile un manuale d'uso scaricabile dal sito web del Registro. Saranno effettuati incontri tecnico-scientifici periodici finalizzati a supportare le attività legate al Registro nazionale e all'attuazione della nota 39 dell'AIFA, e convegni annuali sui temi delle attività del Registro nazionale e delle attività regionali correlate e su tematiche relative alla terapia con ormone somatotropo.

Sul sito web del Registro (<http://www.iss.it/rnoc/>) saranno riportati gli aggiornamenti sulle attività, in particolare riguardo gli appuntamenti, riunioni e convegno annuale, e le segnalazioni, sotto forma di dati aggregati a livello nazionale e disaggregati per Regione.

Procedure e criteri per l'autorizzazione alla sperimentazione clinica di prodotti per terapia genica e per terapia cellulare

– 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.

– Attività internazionali

Collaborazioni con l'EMA per una armonizzazione europea (ed eventualmente internazionale nella *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, 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.

Piano triennale

Grazie alla sua esperienza e competenza scientifica in materia di terapia genica e cellulare, 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 (ATMP) definiti del Regolamento 1394/2007/EC entrato in vigore dal 31 dicembre 2008. Tale

attività viene esplicata attraverso l'analisi scientifica degli *Investigational Medicinal Product Dossier* (IMPD) presentati per l'autorizzazione alla sperimentazione clinica e attraverso attività regolatoria sia nazionale sia internazionale. Infatti, due membri del Reparto sono stati nominati dall'AIFA come unici rappresentanti italiani (*member* e *alternate member*) presso il Comitato europeo per le Terapie Avanzate (CAT) presso l'EMA a Londra, che autorizza alla immissione in commercio i prodotti definiti dal Regolamento 1394/2007/EC. Le stesse persone sono da anni coinvolte, anche, come unici rappresentanti italiani, nei gruppi di lavoro EMA per la terapia genica (GTWP) e per la terapia cellulare (CPWP), nonché nei gruppi similari presso la Farmacopea Europea (EDQM).

Data la periodicità delle riunioni dei gruppi europei a cui si riferiscono queste nomine, la conseguente attività di armonizzazione e di produzione di linee guida, regolamenti interni, e di analisi scientifica dei prodotti medicinali sperimentali per terapie avanzate originati in Italia assorbirà una frazione maggioritaria delle disponibilità del Reparto stesso nel corso dei prossimi tre anni.

Una delle due persone coinvolte con le attività suddette è anche ispettore senior per il sistema GMP delle officine farmaceutiche, in cui esegue regolarmente ispezioni anche riguardanti la fabbricazione di medicinali sperimentali per terapie avanzate.

Le stesse persone insieme ad altri colleghi sia del Reparto sia di altri Dipartimenti dell'ISS effettuano un intenso programma di formazione dei ricercatori clinici e dei direttori tecnici impegnati sia nella sperimentazione sia nella produzione dei medicinali per terapie avanzate, mediante corsi specifici tenuti presso l'ISS. Nel triennio in oggetto questa attività potrà essere effettuata anche a livello EMA, dove si avverte sempre di più la necessità di armonizzare le autorità competenti nazionali nelle attività non centralizzate come l'autorizzazione delle sperimentazioni cliniche.

La ricaduta di queste intense attività non è solo in campo regolatorio, dove permette all'ISS di giocare un ruolo centrale in Europa con conseguente capacità ad intervenire se richiesto dal sistema regolatorio europeo; esse permettono anche di mantenere lo stato delle terapie avanzate in Italia aggiornato al massimo livello disponibile in Europa, contribuendo a sostenere la ricerca italiana che in questo campo è all'avanguardia (la sperimentazione clinica su SCID-ADA effettuata dal San Raffaele è tra le poche nel mondo con risultati clinici positivi e senza per ora nessun evento avverso grave come l'insorgenza di leucemie, che invece è avvenuta nelle sperimentazioni francese e inglese su X-SCID; la ricerca sui vettori lentivirali sempre del San Raffaele è riconosciuta di valore mondiale; nel campo dell'ingegneria dei tessuti, il Prof. Cancedda a Genova è uno dei pionieri della ricostruzione dell'osso con ingegneria tissutale).

Inoltre, il Reparto di Terapia genica e cellulare ha un ruolo di coordinamento, attraverso i suoi membri, per la formazione dei network italiani delle officine farmaceutiche per la produzione in GMP di prodotti medicinali per terapie avanzate e nella creazione di una rete delle biobanche di ricerca italiane da affiancare alla rete europea. Tali attività si esplicano in funzioni di coordinamento e formazione per il personale delle strutture GMP, che continuerà nel triennio in oggetto. Per quanto riguarda la Rete italiana delle BioBanche Oncologiche RIBBO, entro il 2009 verrà formalizzato il network mediante un sistema di procedure operative standard che includano la raccolta di campioni in modo standardizzato, la loro registrazione e la formazione di un database centralizzato. Contemporaneamente verrà identificata una forma legale associativa per la formazione di una rete di biobanche non solo oncologiche.

Infine, uno dei membri del Reparto fa parte da molti anni della Commissione per la Farmacopea Ufficiale Italiana, nell'ambito della quale svolge attività relativa a linee guida e monografie.

- Proiezione delle attività istituzionali nel triennio 2009-2011

- *Attività istituzionali come partecipazione a Comitati*
 - Partecipazione alla commissione per l'autorizzazione della sperimentazione di Fase I come membro e come esperti (riunioni mensili)
 - Partecipazione alla Sottocommissione AIFA sulla sperimentazione clinica di Fase II-III come membro ed esperti (riunioni mensili)
 - Partecipazione al Comitato per le Terapie Avanzate (CAT) dell'EMEA come membro effettivo e sostituto (riunioni mensili)
 - Partecipazione alle attività sulla terapia genica e cellulare della Farmacopea Europea (riunioni trimestrali)
 - Partecipazione alle attività della Farmacopea Ufficiale Italiana (riunioni semestrali).
- *Attività istituzionali come partecipazione a ispezioni*
 - Ispezioni GMP a officine produttrici di medicinali e materie prime farmacologicamente attive, anche sperimentali per terapie avanzate (periodicità bi-trimestrale).
- *Attività istituzionali come formazione (corsi residenziali)*
 - Corsi di base e avanzati di formazione dei ricercatori clinici e dei direttori tecnici impegnati sia nella sperimentazione sia nella produzione dei medicinali per terapia genica e cellulare (periodicità bi-trimestrale).

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 Servizio Qualità e Sicurezza della 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 (EU, OCSE, WHO, *International Brain Research Organization – IBRO, National Institutes of Health – 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.

Piano triennale

Nel triennio 2009-2011, il Reparto continuerà a prestare la propria *expertise* per ottemperare all'attività di valutazione delle richieste di autorizzazione in deroga alla sperimentazione

animale. In particolare, 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, attraverso un approccio multidisciplinare integrato; ii) 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) utilizzazione di modelli transgenici di patologie neuropsichiatriche o neurodegenerative con riferimento al quadro delle 3R, considerando la possibilità di adottare procedure mirate soprattutto al *Refinement*, anche in accordo con la revisione della Direttiva Europea 86/09; iv) incentivare lo scambio di informazioni e spunti sia teorici sia metodologici fra tre contesti principali, ovvero: animali da laboratorio, da reddito e da compagnia, attingendo all'esperienza etologica; v) 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

Amplificazione *ex vivo* e trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSC) originate da sangue di cordone ombelicale

Attualmente il sangue di cordone (CB) è considerata la miglior scelta nel trapianto dopo il midollo compatibile; infatti la sua grande immuno-plasticità, permettendo un minore HLA *matching*, consente di rispondere alla richiesta di trapianto quando non ci sono donatori compatibili e rappresenta la scelta di elezione in particolari situazioni cliniche come, ad esempio, nei bambini con leucemia. Tuttavia il trapianto di CB contiene dieci volte meno cellule staminali ematopoietiche (HSC) rispetto al midollo osseo (BM), presentando una maggior incidenza di insuccesso e un ritardato attecchimento. Piastrine e neutrofili sono le componenti cellulari più ritardate.

Il progetto si propone, utilizzando modelli murini NOD/SCID, di migliorare l'attecchimento delle HSC derivate da CB, trapiantandole insieme a cellule mesenchimali staminali (MSC), derivate anch'esse da CB, o dopo espansione *in vitro*. Per studiare l'effetto del cotrapianto, i topi saranno irradiati subletalmente e trapiantati con CB-CD34+ con o senza CB-MSC, utilizzando i protocolli già in uso nel nostro laboratorio. Per l'amplificazione delle HSC si utilizzerà una coltura primaria di MSC come supporto nutritivo in un sistema di co-cultura potenzialmente applicabile in clinica. Per indirizzare lo studio all'aspetto, particolarmente critico, della trombocitopenia prolungata dopo trapianto sarà migliorato il sistema di cultura dei progenitori megacariocitari, utilizzando anche inibitori delle deacetilasi istoniche.

Risultati attesi nel triennio

Il co-trapianto delle cellule CB-CD34+ e CB-MSC dovrebbe aumentare l'attecchimento delle cellule ematopoietiche con conseguente accelerato recupero nel sangue periferico murino; in particolare, è atteso un accorciamento dei tempi di recupero dei neutrofili e delle piastrine, rispetto al controllo.

Il sistema di co-cultura CD34+/MSC dovrebbe migliorare, rispetto a colture di controllo, la capacità di espansione delle cellule CD34+, dare origine a un maggior numero di *long-term-culture-initiating cells* e aumentare il potenziale proliferativo delle cellule capaci di formare colonie. Il trapianto delle HSC amplificate dovrebbe permettere un attecchimento e un recupero di tutte le componenti ematologiche superiori rispetto al controllo.

L'utilizzo di acido valproico permetterà di espandere la componente più precoce dei progenitori megacariocitari che, trapiantata nel modello murino, dovrebbe consentire un massiccio recupero di piastrine nel sangue periferico murino già dopo due settimane dal trapianto.

Più in generale, questo studio dovrebbe portare alla comprensione di alcuni meccanismi di regolazione del *self-renewal* delle HSC, cioè della loro capacità di dividersi senza perdere il potenziale staminale.

Trasferibilità dei risultati

La capacità di espandere *ex vivo* il numero delle HSC presenti nel CB da trapiantare dovrebbe migliorare la percentuale di attecchimento e accorciare il tempo di recupero delle piastrine e dei neutrofili nei pazienti trapiantati, che attualmente rappresentano i due aspetti più critici di questo tipo di trapianto.

Angiopietine-Tie-2: ruolo nella megacariopoiesi

Il sistema ligando-recettore angiopietina (Ang)-Tie-2 regola l'integrità vascolare modulando l'angiogenesi in condizioni fisiologiche, ma anche in patologie quali disordini infiammatori e cancro. L'Ang-1 e l'Ang-2, i ligandi meglio caratterizzati di Tie-2 competono

per lo stesso sito del dominio extracellulare del recettore. Lo stato funzionale dei vasi sanguigni sarebbe determinato dall'equilibrio tra le quantità dell'Ang-1 e dell'Ang-2.

Studi recenti mostrano che Tie-2 è coinvolto nella regolazione dell'ematopoiesi: Ang-1 promuove la sopravvivenza e mantiene la quiescenza delle cellule staminali ematopoietiche Tie-2+; cellule ematopoietiche differenziate quali sottopopolazioni di monociti e granulociti esprimono Tie-2. Inoltre, la significativa espressione di Tie-2 nei megacariociti (MK) sia immaturi che differenziati suggerisce un suo ruolo chiave anche nella megacariopoiesi. La conoscenza di tale ruolo nel differenziamento degli MK può costituire una risorsa importante per modulare la produzione di MK e piastrine anche in condizioni patologiche. Pertanto, ci proponiamo di analizzare l'effetto dell'attivazione e dell'inibizione specifica del Tie-2 sui progenitori MK. Inoltre, con l'intento di identificare molecole bersaglio di Tie-2 coinvolte nella megacariopoiesi, analizzeremo i segnali innescati dalla sua attivazione.

Risultati attesi nel triennio

Al fine di studiare il ruolo del Tie-2 nella megacariopoiesi, saranno allestite colture di progenitori ematopoietici CD34+ in condizioni che permettono la crescita/differenziazione selettiva di MK (*unilineage*). Le popolazioni di MK a diversi stadi di differenziamento e maturazione saranno successivamente analizzate per identificare le molecole attivate dal *signalling* Ang-Tie-2 e che sono coinvolte nei diversi stadi del differenziamento degli MK.

Inoltre verrà valutata l'eventuale produzione endogena di Ang a diversi stadi di sviluppo MK. Infatti, dati preliminari mostrano elevate quantità di Ang-1 e -2 in coltura, suggerendo un effetto autocrino delle angiopoietine sugli MK.

Con lo scopo di stimolare o inibire specificamente il Tie-2 o i suoi ligandi, i progenitori MK verranno: i) trattati con anticorpi bloccanti specifici per il Tie-2 o con recettori solubili bloccanti specifici per le angiopoietine endogene; ii) trasdotti con *small interfering* RNA che inibiscono specificamente l'espressione del Tie-2, dell'Ang-1 o dell'Ang-2; iii) trattati con farmaci antiangiogenici che bloccano Ang-2 o Tie-2.

Sulla popolazione di MK ottenuta in queste condizioni verrà valutata la proliferazione, il differenziamento la poliploidizzazione MK e la produzione di piastrine.

Sulla base dei risultati ottenuti in altri sistemi sperimentali, ci aspettiamo che il Tie-2 promuova la proliferazione e la poliploidizzazione MK attivando i *pathway* delle MAP chinasi e della PI3 chinasi.

Trasferibilità dei risultati

Diversi farmaci antitumorali già in commercio o in corso di sperimentazione riducono l'angiogenesi tumorale inibendo il *signaling* Ang-Tie-2. La comprensione del ruolo svolto dalle angiopoietine e dal Tie-2 è cruciale per evitare eventuali effetti collaterali dei farmaci antiangiogenici. In particolare, l'analisi del ruolo svolto dalle Ang-1 e-2 e dal Tie-2 nella megacariopoiesi potrebbe spiegare lo sviluppo di trombocitopenia in pazienti affetti da cancro e trattati con farmaci antiangiogenici e potrebbe indicare nuove strategie terapeutiche per prevenire la deplezione di piastrine nei tumori.

Aspetti molecolari e cellulari della progressione tumorale nei tumori solidi

Il melanoma cutaneo rappresenta una forma tumorale molto aggressiva con un alto rischio di disseminazione metastatica per la quale, a tutt'oggi, l'unico approccio terapeutico valido è rappresentato dalla prevenzione e dall'escissione chirurgica nelle fasi precoci della malattia.

L'evidenza che i microRNA possano funzionare come oncogeni o *tumor suppressor gene* ha generato enormi aspettative sul loro possibile utilizzo come marcatori diagnostici e/o prognostici nonché come agenti terapeutici, particolarmente importanti nel caso di patologie per le quali non esistono terapie soddisfacenti.

Successivamente alla dimostrazione del ruolo tumorigenico dei miR-221 e -222 nel *lineage* melanocitico, sono in corso: i) studi sulla regolazione trascrizionale di questi miR e sui *pathway* regolati dai miR-221/-222 e specificamente coinvolti nella progressione del tumore. Lo studio sarà inoltre esteso ad altri miR potenzialmente rilevanti sulla base dell'analisi mediante *array*. ii) I nostri studi proseguiranno attraverso lo studio di appropriati modelli di tumorigenesi *in vitro* e *in vivo*. iii) Inoltre sarà valutato il ruolo degli esosomi, microvescicole rilasciate dalle cellule nell'ambiente extracellulare, nella progressione tumorale. Dati preliminari hanno dimostrato la capacità degli esosomi di trasferimento genico orizzontale. Lo studio dei profili dei miR anche in queste piccole vescicole servirà a chiarire il loro ruolo funzionale. iv) Infine sulla base dell'espressione muscolo-specifica dei miR-133, -1 e -145 in tessuti umani e murini, già caratterizzati nell'ipertrofia cardiaca, estenderemo i nostri studi alle patologie del muscolo-scheletrico nell'ambito di una collaborazione con l'Istituto Rizzoli di Bologna.

Risultati attesi nel triennio

Questi progetti permetteranno di approfondire il ruolo funzionale dei miR-221/-222 attraverso l'identificazione dei principali target e delle vie di trasduzione del segnale coinvolte nell'insorgenza/progressione tumorale. I risultati e gli effetti antimetastatici del trattamento con oligomeri antagomir-221 e -222 saranno valutati *in vivo* nel modello murino di topi nudi allo scopo di caratterizzare e possibilmente ripristinare la via di trasduzione del segnale a valle dei due microRNA. La caratterizzazione funzionale degli esosomi *in vitro* e *in vivo* consentirà di valutare il loro reale impatto nella progressione del tumore ed eventualmente di sfruttare le loro proprietà per utilizzarli come veicoli di molecole terapeutiche. Infine, sulla base dei profili di espressione ottenuti analizzando la banca di campioni disponibile presso l'Istituto Rizzoli di Bologna, valuteremo i microRNA funzionalmente rilevanti nell'insorgenza e nella progressione dei tumori muscolo-scheletrici.

Trasferibilità dei risultati

La prospettiva di un utilizzo terapeutico di molecole antisense di tipo "antagomir" è quindi aperta, come già indicato dai nostri studi *in vivo* sul ruolo del miR-133 nell'ipertrofia cardiaca. La valutazione dell'espressione e della funzione di molecole, inclusi i microRNA, comprese nel *pathway* a valle dei miR-221 e -222 auspicabilmente permetterà di individuare quelle con un più significativo valore diagnostico e/o prognostico. La purificazione di esosomi rilasciati nell'ambiente extracellulare, incluso il siero dei pazienti, consentirà il loro utilizzo come fonte di *biomarker* diagnostici. Infine sfruttando la loro capacità di fondere con le cellule riceventi, gli esosomi potrebbero rappresentare degli efficaci veicoli di molecole terapeutiche.

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 comportamentali e dell'apprendimento. È una delle più frequenti condizioni sindromiche associate a difetti cardiaci congeniti. Negli ultimi anni abbiamo scoperto che mutazioni nei geni PTPN11, KRAS, SOS1, RAF1 e BRAF si riscontrano nel 65% degli individui affetti. Tali geni codificano per proteine implicate nella via di trasduzione RAS/MAPK e le mutazioni identificate promuovono l'iperattivazione della via.

Gli obiettivi dell'attività di 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 della malattia. Saranno intrapresi studi di *linkage* su famiglie informative per l'identificazione di nuovi *loci* associati alla malattia che saranno successivamente analizzati attraverso metodologie di screening molecolare. L'uso di un secondo approccio sperimentale basato sull'analisi *in silico* dell'interattoma delle proteine che svolgono un ruolo chiave nella

via RAS/MAPK permetterà l'identificazione di geni candidati che saranno analizzati attraverso *high-throughput resequencing*. 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 e modelli murini *knock-in*).

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.

Basi molecolari e archivio biologico dell'ipotiroidismo congenito primario

L'ipotiroidismo congenito (IC) primario è, insieme al diabete mellito, la più frequente patologia endocrino-metabolica dell'infanzia. Nella maggior parte dei casi (80-85%) l'IC è causato da un'alterata organogenesi della tiroide (disgenesia tiroidea, DT). Studi recenti hanno dimostrato che alcune forme di DT sono dovute alla presenza di mutazioni in geni coinvolti nell'organogenesi della ghiandola. Tuttavia, l'alta frequenza di casi sporadici e diverse evidenze sperimentali fanno ipotizzare una base poligenica per la DT. Nel rimanente 15-20% dei casi, l'IC primario è diretta conseguenza di alterazioni della via biosintetica degli ormoni tiroidei (disormonogenesi).

Nonostante i numerosi studi condotti negli ultimi anni, si è ancora lontani dal chiarire le basi molecolari della DT. La ragione di questa difficoltà risiede principalmente nell'impossibilità di disporre di famiglie informative su cui effettuare studi di *linkage*. Utilizzando un approccio basato sull'analisi di "geni candidati", selezionati sulla base del loro ruolo nell'organogenesi e nella maturazione funzionale della ghiandola tiroidea, il progetto si prefigge di individuare nuovi geni coinvolti nell'eziopatogenesi della DT. Infine, si intende ampliare l'archivio biologico (banca del DNA) riferito alla popolazione di soggetti affetti da IC su territorio nazionale, affiancato alla banca dati afferente al Registro nazionale degli ipotiroidi congeniti, coordinato dall'ISS.

Risultati attesi nel triennio

- Identificazione di nuovi geni-malattia per l'IC primario.
- Ampliamento dell'archivio biologico per l'IC, tramite il campionamento dei casi già arruolati nel Registro nazionale degli ipotiroidi congeniti, dei nuovi casi rilevati sul territorio nazionale e dei relativi genitori.

Trasferibilità dei risultati

Progresso nella comprensione degli eventi molecolari alla base dell'IC primario. L'archivio biologico (banca del DNA per l'IC) rappresenterà un importante strumento per studi futuri finalizzati alla caratterizzazione genetico-molecolare dell'IC. I risultati prodotti saranno oggetto di pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali.

Caratterizzazione funzionale delle mutazioni di PTPN11 responsabili di malattie dello sviluppo e coinvolte nella leucemogenesi.

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 forte riduzione della sua attività catalitica, sebbene il loro significato funzionale non sia stato ancora chiarito in modo soddisfacente.

La presente ricerca sarà volta alla comprensione dei meccanismi molecolari alla base della disregolazione funzionale di SHP2 e agli effetti delle mutazioni associate a SL 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 *Caenorhabditis 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.

Caratterizzazione molecolare di cellule staminali tumorali ed ematopoietiche

Le attività previste per il prossimo triennio sono incentrate sullo studio delle cellule staminali derivate da tumori del colon, del polmone e della mammella. Alle ricerche sulle cellule staminali tumorali saranno inoltre affiancati studi su progenitori ematopoietici normali e derivati da pazienti con policitemia vera (PV).

Gli studi sulle cellule staminali tumorali saranno finalizzati al raggiungimento dei seguenti obiettivi:

- Identificazione di sottopopolazioni di cellule staminali tumorali dotate di diverse capacità di autorinnovamento e tumorigenesi.
- Sperimentazione preclinica di nuovi farmaci sulle cellule staminali derivate da tumori del colon, del polmone e della mammella, con particolare riferimento a sostanze in grado di interferire col normale svolgimento del ciclo cellulare e ad inibitori dei meccanismi di sopravvivenza.
- Caratterizzazione delle *pathway* di apoptosi attivati nelle cellule staminali tumorali in risposta a stimoli differenti.
- Studio della risposta delle cellule staminali tumorali a citochine ematopoietiche con uso consolidato o potenziale nella terapia di supporto a pazienti oncologici (Eritropoietina e *Stem Cell Factor*).

Le ricerche sull'ematopoiesi si svolgeranno secondo il piano seguente:

- Produzione di profili di fosfoproteomica da precursori ematopoietici di pazienti PV. I risultati saranno messi in relazione con lo stato mutazionale del gene JAK2 e con le caratteristiche cliniche dei pazienti.
- Studio delle *pathway* apoptotiche in cellule staminali/progenitrici ematopoietiche CD34+ isolate da donatori sani.

Risultati attesi nel triennio

Gli studi pianificati per il prossimo triennio sono strutturati in modo da produrre i risultati seguenti:

- Isolamento di sottopopolazioni di cellule staminali tumorali dotate di diverse capacità di autorinnovamento e tumorigenesi.
- Validazione di nuovi farmaci attivi sulla popolazione di cellule staminali tumorali.
- Definizione delle *pathway* apoptotiche attive nelle cellule staminali tumorali.
- Verifica della potenziale attività oncogenica delle citochine ematopoietiche Eritropoietina e *Stem Cell Factor* attraverso la rilevazione del loro effetto funzionale e molecolare sul compartimento staminale dei tumori del colon, del polmone e della mammella.
- Delucidazione dei meccanismi molecolari attivi nei progenitori ematopoietici PV e definizione della correlazione fra profilo molecolare, mutazionale e clinico dei pazienti.
- Produzione di nuovi protocolli per la crioconservazione delle cellule staminali/progenitrici ematopoietiche.

Trasferibilità dei risultati

Le ricerche previste dal presente progetto prevedono la realizzazione di nuovi strumenti applicativi e conoscitivi nel campo oncologico attraverso la valutazione di strategie terapeutiche innovative e l'analisi approfondita dei meccanismi molecolari e funzionali attivi nel compartimento staminale. Pertanto, gli studi descritti produrrebbero benefici immediatamente trasferibili alla sfera clinica con fondamentali vantaggi di natura medica ed economica per il servizio sanitario nazionale.

Cross-talk fra i recettori di fattori di crescita emopoietici e recettori di fattori di crescita angiopoietici in cellule ematopoietiche

Studi recenti condotti nel nostro laboratorio hanno mostrato che vari tipi di cellule emopoietiche coesprimono recettori di fattori di crescita emopoietici (ad es., IL-3R, GM-CSFR, c-kit, TpoR) e recettori di fattori di crescita angiopoietici (VEGF-R1, VEGF-R2, Tie-2). Utilizzando poi la linea cellulare TF1 overesprimente il VEGF-R2 è stato possibile dimostrare, tramite esperimenti di fosforilazione recettoriale e localizzazione in domini della membrana cellulare, l'esistenza di un *cross-talk* fra i recettori del GM-CSF e del VEGF-R2. Nel presente progetto di ricerca vogliamo valutare se questo fenomeno di *cross-talk* recettoriale possa essere un fenomeno più generale, riscontrato anche per altri tipi di recettori ed a livello di differenti tipi cellulari. In tal senso proponiamo di studiare l'esistenza di un *cross-talk*: i) fra i recettori del Tpo (trombopoietina) e dell'angiopoietina Tie-2 in cellule megacariocitarie; ii) fra i recettori del kit ligando, c-kit, e del VEGF-R2 in cellule leucemiche. L'esistenza di fenomeni di *cross-talk* recettoriale verrà valutata tramite una serie di esperimenti di: localizzazione a livello di domini della membrana cellulare; fosforilazione recettoriale; analisi delle vie di trasduzione del segnale; studio degli effetti biologici dei due ligandi recettoriali aggiunti da soli o in combinazione (alla ricerca di effetti additivi o sinergici); analisi dell'espressione a livello della membrana dei due recettori e della loro internalizzazione in seguito a stimolazione con i rispettivi ligandi.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio delle possibili interazioni fra TpoR e Tie-2 verrà realizzato in due diversi modelli cellulari: megacariociti umani normali ottenuti tramite differenziamento *in vitro* di cellule CD34+ di sangue di cordone o di sangue periferico adulto e le linee cellulari Meg-1 e TF1 ingegnerizzate ad esprimere il recettore Tie-2. Per lo studio del *cross-talk* fra il c-kit e il VEGF-R2 verranno utilizzati due modelli cellulari: cellule TF1 ingegnerizzate ad overesprimere il VEGF-R2 e cellule monocitarie leucemiche derivate da LAM FABM4 o M5. La localizzazione dei recettori a livello di domini della membrana cellulare verrà valutata tramite analisi del profilo di sedimentazione su gradiente di saccarosio dopo solubilizzazione in Triton X100. La formazione di possibili complessi recettoriali sarà valutata tramite esperimenti d'immunoprecipitazione e *Western blot*. Gli effetti sull'attivazione della trasduzione del segnale saranno studiati tramite analisi biochimica dello stato di fosforilazione dei vari costituenti delle vie di trasduzione attivate dai recettori studiati (PI3K, AKT, ERK, p38, STAT-3, STAT-5). L'effetto dei vari ligandi sull'espressione ed internalizzazione dei vari recettori sarà valutata tramite citofluorimetria a flusso utilizzando anticorpi specifici. Gli effetti biologici dell'aggiunta dei vari ligandi aggiunti da soli o in combinazione saranno studiati in maniera diversa a seconda dei sistemi biologici utilizzati.

Trasferibilità dei risultati

I risultati originati dalle ricerche del presente progetto di ricerca potrebbero avere delle importanti implicazioni per le nostre conoscenze di base sui meccanismi che governano gli effetti dei fattori angiopoietici sulle cellule emopoietiche. Inoltre, I risultati da noi ottenuti potrebbero avere delle implicazioni per lo sviluppo di trattamenti innovative delle leucemie acute mieloidi basati sull'utilizzo di inibitori dei fattori angiopoietici.

Disregolazione del *signalling* di RAS e difetti cognitivi

Le disabilità intellettive colpiscono circa il 3% della popolazione e rappresentano una caratteristica piuttosto frequente di alcuni disordini dello sviluppo. Recentemente è stato dimostrato il ruolo chiave svolto dalle proteine della via di trasduzione del segnale mediata da RAS nello sviluppo del sistema nervoso e nel controllo di processi cognitivi quali la memoria e l'apprendimento. In accordo con queste scoperte, abbiamo recentemente dimostrato che la disregolazione di questa via di trasduzione del segnale è alla base della patogenesi di un gruppo di malattie dello sviluppo appartenenti alla famiglia delle sindromi neurocardiofaciocutanee (SNCFC), caratterizzate dalla presenza di un ampio spettro di disturbi cognitivi.

Sulla base di queste evidenze, il progetto si propone di esplorare le conseguenze molecolari e cellulari della disregolazione del *signalling* di RAS causative della disfunzionalità neuronale caratterizzante le SNCFC. In particolare ci si prefigge di caratterizzare il ruolo di un pannello di proteine mutanti (SHP2, KRAS, BRAF e RAF1) sulla sopravvivenza e sul differenziamento neuronale, e sulla plasticità sinaptica. Tali studi saranno condotti in vivo sul modello animale *Caenorhabditis elegans* e *in vitro* su colture primarie di cellule neuronali di ippocampo di roditore.

Risultati attesi nel triennio

L'attività di ricerca permetterà di delineare le conseguenze della disregolazione funzionale di un pannello di mutanti delle proteine SHP2, KRAS, BRAF e RAF1 causativi delle SNCFC nello sviluppo neuronale e nella plasticità sinaptica.

Trasferibilità dei risultati

Le conoscenze acquisite sugli effetti della disregolazione funzionale dei diversi mutanti sullo sviluppo neuronale e sulla plasticità sinaptica costituiranno il presupposto per lo sviluppo di

nuovi approcci terapeutici mirati al miglioramento delle abilità cognitive associate alle sindromi NCFC.

Disregolazione funzionale della via di trasduzione del segnale mediata dalle proteine JAK nella leucemogenesi

La trasduzione del segnale ha un ruolo cruciale nel controllo del comportamento proliferativo, differenziativo e metabolico della cellula. Alterazioni di tale network di controllo contribuiscono alla trasformazione neoplastica. I recenti progressi nella caratterizzazione degli eventi di disregolazione delle vie di trasduzione, come eventi molecolari causali nell'oncogenesi, hanno fornito nuovi strumenti per una corretta diagnosi e aperto nuove vie per il trattamento mirato delle neoplasie attraverso lo sviluppo di strategie terapeutiche dirette contro gli eventi molecolari responsabili. Recentemente abbiamo dimostrato il coinvolgimento di mutazioni attivanti di JAK1 nella patogenesi delle leucemie linfoblastiche acute.

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. 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.

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.

Esosomi quali veicoli di tumorigenicità in sistemi di melanoma e ruolo della caveolina-1 esosomes associata

La proteina caveolina-1 (cav-1) è la maggiore componente della caveola, un organello di plasmamembrana implicato in molti processi biologici in cellule normali e tumorali. In quest'ultimo ambito numerosi studi hanno dimostrato un ruolo soppressore della cav-1 nella trasformazione tumorale. Al contrario studi su carcinoma intestinale e prostatico hanno evidenziato una correlazione positiva tra aumento dell'espressione della cav-1 e potenziale invasivo e metastatico del tumore, portando a identificare nella cav-1 un *marker* prognostico della malattia. È stato altresì dimostrato che la cav-1 è secreta da cellule pancreatiche attraverso vescicole secretorie del diametro di 50-100 nm (prostasomi). In siero di pazienti con cancro della prostata sono stati rilevati quantitativi di cav-1 in relazione allo stadio della malattia, ma non è stato studiato se la cav-1 sia secreta da cellule cancerose attraverso compartimenti vescicolari, e se una diversa localizzazione della cav-1 ne comporti una sua diversa struttura e di conseguenza una diversa funzione. Pertanto lo studio della cav-1 secreta potrebbe svelare un nuovo meccanismo molecolare alla base della trasformazione cellulare.

È noto che le cellule tumorali secernono nell'ambiente extracellulare vescicole secretorie di natura endo/lisosomiale -esosomi in misura della malignità cellulare. Sono ad oggi scarsi studi su esosomi secreti da melanoma, e sono assenti studi sui meccanismi molecolari alla base del trasferimento di proteine e informazioni genetiche tra esosomi e cellule bersaglio.

Risultati attesi nel triennio

Verrà determinata l'espressione della cav-1 in esosomi secreti da melanomi a diverso grado di malignità. Il ruolo oncogenico della cav-1 esosoma/associata verrà valutato *in vitro* con saggi di migrazione e invasione. Ci aspettiamo che esosomi con elevata espressione di cav-1 inducano un aumento della capacità migratoria e invasiva di cellule normali/tumorali prive di cav-1.

Verrà quindi studiato il meccanismo molecolare di trasferimento degli esosomi a cellule bersaglio. Una nostra preliminare analisi fosfolipidica di esosomi ha indicato una prevalenza di fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina, fosfolipidi con nota attività fusogena. Allestiremo saggi di fusione con la sonda fluorescente R18 (intercalante il doppio strato fosfolipidico) con cui verrà valutata la capacità fusogena degli esosomi a diverso grado di espressione di cav-1. Ci aspettiamo una relazione diretta tra grado di espressione di cav-1/fusogenicità/malignità. Quindi grazie all'uso di un'altra sonda fluorescente veicolata all'interno dell'esosoma (*carboxylfluoresceine diacetate succinimidyl-ester*, CFSE) sarà possibile osservare il traffico intracellulare degli esosomi e paragonarlo al grado di fusogenicità.

Infine verrà analizzata la presenza di materiale genetico all'interno degli esosomi mediante procedure di isolamento selettivo di RNA totale seguito da *real time* PCR con *primer* specifici per miRNA, in particolare miRNA 221/222, già descritto avere un ruolo nella progressione tumorale del melanoma.

Trasferibilità dei risultati

Una volta stabilito il ruolo oncogenico della cav-1 esosoma/associata in linee di melanoma umano ci riproponiamo di trasferire lo stesso studio su siero di pazienti di melanoma e altre neoplasie. Quindi verificheremo anche in questo caso i meccanismi di trasferimento utilizzati dagli esosomi per veicolare lipidi, proteine, RNA codificante e regolatorio a cellule bersaglio, modificandone le funzioni biologiche. Un programma più a lungo termine prevede una caratterizzazione proteica e lipidica degli esosomi con l'obiettivo di identificare un *pattern* molecolare specifico della patologia della cellula di provenienza.

Geni codificanti proteine e microRNA nel differenziamento ematopoietico umano

I microRNA (miRNA) sono una classe di piccole molecole di RNA di 22-25 nucleotidi che giocano un ruolo chiave nella regolazione dell'espressione genica a livello post-trascrizionale. Questo controllo viene effettuato tramite il legame a sequenze target complementari presenti nei 3'UTR degli mRNA provocando degradazione o repressione traduzionale dell'mRNA.

Molteplici evidenze indicano che i microRNA giocano un ruolo importante nell'ematopoiesi, infatti svariati microRNA sono differenzialmente e specificamente espressi durante l'ematopoiesi. Al fine di analizzare il loro ruolo durante il differenziamento ematopoietico abbiamo analizzato il profilo di espressione tramite *microarray*, sia dei geni codificanti proteine che dei microRNA in colture unilinea eritroidi, megacariocitarie, monocitarie e granulocitarie derivate da sangue di cordone ombelicale. Per l'analisi dell'espressione genica abbiamo usato la piattaforma *GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 oligonucleotide microarrays* dell'Affymetrix, mentre per i microRNA una piattaforma contiene 627 sequenze di microRNA. I dati ottenuti dai *microarray* sono stati successivamente confermati tramite *Real-Time* PCR.

Risultati attesi nel triennio

In collaborazione con il Dott. G.A. Calin (Dipartimento di *Experimental Therapeutics and Cancer Genetics, University of Texas, M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA*) stiamo facendo una analisi comparativa tra i geni codificanti proteine e microRNA significativamente e differenzialmente espressi durante l'ematopoiesi umana normale. A questo scopo i profili di espressione saranno analizzati con due diversi software Genespring e Metacore. Questo approccio bioinformatico associato all'analisi degli appaiamenti

mRNA/microRNA più significativi ci permetterà di individuare i network più importanti che controllano l'eritropoiesi. Successivamente la rilevanza di queste interazioni sarà confermata tramite: i) esperimenti di luciferasi; ii) *Western blot*, al fine di dimostrare la relazione inversa tra proteine e microRNA selezionati; iii) espressione forzata di microRNA tramite trasfezione transiente e/o vettori lentivirali; iv) inibizione delle funzioni dei microRNA tramite anti-microRNA.

Il potenziale terapeutico dello *stem cell factor* nel trattamento della β -talassemia umana

Nella β -talassemia umana lo sbilanciamento tra le catene globiniche alfa e non alfa, responsabile dell'eritropoiesi inefficace e dell'emolisi, diminuisce in presenza di alti livelli di sintesi di emoglobina fetale (HbF) migliorando la gravità della malattia. L'agente terapeutico ideale dovrebbe possedere, contemporaneamente, la capacità di aumentare i livelli di emoglobina e quella di permettere la sopravvivenza degli eritroblasti. Nel progetto triennale precedente è stato dimostrato che lo *stem cell factor* (SCF) stimola fortemente *in vitro* la proliferazione cellulare riattivando la sintesi di HbF nei precursori eritroidi talassemici e che dosi farmacologiche di Desametazone (Dex) potenziano tali effetti stimolatori, aprendo così la strada a future applicazioni cliniche dell'SCF nel trattamento della β -talassemia umana.

Lo scopo principale di questo progetto è di fornire una dimostrazione per l'uso terapeutico dell'SCF nel trattamento efficace della β -talassemia umana. Esso sarà raggiunto perseguendo quattro principali obiettivi:

- caratterizzazione degli effetti antiapoptotici e proliferativi dell'SCF nell'eritropoiesi talassemica;
- ottimizzazione dell'induzione della sintesi di HbF nelle cellule eritroidi talasemiche attraverso l'SCF in associazione o meno con molecole che ne potenzino la sua attività proeritroide;
- meccanismi cellulari e molecolari indotti dall'SCF;
- validazione *in vivo* dei dati *in vitro* attraverso l'uso di modelli murini β -talassemici transgenici.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto di ricerca proposto è basato sull'approccio integrato di studi *in vitro* e *in vivo* volti ad identificare nuovi trattamenti basati sull'uso dell'SCF nello stimolare l'eritropoiesi e riattivare la sintesi di HbF nelle cellule eritroidi talasemiche. La prima parte del progetto, infatti, utilizzando sistemi di coltura unilinea eritroide, sarà dedicata a validare la risposta dei progenitori talassemici all'SCF in termini di stimolazione eritropoietica, inibizione dell'apoptosi e riattivazione dell'HbF; contemporaneamente, gli studi sull'espressione di microRNA (miR), induzione/attivazione di fattori trascrizionali nonché di geni legati al metabolismo del ferro, forniranno informazioni essenziali sui meccanismi molecolari indotti dall'SCF nella proliferazione, sopravvivenza, induzione di HbF e sovraccarico di ferro. La seconda parte del progetto si avvarrà dell'utilizzo di modelli murini talassemici e, in particolare, transgenici esprimerà la catena gamma-globinica umana per testare *in vivo* l'efficacia di terapie basate sull'uso dell'SCF. Come negli esperimenti *in vitro*, ci aspettiamo che i modelli murini rispondano al trattamento con l'SCF aumentando il numero di "F cellule"; ci aspettiamo, inoltre, che le cellule eritroidi mature, l'emoglobina, l'ematocrito, e la conta dei reticolociti possano incrementare considerevolmente in seguito a trattamento con SCF.

Trasferibilità dei risultati

Il piano di ricerca proposto potrebbe portare all'identificazione di nuovi trattamenti terapeutici per stimolare una eritropoiesi efficace e riattivare la sintesi di HbF nelle cellule

eritroidi talassemiche; in particolare, dovrà validare, a livello di studi preclinici, l'efficacia di terapie basate sull'uso dell'SCF con lo scopo di diminuire o eliminare il fabbisogno di trasfusioni migliorando così la qualità di vita nei soggetti portatori di β -talassemia intermedia o *major*. Ci aspettiamo che l'esecuzione di tale progetto abbia delle ricadute sull'SSN con particolare riguardo a: i) uno studio pre-clinico per il trattamento delle β -talassemie; ii) nuovi farmaci per l'induzione dell'HbF; iii) protocolli di *trial* clinici per le anemie indotte nelle β -emoglobinopatie; iv) identificazione di molecole coinvolte nella sopravvivenza cellulare eritroide; v) protocolli per incrementare la sopravvivenza delle cellule eritroidi in differenti condizioni patologiche.

Il recettore della transferrina 2 nei tumori solidi

Il Progetto ha come scopo di determinare l'espressione e il possibile ruolo patogenetico del cettore 2 della transferrina (TfR2) in alcuni tumori solidi: tumori del tessuto nervoso centrale e carcinoma del colon. Risultati preliminari ottenuti nel nostro laboratorio hanno mostrato che il TfR2 è frequentemente espresso in linee cellulari isolate a partire da tumori solidi (linee di glioblastoma, di carcinoma del colon). Sulla base di queste osservazioni proponiamo di effettuare uno screening: i) sull'espressione del TfR2 in tumori cerebrali di vario grado di malignità: astrocitomi e glioblastomi; ii) sull'espressione del TfR2 in carcinomi del colon di vario grado. In parallelo, verrà valutata la localizzazione del TfR2 in queste cellule tumorali a livello di sottodomini della membrana cellulare e, in particolare, a livello dei *lipid raft* e la capacità da parte del recettore attivato dalla transferrina di attivare mediatori del segnale, quali ERK e STAT3. Infine verrà valutata una possibile correlazione fra l'espressione del TfR2 e risposta al trattamento chemio-radiante *in vivo* e alla chemiosensibilità *in vitro*.

Risultati attesi nel triennio

Risultati preliminari ottenuti su una casistica limitata di pazienti hanno mostrato che il TfR2 è espresso in circa il 75% dei pazienti con tumori del sistema nervoso centrale, con un'espressione preferenziale a livello dei glioblastomi. È atteso di potere confermare queste osservazioni su una casistica più ampia di pazienti: almeno cento pazienti affetti da astrocitomi di vario grado e da glioblastomi verranno analizzati per l'espressione del TfR2. Sulla base dei risultati ottenuti in vari tipi di linee cellulari tumorali, è atteso di potere dimostrare la localizzazione del TfR2 a livello dei *lipid raft* delle cellule tumorali di glioblastoma. Tramite esperimenti di stimolazione del recettore con transferrina o con anticorpi monoclonali agonisti è atteso di potere dimostrare gli effetti a livello dell'attivazione delle vie di trasduzione del segnale, con particolare riferimento alle MAPK e a STAT. Tramite esperimenti con RNA interferente antisense è atteso di potere documentare un ruolo del TfR2 nella proliferazione/sopravvivenza delle cellule di glioblastoma. Tramite utilizzo di anticorpi monoclonali specifici (o anticorpi antagonisti recettoriali o anticorpi coniugati con tossina difterica) in modelli animali basati sullo xenotratpianto di cellule tumorali di glioblastoma si cercherà di dimostrare che il TfR2 è un bersaglio molecolare per lo sviluppo di terapie anti-tumorali mirate. Lo stesso tipo di studi verrà realizzato nei carcinomi del colon.

Trasferibilità dei risultati

È atteso che i risultati ottenuti nel presente studio possano avere una buona trasferibilità a livello della possibilità di sviluppare nuove strategie di trattamento dei tumori cerebrali. In particolare lo sviluppo di modelli animali consentirà di valutare il possibile ruolo del TfR2 come bersaglio molecolare per il trattamento immunoterapico dei glioblastomi. Questo potenziale trasferibilità è anche supportata dall'osservazione che il TfR2 non è espresso nel tessuto cerebrale normale, eccezion fatta per una bassa espressione a livello dei neuroni dopaminergici localizzati a livello della *substantia nigra*.

Il ruolo di Ets-1 nell'ematopoiesi

Oggetto di studio è il fattore trascrizionale Ets-1. In studi precedenti abbiamo analizzato il suo ruolo funzionale durante il differenziamento eritroide e megacariocitario normale mediante *over*-espressione dello stesso in colture eritroidi e/o megacariocitarie primarie. Abbiamo inoltre dimostrato come il differenziamento megacariocitario possa essere controllato dall'espressione dei microRNA. In particolare, mediante l'espressione forzata del miR-155, abbiamo visto come questo sia in grado di modulare il processo differenziativo attraverso la regolazione post-trascrizionale dei geni target Ets-1 e Meis1, noti essere indispensabili per la megacariocitopoiesi. Stiamo ulteriormente analizzando il ruolo del fattore trascrizionale Ets-1 durante il differenziamento del *lineage* granulocitario. In particolare mediante studi di *over*-espressione e/o di silenziamento (mediante siRNA e di un mutante dominante-negativo del fattore Ets-1) stiamo analizzando l'importanza di questo fattore anche nel lineage granulocitario.

Risultati attesi nel triennio

Studi preliminari indicano che in linee mieloidi responsive ad acido retinoico, durante il differenziamento granulocitario Ets-1 viene regolato negativamente sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale mediante inattivazione funzionale della proteina. Attraverso metodiche di silenziamento genico, ci proponiamo di analizzare il ruolo funzionale di Ets-1.

Il test dell'*extreme drug resistance* per lo sviluppo di una chemioterapia mirata del carcinoma dell'ovaio

Il carcinoma dell'ovaio è una delle neoplasie ginecologiche più frequenti, associata ad un'elevata mortalità. Ciò è dovuto al fatto che questa neoplasia, pur essendo inizialmente in genere sensibile al trattamento con un derivato del platino e con un derivato del taxolo, sviluppa dopo un lasso più o meno lungo fenomeni di chemioresistenza. Il test dell'*Extreme Drug Resistance* (EDR) è un test di crescita in agar delle cellule tumorali che consente di valutare in maniera accurata la chemioresistenza delle cellule tumorali. In condizioni basali circa il 15-20% dei carcinomi dell'ovaio presenta un'EDR al cisplatino ed il 25-30% al paclitaxolo. Da circa tre anni il nostro laboratorio è coinvolto in uno studio clinico controllato di fase III-IV mirante a valutare il ruolo del test dell'EDR nella terapia del carcinoma ovarico. Qui viene proposta la continuazione dello studio fino al raggiungimento di un reclutamento sufficiente ai fini del raggiungimento degli obiettivi prefissati dallo studio.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio clinico da noi intrapreso circa tre anni addietro prevede che tutte le pazienti affette da carcinoma ovarico arruolate vengano sottoposte al test dell'EDR, ma un gruppo di pazienti viene sottoposto a terapia standard (cisplatino+paclitaxolo), mentre l'altro gruppo viene sottoposto a terapia mirata in base ai risultati del test dell'EDR. Allo stato attuale sono state arruolate 102 pazienti, ma necessita raggiungere un arruolamento di almeno 200-250 pazienti prima che lo studio possa essere decodificato e valutato in termini di risposta al trattamento, determinato in base a vari parametri. I profili di chemioresistenza *in vitro* finora osservati hanno mostrato l'esistenza di EDR per il cisplatino in circa il 20% delle pazienti e per il paclitaxolo in circa il 35% delle pazienti.

Trasferibilità dei risultati

La trasferibilità di questo studio è ovvia e non necessita di commenti. Vale la pena di sottolineare che lo studio, ove non dovesse dimostrare l'utilità del test dell'EDR ai fini dello sviluppo di una chemioterapia mirata, avrebbe pur sempre una valenza importante in quanto sarebbe il primo studio clinico controllato a mostrare la non-utilità di un test *in vitro* di predizione della chemioresistenza.

Isolamento e caratterizzazione delle cellule staminali tumorali nei tumori ginecologici

Studi condotti negli ultimi anni hanno dimostrato che i tumori si originano e vengono mantenuti da una rara popolazione cellulare che corrisponde alle cellule staminali tumorali. Queste cellule sono state isolate e caratterizzate a partire da vari tipi di tumori, ma molto scarse sono le informazioni relative all'isolamento e caratterizzazione di queste cellule nei tumori dell'ovaio e dell'endometrio. Nel presente progetto proponiamo di studiare queste cellule nei carcinomi dell'ovaio e dell'endometrio. Onde realizzare questi studi viene proposto di utilizzare metodologie precedentemente utilizzate con successo in altri tipi di tumori: le cellule tumorali *in toto* o la frazione CD133+/CD45- del tumore vengono coltivate in condizioni che favoriscono lo sviluppo di strutture multicellulari sferiche e queste microsfeere vengono poi inoculate in topi immunodeficienti NOD/SCID; alternativamente, cellule tumorali *in toto* vengono inoculate sottocute a topi NOD/SCID e, a partire dai tumori sottocutanei che si sviluppano, vengono isolate le cellule tumorali staminali. Le cellule tumorali così isolate verranno caratterizzate per quanto riguarda le caratteristiche immunofenotipiche, la risposta a stimoli ormonali, la capacità differenziativa e le capacità di generare *in vivo* tumori simili a quelli di origine, il profilo di espressione genica (come mRNA e microRNA) e la sensibilità ad una batteria di chemioterapici utilizzati in clinica.

Risultati attesi nel triennio

Studi preliminari condotti nel nostro laboratorio hanno indicato che è possibile isolare cellule staminali tumorali (CST) a partire da carcinomi dell'endometrio e dell'ovaio. Questi studi dovranno essere estesi a livello di circa 100 casi di carcinoma dell'ovaio e di carcinoma dell'endometrio. Le CST verranno caratterizzate per una serie di parametri immunofenotipici, con particolare enfasi allo studio dell'antigene CD133. Gli studi preliminari finora condotti hanno mostrato che le CST dell'endometrio sono CD133+, mentre quelle dell'ovaio sono frequentemente CD133+, ma possono essere anche CD133-. Queste cellule CD133+ saranno caratterizzate per l'assenza di marcatori emopoietici (ad es, CD45) e la presenza di marcatori tipici del tessuto tumorale (ad es., le CD133+ dei carcinomi endometri ali per l'espressione di Citocheratina-7). La capacità delle CST di riformare il tumore di origine dopo inoculo in topi NOD/SCID verrà valutato tramite studi istologici standard, supportati anche da analisi immuni fenotipiche specifiche. Linee stabilizzate di CST saranno analizzate per il loro profilo di espressione genica utilizzando *topic-defined PIQOR Oncology and Stem Cell Microarrays* della Miltenyi Biotec e il profilo di espressione di microRNA utilizzando una piattaforma *ad hoc* da noi realizzata. La sensibilità ai chemioterapici anti-tumorali standard o di recente identificazione verrà studiata *in vitro* misurando l'inibizione dell'incorporazione di timidina e/o l'induzione di apoptosi.

Trasferibilità dei risultati

Gli studi da noi proposti dovrebbero contribuire allo sviluppo di conoscenze di base sui meccanismi cellulari che sono all'origine dello sviluppo dei tumori dell'ovaio e dell'endometrio. È inoltre previsto che gli studi relativi alla valutazione del profilo di espressione genica delle CST possano portare all'identificazione di bersagli molecolari potenzialmente utilizzabili per lo sviluppo di terapie anti-tumorali mirate. Infine, gli studi di chemio sensibilità delle CST potrebbero contribuire all'identificazione di farmaci o combinazioni di farmaci attivi su queste cellule e degni di essere poi sperimentati in studi clinici mirati.

La caveola: una porzione specializzata della plasma membrana per lo studio dei meccanismi molecolari neoplastici e più in generale patologici

Per lungo tempo le membrane biologiche sono state viste come un uniforme doppio strato lipidico con proteine immerse e libere di muoversi lateralmente al piano della membrana "mosaico fluido". Ora dietro le evidenti diverse specializzazioni che caratterizzano le membrane cellulari si è scoperto che vi sono profonde differenze in composizione lipido/proteica. La membrana plasmatica (PM) ad esempio è più ricca in colesterolo e sfingomieline rispetto ai lipidi dei differenti organelli intracellulari. Più in generale le membrane si differenziano nella loro composizione lipido/proteica lungo il traffico di membrane nella direzione secretiva (Reticolo Endoplasmatico Golgi, PM). Più recentemente sono stati scoperti all'interno delle PM i microdomini lipidici *Rafts* con caratteristiche biochimiche e biofisiche indipendenti e funzionali dalle PM. Per la loro resistenza ai detergenti deboli sono anche chiamati "membrane insolubili ai detergenti". Tale caratteristica permette di isolarli per ultra centrifugazione in gradienti di saccarosio ad una specifica densità di galleggiamento. Disposti come piattaforme di raccolta dei segnali di trasduzione cellulare funzionano come regolatori di importanti associazioni molecolari da cui si origina: il linguaggio cellulare (*cross talk*), in cui avvengono fusioni o selezioni lipidiche, traffico e riciclo di proteine e quindi anche luoghi in cui rinvenire eventi patologici come l'entrata virale o la formazione di placche connesse all'Alzheimer. Il *raft*, se colonizzato da una proteina di 21KD la caveolina 1 (Cav-1), può dare origine ad una struttura sovramolecolare estremamente più organizzata, polifunzionale e visibile in ultrastruttura come una introflessione della PM: la caveola

Risultati attesi nel triennio

Molti studi hanno evidenziato come l'interazione lipide-lipide, le interazioni lipide- proteina, proteina-proteina e/o ligando abbiano un ruolo chiave nella formazione dei microdomini in grado di modificare lateralmente le dimensioni dei *Rafts* rendendo porzioni di PM più funzionali agli scopi che quella specifica cellula ha nel suo programma. Le caveoline grazie a proprie sequenze interne (*scaffoldig domain*) di grande capacità interattiva formano omo ed etero oligomeri in grado di impartire ordine o modulare le attività nei crocevia di molecole segnale rappresentato dai micro domini lipidici. Tra queste sono comprese molecole strutturali del citoscheletro periferico che regolano i centri strategici di raccordo dei microfilamenti actinici essenziali all'ancoraggio cellulare le adesioni focali. Abbiamo focalizzato i nostri studi sull'espressione della Cav -1 in cellule di melanoma umano che ha il recettore *fibroblast growth factor* (FGFR) costitutivamente attivato. Sappiamo che la caveolina svolge un ruolo chiave nel mantenere il *pathway* di segnale oncogenico in quanto accoglie, mantenendole associate, le due molecole che sono all'interno del micro dominio caveolare. Vogliamo studiare perché nei fibroblasti normali il segnale FGFR si interrompe dinamicamente attraverso l'endocitosi spontanea delle caveole mentre nel melanoma non avviene. Riteniamo che ci sia un malfunzionamento nei rapporti tra il complesso di molecole Cav/FGFR /src e le molecole RHO GTP asi regolatrici del citoscheletro.

Trasferibilità dei risultati

Possediamo topi geneticamente modificati per le caveoline che costituiscono modelli sperimentali avanzati per lo studio di patologie quali: le cardiovascolari, oncologiche e del metabolismo lipidico che si sviluppano spontaneamente nei topi Cav-/-.

Intendiamo estrarre da organi quali miocardio polmoni o tessuto adiposo ecc. in quantità preparative da usare per l'estrazione delle caveole di cui siamo pionieri e del suo equivalente base nei topi *Knock Down* per la Cav-1. I *raft* (-Cav1) e le caveole così ottenute saranno studiate per le associazioni molecolari lipidiche attraverso la caratterizzazione spettroscopica all'NMR con tecniche COSY e TOCSY. NOESY and ROESY. Questo ci consentirà di poter per la prima

volta definire a livello molecolare all'interno di organizzatori del segnale cruciali quali sono le caveole ovvero in loro assenza i meno organizzati *raft* patologie visibili a livello d'organo.

La sorveglianza clinico-epidemiologica e infettiva nei soggetti con coagulopatie congenite

L'emofilia e le coagulopatie congenite sono malattie rare che richiedono competenze altamente specifiche per la diagnosi e la terapia. La terapia farmacologica dei pazienti si basa sull'infusione di concentrati altamente purificati del fattore della coagulazione carente, in forma plasma-derivata o ricombinante. Il progetto prevede, attraverso un dialogo prospettico e retrospettivo costante con i Centri Emofilia, l'implementazione di un Registro nazionale delle coagulopatie congenite che raccolga le informazioni relative all'epidemiologia dell'emofilia e delle altre forme più rare di carenza congenita. Altro obiettivo è la sorveglianza clinica con particolare riferimento alle reazioni avverse di maggior rilievo: infezioni e comparsa di anticorpi-inibitori. In passato l'infusione di concentrati plasma-derivati non sottoposti ad inattivazione virale ha causato infezioni con i virus dell'epatite e con l'HIV, in una parte dei pazienti trattati. La situazione infettivologica nei pazienti coagulopatici sarà monitorata nel tempo e verrà implementata una completa tracciabilità dei prodotti impiegati. I Centri Emofilia forniranno i dati relativi alle caratteristiche di comparsa (tempo di insorgenza, terapia effettuata, ecc.) degli anticorpi-inibitori, in particolare del fattore VIII, che si sviluppano nei pazienti come complicazione della terapia. Un altro obiettivo del progetto sarà il monitoraggio dei consumi dei farmaci, plasma-derivati e ricombinanti.

Risultati attesi nel triennio

Attraverso il Registro nazionale delle coagulopatie congenite, ottenuto attraverso la rete dei Centri Emofilia (AICE) e in collaborazione con l'Associazione dei pazienti (FEDEMO), sarà garantita la sorveglianza dei soggetti coagulopatici per quanto riguarda la epidemiologia delle diverse malattie e il monitoraggio delle possibili infezioni, ponendo particolare attenzione ai rischi teorici di trasmissione di patologie infettive compresa la malattia di Creutzfeldt Jacob. Si intende ottenere una tracciabilità dei prodotti impiegati al fine di garantire ai riceventi, attraverso implementazione di procedure di *look-back*, la massima sicurezza terapeutica. La raccolta delle informazioni sulle caratteristiche fenotipiche e genotipiche dei pazienti, sulla tipologia e le caratteristiche dei prodotti utilizzati nei pazienti che hanno sviluppato il tipo di inibitore, potranno fornire indicazioni sul ruolo che i diversi trattamenti e/o le diverse procedure di preparazione e purificazione dei concentrati possono esercitare nello sviluppo di inibitori nei pazienti emofilici. Il monitoraggio dei consumi dei farmaci plasma-derivati e ricombinanti nella popolazione emofilica, raccogliendo le informazioni attraverso i "piani terapeutici" prescritti dai medici dei Centri Emofilia e dai consumi registrati presso le Regioni consentirà di calcolare i fabbisogni terapeutici e di promuovere l'appropriatezza prescrittiva.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti forniranno agli organismi preposti informazioni per migliorare le strategie di politica sanitaria atte a garantire ai pazienti con coagulopatie congenite un'assistenza globale, mediante un razionale utilizzo delle risorse disponibili. In particolare, il sistema di monitoraggio dei consumi dei farmaci fornirà gli strumenti per gestire situazioni di carenza, promuovere l'appropriatezza prescrittiva e favorire scambi solidaristici a favore di altri Paesi.

La sorveglianza infettivologica dei pazienti emofilici ha una valenza più generale poiché, per la terapia a cui devono sottoporsi, essi costituiscono una popolazione sentinella per la trasmissione di agenti infettivi trasmissibili con il sangue e i suoi derivati.

I risultati ottenuti sulla presenza di associazioni tra presenza di inibitori e tipologia di prodotto somministrato potranno essere utili nella definizione del rischio di insorgenza in seguito a trattamento con diverse tipologie di farmaco.

L'approccio metabolomico nella risposta *in vitro* di sferoidi tumorali multicellulari ad agenti di natura fisica e chimica

Nello studio della risposta di linee cellulari tumorali continue *in vitro* a trattamenti di natura fisica (radiazioni ionizzanti di diverso *Linear Energy Transfer* – LET) e chimica (sostanze antitumorali di sintesi e naturali) ci si può avvalere sia di colture cellulari bidimensionali convenzionali (monostrati) che di colture cellulari tridimensionali multicellulari più complesse (sferoidi). Gli sferoidi tumorali rappresentano un modello sperimentale più vicino alla situazione *in vivo* poiché in essi le cellule sono disposte in un contesto tridimensionale e quindi sono caratterizzati da una complessità strutturale che si avvicina di più ai tumori solidi *in vivo*. Lo scopo del presente progetto sarà quello di approfondire la risposta di sferoidi tumorali di diverso isotipo alle radiazioni ionizzanti e a sostanze antineoplastiche utilizzando l'approccio metabolomico mediante la Risonanza Magnetica Nucleare Protonica ad alta risoluzione (1H-NMR). Questo approccio permetterà di studiare simultaneamente molti aspetti di questa risposta e quindi di rivelare nuove proprietà che sono tipiche di essa. Una particolare attenzione verrà rivolta alla identificazione di nuovi *marker* di *signalling* specifici del sistema di studio utilizzato. In questo contesto, verrà anche studiato il ruolo di vescicole rilasciate dagli sferoidi (esosomi) come meccanismo alternativo della trasduzione dei segnali intercellulari. Gli studi di 1H-NMR verranno affiancati da tecniche biologiche più tradizionali.

Risultati attesi nel triennio

Spettri di 1H-NMR di sferoidi di controllo e di sferoidi trattati verranno acquisiti e comparati utilizzando degli opportuni algoritmi di quantificazione messi a punto in precedenza. Questa comparazione permetterà di individuare quei segnali di 1H-NMR caratteristici della risposta al trattamento specifico. Inoltre, lo studio di tutte le componenti strutturali e funzionali cellulari con l'approccio metabolomico permetterà di individuare anche quei nuovi *marker*, finora sconosciuti, della risposta stessa. In aggiunta, spettri di esosomi isolati da sferoidi di controllo e da quelli trattati verranno anche acquisiti ed esaminati. Specifici algoritmi verranno messi a punto per l'elaborazione quantitativa degli spettri ottenuti dagli esosomi.

Trasferibilità dei risultati

Le informazioni ottenute da questi studi serviranno ad arricchire le conoscenze della risposta dei tumori ai trattamenti antineoplastici. In particolare, l'identificazione di nuovi *marker* potrà essere utile a migliorare i protocolli di trattamento antitumorali e poter seguire temporalmente in modo più adeguato la risposta del tumore ai trattamenti stessi.

L'endotelio emogenico: studi cellulari e molecolari

Molte osservazioni relative allo studio dello sviluppo dell'ematopoiesi durante la vita embrionaria e fetale suggeriscono una stretta connessione fra le cellule endoteliali e lo sviluppo del sistema emopoietico. Il presente progetto di ricerca ha come scopo la purificazione, caratterizzazione e amplificazione di cellule emangioblastiche (cioè in grado di generare una progenie endoteliale ed emopoietica) presenti nel sangue di cordone. A tale scopo viene previsto di coltivare cellule CD34+ totali isolate da sangue di cordone in terreno di coltura consistente in mezzo condizionato di linee di epatociti che favorisce il differenziamento endoteliale delle cellule CD34+. Le cellule endoteliali così ottenute vengono quindi isolate ad omogeneità come cellule positive per vari tipi di marcatori endoteliali di membrana e rigorosamente negative per

marcatori emopoietici CD45-: queste cellule vengono quindi esposte a fattori di crescita emopoietici e ne viene studiato in dettaglio il transdifferenziamento in elementi emopoietici, in particolare della linea eritroide e megacariocitaria. Queste colture di “endotelio emogenico” verranno quindi caratterizzate sulla base di: criteri morfologici e immunofenotipici; marcatori molecolari del differenziamento endoteliale, eritroide e megacariocitario; profilo di espressione di mRNA e di microRNA. In parallelo verrà valutato il potenziale ripopolante emopoietico di queste cellule tramite saggi *in vivo* in topi immunodeficienti.

Risultati attesi nel triennio

Risultati preliminari da noi ottenuti hanno consentito di dimostrare il potenziale emogenico delle cellule endoteliali derivate dal differenziamento *in vitro* delle cellule CD34+ di cordone. Ci aspettiamo pertanto di confermare queste osservazioni su una più ampia casistica. Ci proponiamo poi di dimostrare la sequenza di produzione dei vari tipi di cellule emopoietiche da parte delle cellule endoteliali smistate in condizioni di coltura emopoietica. Questi studi verranno effettuati anche in colture unicellulari di cellule CD144+/CD45- coltivate sia in condizioni di coltura endoteliali che emopoietiche, così consentendo di determinare la frequenza di cellule endoteliali in grado di generare una progenie emopoietica. Tramite studi sequenziali nel tempo di cellule endoteliali messe in condizioni di coltura emopoietiche ci proponiamo di identificare stadi intermedi di transdifferenziazione nei quali le cellule esprimono contemporaneamente sia marcatori endoteliali che emopoietici (ad es. cellule CD144+/CD45+). Tramite studi di ripopolamento di topi NOD/SCID irradiati verrà valutato il potenziale emopoietico *in vivo* dell’endotelio emogenico e verrà paragonato a quello delle cellule CD34+ di partenza. Studi di *gene profiling* tramite *microarray* consentiranno d’identificare geni potenzialmente implicati nel programma emogenico delle cellule endoteliali; questi studi verranno estesi anche ai microRNA, la cui funzione come modulatori del programma di differenziazione emopoietica è stata da noi già studiata.

Trasferibilità dei risultati

I nostri studi dovrebbero consentire la messa a punto di un sistema differenziativo unico nell’uomo che consente di valutare il potenziale emogenico delle cellule endoteliali. I nostri studi hanno anche delle potenziali implicazioni biomediche legate alla possibilità di coltivare e amplificare popolazioni di progenitori endoteliali che hanno *in vivo* potenziale rigenerativo sia in senso endoteliale che emopoietico e che potrebbero quindi avere in futuro delle importanti applicazioni terapeutiche.

Megacariocitopoiesi normale e patologica: differenziazione, poliploidizzazione e attivazione piastrinica

La megacariocitopoiesi è un complesso processo biologico che, partendo dalla cellula staminale e passando per le forme immature e mature di megacariociti porta alla formazione di piastrine, attraverso una serie di eventi cellulari.

In linea con i nostri precedenti studi sulla megacariocitopoiesi, ulteriori indagini sono in corso per comprendere i meccanismi molecolari alla base della differenziazione megacariocitaria e in particolare della poliploidizzazione, di fondamentale importanza perché collegata alla formazione di piastrine.

Ci proponiamo di proseguire lo studio degli eventi alla base dell’indirizzo e del differenziamento megacariocitario e di analizzare inoltre i meccanismi molecolari alla base dell’attivazione piastrinica, poiché questa gioca un ruolo critico sia nella patogenesi della sindrome coronaria acuta che, nella biologia dei tumori (la trombosi rappresenta spesso una complicazione nei pazienti con tumori ed è la seconda, più frequente, causa di morte).

Oltre che nella emostasi e nella trombosi, le piastrine, sono coinvolte anche in vari altri processi fisiopatologici quali la regolazione del tono vascolare, l'infiammazione, la difesa da agenti patogeni, ci proponiamo di approfondire se, l'attivazione di recettori immunitari, presenti sulla membrana megacariocitaria e/o piastrinica, influenza la funzionalità piastrinica durante i processi infiammatori.

Risultati attesi nel triennio

Mediante sistemi di coltura unilinea è possibile seguire e analizzare le fasi di differenziazione/maturazione MK, a partire da progenitori umani CD34+ purificati dal sangue periferico, fino alla formazione di piastrine. Ci proponiamo di:

- proseguire lo studio dell'effetto dell'attivazione dei componenti dei *pathway* Shc/Ras/MAPK e PI3K/AKT/mTOR in risposta alla TPO e altri fattori sulla proliferazione/differenziazione megacariocitaria. In particolare, poiché i nostri precedenti studi hanno mostrato che la modulazione dell'attivazione dei *pathway* in oggetto è necessaria per una poliploidizzazione ottimale degli MK, si cercherà di individuare i meccanismi che ne sono alla base;
- analizzare i meccanismi alla base dell'attivazione piastrinica e, in particolare, approfondire i meccanismi alla base della resistenza piastrinica all'aspirina, poiché evidenze cliniche hanno ampiamente dimostrato che l'attività antiplastrinica dell'aspirina varia da paziente a paziente e i rischi cardiovascolari sono più elevati in pazienti con piastrine resistenti a questo farmaco;
- analizzare l'espressione di alcuni recettori immunitari presenti sulla membrana megacariocitaria e/o piastrinica, durante i processi infiammatori di tipo Th1 e Th2. In modo particolare analizzeremo la modulazione del recettore CXCR4, in quanto, come da noi precedentemente dimostrato, la sua attivazione, in seguito a legame con il suo ligando SDF-1, influenza notevolmente la poliploidizzazione megacariocitaria.

Trasferibilità dei risultati

La trombocitopenia insorge in alcune alterazione specifiche (sindromi mielodisastiche, anemia aplastica, sindromi mieloproliferative) aggravandone la patologia, nonché in seguito a trattamento con chemioterapici, a trapianti di midollo e in pazienti HIV positivi. La conoscenza dei meccanismi alla base della ploidia potrebbe avere delle ricadute importanti per individuare agenti con attività trombopoietica da utilizzare per scopi terapeutici come è avvenuto per TPO. Recentemente infatti alcuni *trial* clinici che prevedono l'utilizzo di TPO ricombinante hanno fornito buoni risultati nello stimolare la produzione di piastrine *in vivo*, soprattutto nei casi di trombocitopenia indotta da chemioterapici.

Nella prevenzione dei disordini cardiovascolari, è utilizzata la terapia antiplastrinica. Evidenze cliniche hanno ampiamente dimostrato l'attività antiplastrinica dell'aspirina e i suoi effetti benefici, tuttavia la sua efficacia varia da paziente a paziente. L'individuazione di nuove strategie nel trattamento di pazienti con disordini cardiovascolari è di particolare importanza soprattutto nei casi di resistenza a terapie tradizionali.

Nuovi protagonisti nella progressione del melanoma: microRNA ed esosomi

L'incidenza dei melanomi cutanei è costantemente in crescita. Malgrado siano state evidenziate molte anomalie molecolari correlate alla progressione di questo tumore, il meccanismo che controlla la diversa espressione genica non è ancora conosciuto. I microRNA (miR) (piccoli RNA in grado di regolare l'espressione genica principalmente attraverso un meccanismo di repressione post trascrizionale) svolgono un ruolo fondamentale nei principali processi cellulari, incluso il cancro. I risultati precedentemente ottenuti dal nostro gruppo hanno

evidenziato che i miR-221/-222 fanno parte di un complesso network capace di regolare la progressione del melanoma. In futuro ci proponiamo di:

- Effettuare studi funzionali in vivo in topi nudi, per confermare il ruolo chiave dei miR-221/-222 nella progressione del melanoma umano e i possibili effetti anti-tumorali del trattamento con specifici inibitori di questi microRNA.
- Individuare altri microRNA coinvolti nello sviluppo del melanoma e differenzialmente espressi nelle cellule neoplastiche rispetto ai melanociti normali, utilizzando la tecnica del *microarray*.
- Studiare le microvescicole, o esosomi, rilasciate dalle cellule di melanoma e coinvolte nello sviluppo del tumore. Verranno effettuati studi funzionali per confermare la capacità di queste particelle di trasferire RNA e/o proteine a linee cellulari accettrici e studi di espressione per correlare il “trascrittoma” degli esosomi con l’induzione e la progressione del tumore.

Risultati attesi nel triennio

Gli studi *in vivo* verranno effettuati per confermare le proprietà tumorigeniche dei miR-221/-222 e analizzare i possibili effetti antitumorali di specifici inibitori di questi RNA, gli antagomiR. Gli esperimenti verranno effettuati su un numero statisticamente significativo di animali al fine di ottimizzare la dose e le modalità di trattamento nell’utilizzo di queste sostanze per una eventuale futura applicazione clinica.

Abbiamo già dimostrato che l’espressione dei miR-221/-222 controlla due *pathway* importanti nella crescita e nel differenziamento del melanoma, attraverso la regolazione di c-kit e di p27. Ora cercheremo di individuare altri microRNAs/targets associati alla progressione di questi tumori.

In fine, l’analisi delle capacità delle microvescicole di trasferire “informazioni” (sotto forma di RNA o proteine) da una cellula all’altra e l’analisi di espressione delle molecole trasportate dalle stesse, permetterà di valutare la correlazione tra queste particelle e la progressione del melanoma.

Trasferibilità dei risultati

La recente identificazione dei microRNA e l’evidenza della loro alterata espressione nei tumori mostra un nuovo livello di regolazione molecolare nel cancro. Questi nuovi “meccanismi” di regolazione basati sui miR risultano particolarmente interessanti considerando che ogni miR controlla più RNA target e che ogni mRNA può essere regolato da più miR. Il silenziamento dei miR potrebbe dunque rappresentare un nuovo approccio nella terapia dei tumori. Inoltre il profilo di espressione dei miR nei tumori potrebbe essere utilizzato come nuovo *marker* prognostico e diagnostico. Analogamente, anche la conoscenza degli RNA e delle proteine contenuti all’interno degli esosomi potrebbe essere utilizzata a scopo diagnostico o terapeutico.

Protocolli di indagine molecolare per lo studio del deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi

Il deficit di glucosio -6-fosfato deidrogenasi (G6PD) è una malattia ereditaria rara. Presenta una marcata eterogeneità molecolare, clinica e biochimica. Predisporre alle seguenti manifestazioni cliniche: iperbilirubinemia neonatale, emolisi acuta e, raramente, anemia emolitica cronica. La gravità delle manifestazioni cliniche è collegata al tipo di difetto molecolare e alla presenza concomitante di fattori esterni che scatenano il processo emolitico.

Il gene che codifica l’enzima G6PD è localizzato sul cromosoma X ed è costituito da 13 esoni e 12 introni; si esprime in tutti i tessuti e presenta una struttura complessa. La sequenza nucleotidica è completamente nota e altamente polimorfica, a tutt’oggi sono state caratterizzate

circa 140 varianti molecolari dell'enzima dovute principalmente a mutazioni puntiformi nella regione codificante del gene. In pochi casi sono state trovate mutazioni nelle regioni introniche, doppie mutazioni o delezioni di piccoli tratti di DNA. Il test diagnostico di base è il saggio dell'attività enzimatica nei globuli rossi, che, tuttavia, è scarsamente efficiente nella diagnosi delle femmine eterozigoti in cui, a causa del fenomeno del mosaicismo, l'attività enzimatica è molto variabile. La diagnosi definitiva si ottiene con l'analisi molecolare.

Obiettivi principali sono: i) aggiornamento del protocollo per la diagnosi molecolare del deficit di G6PD attualmente in uso al fine di ottenere una diagnosi rapida e a basso costo sia delle varianti italiane che delle varianti ad elevata prevalenza nei Paesi extraeuropei in considerazione dei recenti flussi migratori da Paesi in cui il deficit di G6PD è prevalente; ii) messa a punto di metodi per lo studio della regione non codificante del gene, iii) allestimento di un data base utilizzabile per la registrazione dei casi di G6PD a livello nazionale.

Risultati attesi nel triennio

Ottimizzazione e valutazione di metodi di amplificazione allele specifica a tubo unico per l'identificazione delle mutazioni più frequenti in Italia e nei Paesi extraeuropei ad elevata prevalenza di deficit di G6PD.

Studio epidemiologico delle mutazioni del gene G6PD in campioni di carenti e portatori del difetto residenti in Italia.

Sviluppo di un metodo di cromatografia liquida denaturante ad alta risoluzione (DHPLC) per l'esame della regione non codificante del gene G6PD.

Allestimento di un data base per la registrazione dei casi di G6PD a livello nazionale ottimizzando il data base attualmente in uso come cartella clinica informatizzata per i casi di deficit di G6PD finora esaminati.

Trasferibilità dei risultati

Miglioramento delle prestazioni dei servizi di medicina di laboratorio per la diagnosi del deficit di G6PD soprattutto nelle femmine eterozigoti.

Sorveglianza sugli effetti dei flussi migratori in relazione alla diffusione di varianti di G6PD con alta prevalenza nei Paesi extraeuropei.

Riprogrammazione di cellule staminali pluripotenti (iPS) da cellule fibroblastiche murine e umane e da precursori neuronali del cervello di ratti neonati

In un recente lavoro pionieristico Yamanaka e collaboratori hanno identificato dei fattori di trascrizione chiave in grado di riprogrammare la cellula somatica verso uno stato pluripotente attraverso l'espressione ectopica dei fattori OCT4, SOX2, KLF4 e c-MYC. Un'altra metodologia ha utilizzato piccole molecole chimiche in combinazione con i fattori genetici per riprogrammare le cellule somatiche murine. Per esempio, il lavoro di Melton e colleghi dimostra che l'acido valproico (VPA), un'inibitore delle istone deacetilasi (HDAC), incrementa l'efficienza di riprogrammazione nei fibroblasti umani infettati con i fattori di trascrizione Oct4, Sox2, e Klf4.

Il primo obiettivo da raggiungere attraverso questo progetto sarà quello di indurre lo stato di cellula iPS a partire da cellule fibroblastiche murine e umane come da protocollo di Melton *et al.* 2008. In seguito, le cellule iPS derivate dalle cellule fibroblastiche verranno confrontate con le cellule staminali embrionali umane per morfologia, espressione di antigeni di superficie, profilo di espressione di fattori di trascrizione e la loro capacità di differenziare sia *in vitro* che in teratoma. Un altro obiettivo di questo progetto è lo studio delle iPS derivate da precursori neuronali del cervello di ratti neonati per un eventuale impiego delle iPS nello studio di malattie neurodegenerative in modelli murini.

Risultati attesi nel triennio

Il primo obiettivo da raggiungere attraverso questo progetto sarà quello di indurre lo stato di cellula iPS a partire da cellule fibroblastiche murine (MEF) e cellule BJ umane (*neonatal human foreskin fibroblast*) come da protocollo di Melton *et al.* 2008. Al fine di continuare ad ottimizzare questo protocollo di riprogrammazione si farà uso del VPA nel mezzo di coltura “3i” (combinazione dei tre inibitori SU5402, PD184352 e CHIR99021) stabilendo la sua concentrazione ottimale. In breve, attraverso l’ottimizzazione del protocollo e tramite la trasfezione dei tre fattori di trascrizione Oct4, Sox2 e Klf4, pensiamo di poter riprogrammare i fibroblasti primari umani con una efficienza dell’1%, ovvero 1.000 volte più alta rispetto ad altri protocolli oggi impiegati. Un altro risultato di questo progetto che ci aspettiamo è che una combinazione di diversi inibitori delle HDAC e delle metiltransferasi possa fare aumentare maggiormente l’efficienza di riprogrammazione e permettere la generazione di cellule iPS specifiche per ogni paziente da una piccola popolazione cellulare di partenza. In questo modo sarebbe possibile studiare i meccanismi molecolari durante gli stadi precoci del processo di riprogrammazione delle iPS. Infine, in questo progetto verranno indagati i meccanismi di attivazione dei segnali proliferativi e dei *checkpoint* che controllano il ciclo cellulare nelle iPS che dovrebbero essere simili a quelli già da noi studiati nelle cellule staminali embrionali murine.

Trasferibilità dei risultati

La possibilità di riprogrammare le cellule somatiche verso lo stato di cellula staminale pluripotente indotta (iPS) apre nuove speranze per generare cellule staminali paziente-specifiche che possano essere utilizzate per la cura di molte malattie e nel campo dei trapianti autologhi. In particolare, il nostro studio delle iPS derivate da precursori neuronali avrà una notevole rilevanza per intraprendere nuove strategie terapeutiche per le malattie neurodegenerative come la sclerosi multipla e il morbo di Alzheimer.

Ruolo dell’ipossia nella differenziazione emopoietica normale e leucemica

È noto che i livelli di ossigeno svolgono un ruolo importante nel controllo di molti eventi biologici ed esistono evidenze che possano svolgere un ruolo di primaria importanza nel controllo dell’ematopoiesi. Ad esempio, è noto che nelle nicchie ematopoietiche esistono condizioni di relativa ipossia e che l’ipossia stessa svolga un ruolo importante nel controllo dell’ematopoiesi. Nel presente progetto verrà valutato il ruolo dell’ipossia sul controllo dell’ematopoiesi *in vitro*. Questi studi verranno realizzati sfruttando la messa a punto nel nostro laboratorio di sistemi di coltura “unilinea” che consentono di ottenere la differenziazione selettiva dei progenitori emopoietici CD34+ in cellule eritroidi, megacariocitarie, granulocitarie o monocitarie. Queste colture verranno allestite a varie concentrazioni di ossigeno: 21%, 5% e 1%, al fine di ottenere condizioni di moderata (5% O₂) o elevata (1% O₂). La maturazione delle cellule verrà valutata tramite criteri morfologici, immunofenotipici e molecolari. Tramite un *microarray* dedicato verrà valutato il profilo di espressione dei geni implicati nella risposta all’ipossia nei vari *lineage* emopoietici. Infine, esperimenti funzionali verranno realizzati onde valutare un possibile ruolo nel processo differenziativo di mediatori molecolari implicati nel meccanismo di attivazione dei due principali fattori trascrizionali implicati nella risposta all’ipossia, HIF-1alfa e HIF-2.

Risultati attesi nel triennio

Esperimenti preliminari condotti nel nostro laboratorio hanno mostrato che condizioni di moderata ipossia (5% O₂) favoriscono selettivamente il differenziamento eritroide e megacariocitario, mentre il differenziamento granulomonocitario non è influenzato dai livelli di ossigeno. Proponiamo pertanto di determinare i meccanismi molecolari responsabili di tale

fenomeno, ipotizzando che l'eritropoietina e la trombopoietina devono verosimilmente innescare un processo molecolare di risposta all'ipossia: è verosimile che le condizioni d'ipossia favoriscano l'espressione e/o la funzione di alcune molecole essenziali per il processo differenziativo in senso eritroide e megacariocitario. In tal senso proponiamo di: studiare il profilo di espressione dei geni implicati nella risposta all'ipossia; valutare l'esistenza di microRNA modulati in queste cellule dall'ipossia e di determinare i loro bersagli molecolari; di dimostrare l'esistenza di loop regolativi del differenziamento modulati dall'ipossia. Inoltre verrà specificamente valutato un possibile ruolo di HIF-1 e di HIF-2 nel processo differenziativo eritroide e megacariocitario tramite esperimenti di silenziamento utilizzando siRNA specifici o di overespressione utilizzando vettori retrovirali di espressione genica.

Trasferibilità dei risultati

Le ricerche da noi proposte hanno delle potenziali implicazioni nella comprensione dei meccanismi di controllo dell'ematopoiesi normale. Questi studi potrebbero inoltre contribuire ad identificare dei *pathway* che possono essere manipolati farmacologicamente e che potrebbero trovare applicazioni potenziali in quelle condizioni patologiche nelle quali la produzione di elementi eritroidi o megacariocitari è deficitaria.

Ruolo delle mutazioni somatiche di JAK1 nella leucemia linfoblastica acuta

Le leucemie linfoblastiche acute (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. I primi 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: i) la definizione della rilevanza clinica e del significato prognostico delle mutazioni di JAK1 nelle LLA e in altre emopatie maligne pediatriche e dell'adulto; ii) la comprensione dei meccanismi molecolari alla base della disregolazione funzionale di JAK1 associata alle mutazioni identificate e la caratterizzazione del loro effetto sul *signaling* intracellulare; iii) la valutazione di JAK1 come possibile bersaglio molecolare per lo sviluppo di nuovi farmaci antitumorali.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio porterà alla delimitazione 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.

Ruolo immunomodulatorio delle cellule staminali mesenchimali in malattie infiammatorie croniche dell'intestino

L'attività di ricerca è stata focalizzata sulle cellule stromali mesenchimali. Abbiamo recentemente isolato e caratterizzato gli osteoprogenitori o periciti CD146+ da midollo osseo di donatori normali. Le cellule CD146+ rappresentano la frazione multipotente delle cellule stromali mesenchimali, dato che una singola cellula CD146+ è capace di generare *in vivo* osso e nicchia ematopoietica quando trapiantata nel topo. Sulla base delle caratteristiche fenotipiche e funzionali di queste cellule, inizialmente isolate da midollo osseo, siamo stati successivamente in grado di riconoscerle ed isolarle da un campione di polpa dentaria, tre tonsille, tre fegati fetali e quattro colon normali. Le cellule stromali mesenchimali vengono attualmente utilizzate in studi clinici sperimentali di fase 2 e fase 3 sulla base delle loro caratteristiche immunomodulatorie (malattia del trapianto contro l'ospite – *Graft Versus Host Disease*, GVHD, *Crohn's disease*, *type I diabetes*, *multiple sclerosis*, *septic shock*), antiapoptotiche e rigenerative (*heart infarction*, *chemo/radioprotection*) e differenziative (*tendon*, *meniscus*, *cartilage and bone regeneration*). Riteniamo che l'utilizzo in clinica di queste cellule, nonostante i promettenti risultati e la assenza di tossicità acuta riportati ad oggi, sia prematura in assenza di una precisa comprensione meccanicistica e funzionale delle stesse. In particolare, siamo interessati allo studio della funzione immunomodulatoria da esse esercitata ed in particolare al loro ruolo nella patogenesi delle malattie croniche intestinali (IBD) come la malattia di Crohn. La nostra interpretazione sull'effetto positivo esercitato dal loro utilizzo sistemico nella malattia di Crohn è che esse vadano incontro ad esaurimento numerico o funzionale e risultino quindi insufficienti a mantenere localmente adeguati livelli di tolleranza immunitaria. Siamo parallelamente interessati alla definizione della microRNA *signature* caratteristica delle cellule mesenchimali normali e patologiche. Infine, sulla base della solida esperienza ematologica che caratterizza il reparto, vogliamo definire i meccanismi che sottendono la funzione di nicchia ematopoietica nelle cellule mesenchimali.

Risultati attesi nel triennio

La comprensione dettagliata del network di interazioni in atto nella lamina propria dell'intestino affetto da malattia di Crohn. L'identificazione dei difetti numerici o funzionali delle cellule staminali mesenchimali in corso di malattia. La caratterizzazione del miRNoma delle cellule staminali mesenchimali normali e patologiche messo in relazione con la funzione immunomodulatoria su linfociti T, NK e cellule dendritiche.

Trasferibilità dei risultati

Le informazioni acquisite permettono il controllo e il trattamento della malattia di Crohn, in rapido aumento nel mondo industrializzato e con possibile evoluzione in carcinomi conclamati del colon. Inoltre le stesse informazioni possono contribuire alla comprensione di gran parte delle patologie autoimmuni.

Screening nei donatori di sangue per la presenza del deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) e di sferocitosi ereditaria (HS) e valutazione della lesione da conservazione delle emazie per trasfusione normali e con difetto congenito

La presenza di difetti congeniti eritrocitari come il deficit di G6PD e la sferocitosi ereditaria, che è noto possono essere causa di anemia emolitica acuta o cronica, può influire in maniera determinante sulla sopravvivenza post trasfusionale dei globuli rossi conservati, ridurla

drasticamente e dare luogo ad emolisi intravasale soprattutto in presenza di altri fattori scatenanti quali terapie farmacologiche, infezioni, febbre, alimenti. Dal momento che la sopravvivenza eritrocitaria è strettamente correlata allo stato metabolico e allo stato fisico della membrana dei globuli rossi, l'indebolimento dei sistemi antiossidanti intracellulari, come in presenza di un deficit di G6PD, l'aumentata suscettibilità allo stress ossidativo e alla denaturazione delle proteine di membrana, come nella sferocitosi ereditaria, possono innescare e accelerare quella serie di eventi che intercorrono fra l'invecchiamento eritrocitario e l'evento emolitico, con serie problematiche a carico del paziente trasfuso. Alla luce di queste osservazioni la ricerca si propone di effettuare uno screening sui donatori, afferenti al Centro Trasfusionale dell'Università Sapienza di Roma, per la presenza di portatori del difetto di G6PD e di difetti della membrana eritrocitaria riconducibili a sferocitosi ereditaria. Verranno sottoposti a screening per il dosaggio dell'attività enzimatica G6PD e per il test di fragilità osmotica tutti i donatori del Centro Trasfusionale dell'Università Sapienza di Roma per un periodo di 6-12 mesi e nei soggetti portatori di deficit di G6PD verrà effettuata la caratterizzazione molecolare mediante analisi genica mentre nei soggetti positivi al test di fragilità verranno effettuati i test di conferma con la caratterizzazione del difetto molecolare mediante analisi strutturale della membrana eritrocitaria. La ricerca si propone inoltre di studiare i meccanismi che sono alla base del precoce invecchiamento di tali cellule, investigando sia a livello strutturale che reologico il comportamento degli eritrociti e indagando il danno ossidativo prodotto durante l'invecchiamento *in vitro* indotto dalla conservazione. Verranno studiate le modificazioni reologiche, morfologiche, strutturali e metaboliche di emazie per trasfusione, conservate in soluzione preservante, dal tempo 0 fino a 42 giorni di conservazione, secondo le procedure standard. Lo studio riguarderà sia le emazie di donatori normali che quelle di donatori con difetto congenito metabolico o strutturale, individuati con lo screening e successivamente caratterizzati.

Risultati attesi nel triennio

Non esistono molti studi in letteratura sull'effetto della transfusione di emazie con deficit di G6PD e nei pochi descritti i dati sull'emolisi posttrasfusionale nei riceventi sono contraddittori. Si ipotizza che questo possa dipendere dal fatto che nei diversi studi descritti il deficit di G6PD era dovuto a mutazioni geniche diverse, mutazioni corrispondenti a varianti diverse con caratteristiche biochimiche e cliniche eterogenee. Né sono previste indagini diagnostiche preventive sui donatori per individuare tali difetti e fino ad oggi pochissimi studi sono stati descritti sulla presenza di difetti congeniti eritrocitari nei donatori, ma nessuno sulla popolazione di donatori italiani. Non ci sono dati sulla popolazione di donatori italiani per quanto riguarda la presenza del trait sferocitico, mentre uno studio effettuato in Germania ha osservato un aumento di fragilità osmotica negli eritrociti di donatori di sangue. Si può pertanto supporre tra i donatori di sangue la presenza di portatori inconsapevoli di difetti congeniti eritrocitari e questo potrebbe giustificare la presenza di emolisi in alcuni preparati di emazie o effetti avversi sull'ospite trasfuso particolarmente in presenza di malattie preesistenti.

Gli obiettivi di questa ricerca sono effettuare: i) uno studio di prevalenza del deficit di G6PD e della sferocitosi ereditaria nei donatori di sangue, ii) una caratterizzazione dei difetti molecolari nei donatori positivi, iii) una valutazione della lesione da conservazione nei concentrati di emazie di donatori portatori di difetto congenito.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questa ricerca permetteranno di :

- approfondire le conoscenze sui meccanismi che sono alla base della lesione da conservazione fornendo nuovi parametri strutturali e funzionali indicativi della reale vitalità delle cellule trasfuse;

- dare 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;
- 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 riceventi;
- definire la possibilità di emolisi post trasfusionale nei riceventi in relazione al tempo di conservazione onde evitare i potenziali effetti dannosi della trasfusione nel ricevente.

Sindromi neurocardiofaciocutanee: studi di correlazione genotipo-fenotipo

Le sindromi neurocardiofaciocutanee (SNCFC) sono un gruppo di disordini dello sviluppo clinicamente correlate, caratterizzate da difetti cardiaci congeniti, dismorfismi facciali, bassa statura e deficit cognitivo variabile. 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 di PTPN11 sono associate a stenosi della valvola polmonare, mentre quelle di 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 SNCFC 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. Questi risultati permetteranno di delineare la storia naturale e quindi la prognosi, dei quadri clinici associati ai geni coinvolti e di sviluppare *flow-chart* diagnostiche e a protocolli di follow-up dei pazienti per favorire diagnosi, counseling e management del paziente.

Trasferibilità dei risultati

Le ricadute assistenziali sono notevoli poichè si potranno calibrare i bilanci di salute in relazione alle diverse problematiche cliniche legate all'espressione dei differenti difetti genici.

Stato redox dei tioli proteici e danno vascolare nell'insufficienza renale cronica

È noto che la perdita graduale e irreversibile della funzione renale che caratterizza lo stato di insufficienza renale cronica (IRC) si accompagna ad aumentata incidenza di patologie secondarie a carico del sistema cardiovascolare. È stato altresì ampiamente dimostrato, anche dal nostro gruppo (Palleschi, *et al. Clin Chem Lab Med* 2007;45:1211-8), che nei pazienti affetti da IRC si realizza un progressivo sbilanciamento dell'equilibrio *redox* del plasma e che il grado di ossidazione dei tioli proteici correla significativamente con il livello di omocisteina totale, un marcatore indipendente di rischio cardiovascolare (Palleschi, *et al. Nephron Clin Pract* 2008;108:C106-C112). Su queste basi e sull'evidenza che a tutt'oggi non è ancora noto il meccanismo patogenetico alla base della ormai assodata associazione tra iperomocisteinemia e rischio cardiovascolare, è stato ipotizzato che lo stress ossidativo giochi un ruolo importante

nello sviluppo della malattia cardiovascolare nell'IRC. Obiettivo dei prossimi studi sarà la valutazione del ruolo dello stato *redox* di componenti plasmatici e cellulari del sangue di pazienti con IRC nello sviluppo e nella progressione del *vulnus* vascolare.

Risultati attesi nel triennio

Proteine isolate dal plasma di soggetti con IRC di vario grado e di soggetti di controllo saranno caratterizzate in termini biochimici e, mediante test *in vitro*, ne saranno valutati gli effetti su eventi cruciali della patogenesi del danno vascolare (attivazione leucocitaria, infiammazione, danno endoteliale). Sarà quindi stimato l'effetto *in vitro* del trattamento differenziale delle componenti in gioco con composti ad attività antiossidante.

Trasferibilità dei risultati

Oltre ad ampliare le conoscenze su una patologia dagli elevatissimi costi sanitari e sociali, si ritiene che tali studi potranno avere concreta valenza traslazionale. I risultati attesi potranno infatti trovare immediato riscontro nella pratica clinica, ponendo le basi per un corretto e mirato impiego di terapie antiossidanti.

Studio del ruolo dei geni coinvolti nel metabolismo del ferro durante il differenziamento eritroide normale e patologico

Verranno eseguiti i seguenti studi: i) verrà completata l'analisi dell'espressione dei trascritti alternativi della ferroportina nelle cellule eritroidi di pazienti affetti da diverse forme di emocromatosi ereditaria e l'analisi del loro DNA per la presenza di mutazioni nella regione non codificante in 5' e/o nel promotore; ii) verrà concluso lo studio sulla localizzazione sub-cellulare della ferroportina nelle cellule eritroidi mediante tecniche di immunofluorescenza, microscopia confocale e *Western blot*; iii) proseguirà l'analisi della regolazione dei diversi trascritti della ferroportina nelle cellule eritroidi mediante esperimenti di silenziamento genico sia in progenitori emopoietici umani indotti a differenziazione eritroide che nella linea eritroleucemica K562; iv) nell'ambito dello studio della regolazione traduzionale verrà verificato l'effettivo ruolo regolativo di alcune famiglie di microRNA, per le quali la ferroportina e altri geni implicati nella regolazione del metabolismo del ferro sono stati identificati come potenziali geni bersaglio; v) poiché una delle complicazioni più importanti e spesso con esito fatale che si osserva nei pazienti affetti da β -talassemia di tipo *major* e *intermedia* è un progressivo sovraccarico di ferro in diversi organi quali fegato, intestino, milza, reni e cuore, abbiamo iniziato un filone parallelo di ricerca avente l'obiettivo di analizzare eventuali modificazioni nell'espressione della ferroportina e del GDF15 sia a livello di mRNA che di proteina durante il differenziamento eritroide *in vitro* di progenitori emopoietici isolati da sangue periferico proveniente da soggetti affetti da β -talassemia *intermedia* e *major* trattati o non trattati con lo *Stem Cell Factor* (SCF).

Risultati attesi nel triennio

Comprensione della funzione della ferroportina nelle cellule eritroidi; espressione differenziale dei trascritti alternativi della ferroportina durante il differenziamento eritroide di progenitori emopoietici isolati dai pazienti affetti da emocromatosi ereditaria rispetto a quelli provenienti da individui sani; presenza di mutazioni disregolative nella regione non codificante in 5' e/o nel promotore del gene della ferroportina in pazienti affetti da diverse patologie del metabolismo del ferro che potrebbero chiarire aspetti ancora non risolti, soprattutto in tutti quei casi in cui non sono state trovate mutazioni nelle regioni codificanti; una maggiore comprensione del ruolo della via epcidina-ferroportina nella regolazione del metabolismo del ferro durante il differenziamento eritroide normale e patologico, con particolare attenzione ai soggetti affetti da β -talassemia.

Trasferibilità dei risultati

Lo studio dei meccanismi di regolazione dei geni implicati nel controllo dell'assorbimento del ferro in risposta alle esigenze dell'organismo può portare ad una migliore comprensione dei meccanismi fisiopatologici alla base delle diverse forme di malattie legate ad alterazioni dell'omeostasi del ferro con possibili ricadute positive per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

Studio del ruolo dei geni HOX e dei microRNA nei processi di proliferazione, differenziamento e oncogenesi in sistemi cellulari umani

Il progetto prevede lo studio del ruolo svolto da alcuni geni HOX, che codificano per fattori di trascrizione implicati nella morfogenesi, e microRNA (miR), piccoli RNA non codificanti che fungono da repressori della traduzione di mRNA bersaglio, nei processi di differenziamento e oncogenesi in cellule umane di diversa natura. In particolare saranno analizzati i ruoli svolti dai geni HOXD4, HOXB3 e HOXA3 e dal miR-10b, la cui espressione è legata e coordinata da una rete di relazioni regolative. È stato visto che la deregolazione di miR-10b può essere legata a processi neoplastici (metastasi del cancro della mammella, glioblastomi e AML), mentre i geni HOXB3 e HOXA3 sono implicati nella scelta differenziativa verso sottopopolazioni di cellule neurali. L'obiettivo è pertanto quello di identificare i componenti del percorso regolativo che coinvolge i suddetti geni e include un certo numero di geni bersaglio non ancora definiti. Come sistemi cellulari verranno utilizzate linee cellulari neuronali portate a differenziamento con acido retinoico (RA), glioblastomi primari e leucemie. Lo studio dovrà prevedere analisi dei profili di espressione genica nei sistemi cellulari utilizzati, anche dopo *over*-espressione dei geni coinvolti.

Risultati attesi nel triennio

L'analisi della rete genica che include il miR-10b e i geni HOXD4, HOXB3 e HOXA3, nonché i relativi geni bersaglio che sono i loro effettori, permetterà di chiarire l'organizzazione di una via regolativa implicata in processi di differenziamento in cellule neuronali. L'identificazione dei loro rispettivi geni bersaglio (su cui agiscono con meccanismi regolativi diversi, trascrizionale o traduzionale) consentirà di comprendere anche come le varie funzioni regolative siano interconnesse. La deregolazione di questa via potrebbe essere legata a forme neoplastiche, nelle quali tali geni risultano espressi a livelli insolitamente alti, sia nel sistema neurale che in quello ematopoietico. Di particolare rilevanza sarà l'analisi dei livelli di espressione di oncogeni o oncosoppressori nelle cellule tumorali in risposta alle variazioni dei geni suddetti.

Trasferibilità dei risultati

I prodotti dell'espressione dei geni HOX e i miR sono implicati in processi biologici fondamentali, come morfogenesi, proliferazione, differenziamento cellulare. La loro disregolazione è stata legata a svariate forme di neoplasie, malformazioni e patologie varie. La conoscenza dei loro meccanismi di azione è importante per la comprensione dei processi biologici fondamentali che controllano questi fenomeni e di conseguenza per l'individuazione di possibili interventi per la loro cura. In particolare la conoscenza del meccanismo molecolare mediante il quale un tipo cellulare differenzia verso cellule mature in condizioni fisiologiche potrebbe essere di grande importanza nella identificazione di terapie tendenti al trattamento delle forme neoplastiche dello stesso tipo cellulare.

Studio dell'asse SDF-1/CXCR4 nel *lineage* megacariocitario di pazienti affetti da sindromi mieloproliferative (SMP) *Philadelphia negative* (Ph-)

Le SMP Ph- comprendono: Mielofibrosi Primitiva (MFP), Policitemia Vera (PV), Trombocitosi Essenziale (TE). Sono causate dalla trasformazione della cellula staminale (HSC) o progenitrice (HPC) emopoietica, con conseguente proliferazione clonale di uno o più *lineage* mieloidi. L'eziopatogenesi di alcune forme di SMP è stata in parte chiarita con la scoperta di diverse mutazioni somatiche. Più recentemente è stata osservata un'alterata regolazione dell'asse SDF-1/CXCR4 in pazienti con MFP. SDF-1 è una chemochina stromale coinvolta nei processi di migrazione cellulare; l'interazione col suo recettore CXCR4, espresso su HSC e HPC, è d'importanza cruciale nella mobilitazione delle cellule staminali durante l'embriogenesi e nella loro colonizzazione delle nicchie midollari; SDF-1 è inoltre capace di aumentare i livelli di ploidizzazione dei megacariociti (MK) e favorirne la migrazione transendoteliale, svolgendo un ruolo primario nel rilascio di piastrine in circolo. Ciò lascerebbe supporre che l'asse SDF-1/CXCR4 possa essere coinvolto nell'insorgenza delle anomalie clonali nel *lineage* MK osservato nei pazienti con TE.

Il progetto propone lo studio del sistema SDF-1/CXCR4 e dell'espressione di CXCR4 su cellule CD34+ e del *lineage* MK di soggetti affetti da SMP, attraverso saggi *in vitro* di espansione, differenziazione, migrazione, caratterizzazione fenotipica e genotipica, e *in vivo* su modelli murini NOD/SCID, utilizzando i protocolli già in uso nella nostra pratica sperimentale.

Risultati attesi nel triennio

Comprensione dei meccanismi cellulari *in vitro* dell'interazione SDF-1/CXCR4 nella megacario-trombocitopoiesi patologica e sue implicazioni nell'eziopatogenesi delle SMP, con particolare riferimento alla TE e alla PV.

Definizione dell'espressione genica del CXCR4 e dell'SDF-1 (mRNA e proteine) delle cellule coltivate *in vitro*.

Ottimizzazione dei protocolli di studio *in vitro* della capacità di migrazione dei MK normali e patologici attraverso cellule endoteliali e identificazione di fattori di attivazione o inibizione di tale processo.

Sviluppo di un modello *in vivo* per l'identificazione delle *tumor initiating cell* e lo studio della cinetica di ripopolamento del midollo osseo, della mobilitazione e del rilascio in circolo di piastrine e valutazione della loro integrità e funzionalità.

Valutazione dell'espressione e della funzionalità del recettore CXCR4, dell'espressione del gene CXCR4 nelle piastrine rilasciate *in vivo* e dei livelli di SDF-1 nel periferico e nel midollo murino.

Trasferibilità dei risultati

Le SMP Ph- sono patologie ad andamento cronico e con una frequente evoluzione in leucemia acuta, che si accompagnano spesso a complicazioni ematologiche e sistemiche di grado anche severo. Il trattamento prevede l'uso di farmaci citostatici e/o citotossici o di procedure meccaniche di rimozione delle abnormi masse cellulari circolanti (salassi, citoaferesi).

Lo studio dei meccanismi cellulari e molecolari nella regolazione dell'asse SDF-1/CXCR4 nel *lineage* MK può condurre ad una maggiore comprensione dell'eziopatogenesi delle SMP e all'individuazione di fattori esogeni o endogeni predisponenti o determinanti la malattia, rappresentando un importante strumento per l'implementazione di metodi diagnostici più specifici e sensibili, per la prevenzione delle complicanze ematologiche e oncologiche, e per lo sviluppo di terapie più efficaci e meno invasive e tossiche di quelle attualmente adottate.

Studio dell'espressione e della funzione del recettore CXCR4 e della sua regolazione tramite miR-146a nelle cellule leucemiche e tumorali

Il recettore per chemokine CXCR4 e il suo ligando SDF-1 (*stromal derived factor 1*) sono coinvolti nella regolazione del fenomeno di *homing* e di mobilitazione delle cellule normali e leucemiche e nella formazione delle metastasi. CXCR4 è espresso ad un livello alto in diversi tipi di tumori e nelle leucemie, in particolare nelle leucemie mieloidi acute (AML), dove questa sovraespressione rappresenta un fattore di prognosi negativo per queste patologie.

Recentemente abbiamo dimostrato che CXCR4 è un gene bersaglio del microRNA-146a (miR-146a). Abbiamo identificato un nuovo meccanismo di regolazione del CXCR4 nella megacariopoiesi che coinvolge il fattore di trascrizione PLZF, miR-146a e CXCR4. In questo meccanismo la repressione esercitata da PLZF sull'espressione del miR-146a provoca l'attivazione della traduzione del CXCR4.

CXCR4 è un potenziale bersaglio terapeutico e dunque la scoperta di inibitori dell'asse CXCR4/SDF-1 e/o del CXCR4 rappresenta un obiettivo importante della farmacologia molecolare. Nell'ottica di verificare la capacità dei microRNA e anti-microRNA di esercitare un'azione effettiva *in vivo*, è importante capire se il recettore CXCR4 è regolato dal miR-146a in diverse tipi di anomalie ematologiche, in particolare nelle AML, ma anche nelle neoplasie solide.

Inoltre, il ruolo funzionale che svolge il recettore CXCR4 nella sopravvivenza, la proliferazione e la chemioresistenza delle cellule tumorali può essere approfondito attraverso l'uso di diversi metodi che ne modulino l'espressione e di conseguenza le funzioni, utilizzando: i) dei inibitori del recettore CXCR4 come l'AMD3100; ii) il miR-146a, in quanto la sua sovraespressione potrebbe abbassare l'espressione del CXCR4.

Il trattamento con il miR-146a in associazione con una chemioterapia standard rappresenta un approccio promettente per sviluppare studi, *in vitro* e *in vivo*, anti-tumorali e potrebbero fornire nuovi strumenti per stimolare l'*engraftment* (l'attecchimento) dopo un trapianto di midollo o un trattamento terapeutico con agenti mobilizzanti delle cellule.

Nel contesto dei tumori solidi, è noto che l'espressione e la funzione biologica del CXCR4 viene attivata dall'ipossia, un fenomeno correlato all'espansione delle metastasi. Questa attivazione del CXCR4 è direttamente collegata ad una prognosi negativa per i tumori solidi ma anche, secondo studi recenti, per le AML. Analizzeremo dunque, l'espressione del fattore PLZF, miR-146a e del suo bersaglio CXCR4, nella risposta all'ipossia per capire se un basso tasso di ossigenazione rappresenta una variabile critica nella regolazione del CXCR4 attraverso l'asse PLZF/miR-146a/CXCR4 recentemente identificato, nelle cellule leucemiche e tumorali.

Gli obiettivi di questo progetto triennale sono:

- Identificare e analizzare i meccanismi molecolari responsabili della sovraespressione del CXCR4 che abbiamo osservato in qualche leucemia primaria di tipo AML e in linee tumorali dell'ovaio e della mammella in esperimenti preliminari, con l'obiettivo specifico di capire il ruolo svolto dall'asse PLZF/miR-146a/CXCR4 in questo fenomeno.
- Studiare i meccanismi di regolazione del miR-146a stesso, per valutarne e saggiarne l'utilizzo, tramite la sua sovraespressione, per abbassare il livello di espressione del CXCR4 nelle leucemie e nei tumori solidi, prima in modelli *in vitro* poi *in vivo*.
- Analizzare un possibile ruolo dell'ipossia nella modulazione dell'asse regolatore PLZF/miR-146a/CXCR4 poiché l'ipossia è un fenomeno che si osserva nei tessuti tumorali ed è responsabile della sovraespressione del CXCR4.
- Studiare una possibile regolazione trascrizionale del miR-146a come quella identificata con PLZF, un repressore del miR-146a, per identificare eventuali oncogeni coinvolti nella regolazione del miR-146a e dunque di conseguenza del CXCR4, e capire se tali oncogeni possono rappresentare potenziali bersagli terapeutici.

Risultati attesi nel triennio

I nostri studi sulla regolazione del CXCR4 da parte del miR-146a nelle linee cellulari e nelle cellule leucemiche/tumorali primarie sono indispensabili per caratterizzare la funzione del CXCR4 e il suo ruolo: i) nei meccanismi di mobilizzazione delle cellule normali e tumorali; ii) nella formazione delle metastasi, e per valutare se l'uso del miR-146a, da solo o insieme ad altri inibitori del CXCR4, rappresenta un valido "agente" terapeutico da utilizzare per diminuire l'espressione del CXCR4 nelle cellule tumorali, in particolare nelle cellule leucemiche isolate da AML e nelle cellule tumorali primarie isolate da tumori dell'ovaio e della mammella.

Trasferibilità dei risultati

Caratterizzare la regolazione del recettore CXCR4 tramite miR-146a nelle leucemie di tipo AML ma anche nelle neoplasie solide positive per CXCR4, come il tumore dell'ovaio e della mammella, e convalidare o meno l'uso del miR-146a come agente "anti-tumorale" da utilizzare per disegnare strategie terapeutiche nella patologia delle leucemie e dei tumori solidi.

La verifica della validità dei nostri risultati potrà essere effettuata secondo criteri e indicatori specifici come l'*impact factor* della rivista in cui verranno pubblicati i dati e il confronto con la letteratura scientifica nazionale ed internazionale.

Studio dell'effetto proapoptotico di triterpeni sintetici su cellule di tumori solidi

Lo scopo principale del presente progetto consiste nello studio degli effetti antitumorali di alcuni triterpeni (CDDO, CDDO-Im, CDDO-Me e Lupeolo). I triterpenoidi sono composti abbondantemente presenti nel mondo vegetale e molti di questi composti esplicano una forte azione antitumorale e per questo motivo sono oggetto di studi da parte della comunità scientifica. Studi precedenti condotti nel nostro laboratorio hanno mostrato uno spiccato effetto antitumorale *in vitro* del CDDO-Im nelle leucemia acute mieloidi e nel carcinoma dell'ovaio. Questi studi ci hanno portato ad ipotizzare che gli effetti antitumorali del CDDO-Im possano essere mediati attraverso un'inibizione di STAT-3, una molecola implicata nella trasduzione del segnale e nell'attivazione di *pathway* anti-apoptotici. Nel presente studio proponiamo di estendere i nostri studi a livello del carcinoma della prostata utilizzando una serie di linee cellulari tumorali e cellule tumorali primarie. Gli obiettivi principali del progetto sono i seguenti: i) valutare la sensibilità delle cellule di carcinoma prostatico ai triterpenoidi; ii) determinare il meccanismo d'azione dell'effetto pro-apoptotico dei triterpenoidi; iii) valutare il ruolo dell'inibizione di STAT-3 mediata dai triterpenoidi nel meccanismo d'azione antitumorale; iv) valutare il ruolo dell'attivazione costitutiva di STAT-3 nella progressione del carcinoma prostatico.

Risultati attesi nel triennio

Gli studi *in vitro* saranno effettuati su un'ampia gamma di linee cellulari: cellule normali di epitelio prostatico immortalizzate; linee di adenoma prostatico; linee di carcinoma prostatico con differente potenziale metastatizzante *in vivo* nel topo e con differente dipendenza dagli androgeni. Queste varie linee saranno studiate per quanto riguarda l'attivazione costitutiva di STAT-3 tramite anticorpi specifici anti-STAT-3 fosforilato e la sensibilità all'azione pro-apoptotica dei triterpeni. Esperimenti di biochimica verranno effettuati per determinare i meccanismi responsabili dell'induzione della morte cellulare da triterpeni, con particolare enfasi allo studio della caspasi-8, c-FLIP e STAT-3. In parallelo, verrà valutata l'espressione di STAT-3 costitutivamente fosforilato tramite immunostochimica in un'ampia batteria di carcinomi della prostata di vario grado e, in alcuni casi, verrà valutata la sensibilità di cellule tumorali primarie ai vari triterpeni. In una fase successiva verranno allestiti dei modelli *in vivo* di carcinoma prostatico tramite xenotrapianto di cellule tumorali in topi immunodeficienti e in questi modelli verrà valutato l'effetto antitumorale *in vivo* dei triterpenoidi.

Trasferibilità dei risultati

I risultati originati nel presente progetto di ricerca hanno delle ricadute potenziali a livello dello sviluppo di nuovi approcci terapeutici per il trattamento del carcinoma prostatico. Infatti, sia il CDDO-Im che il CDDO-Me, sono in corso di sperimentazione nell'ambito di studi clinici di fase I e i risultati del nostro progetto potrebbero costituire la base preclinica per supportare la sperimentazione clinica dei triterpenoidi nel trattamento del carcinoma della prostata.

Studio di mimetici di Smac Diablo come possibili agenti anti-tumorali

Le cellule tumorali presentano una aumentata resistenza agli stimoli apoptotici, fenomeno che ne determina un'aumentata sopravvivenza. Una possibile strategia dei tumori consiste nell'utilizzo o di agenti che inibiscono molecole ad azione anti-apoptotica (ad es. Bcl-2) o che mimano l'effetto di molecole ad azione pro-apoptotica. Un esempio di quest'ultime molecole è rappresentato da mimetici di Smac/Diablo, un inibitore di proteine ad azione anti-apoptotica. In precedenza noi abbiamo studiato un peptide mimetico di Smac/Diablo e abbiamo dimostrato che questo composto aggiunto insieme a TRAIL induce apoptosi di cellule di carcinoma ovarico. Nel presente progetto proponiamo di valutare l'effetto di un nuovo composto, LBW242, un composto mimetico di Smac/Diablo. In particolare proponiamo di: i) valutare l'effetto di questo composto su cellule di carcinoma ovarico chemiosensibili o chemioresistenti ai derivati del platino o del taxolo; ii) determinare il meccanismo d'azione anti-apoptotica di questo composto; iii) valutare l'effetto di questo composto in associazione con TRAIL o con chemioterapici anti-tumorali.

Risultati attesi nel triennio

Studi preliminari condotti presso il nostro laboratorio hanno indicato che il composto LBW242 è in grado d'indurre *killing* di cellule di carcinoma ovarico, incluse linee cellulari chemioresistenti e cellule primarie tumorali, in particolare quando aggiunto insieme a TRAIL. Utilizzando alcune di queste linee cellulari è ora di fondamentale importanza analizzare i meccanismi molecolari dell'azione pro-apoptotica di LBW242 e, in particolare, noi proponiamo di determinare se questo composto induce degradazione di c-IAP1 e c-IAP2 tramite autoubiquitinazione, neutralizza l'attività biologica di XIAP e sensibilizza le cellule a TNF-alfa e TRAIL. In particolare verranno effettuati esperimenti specifici miranti a valutare il meccanismo attraverso il quale LBW242 induce attivazione della caspasi-8, se quest'attivazione è regolata da c-IAP-1/2 e/o da c-FLIP. In parallelo, verranno effettuati esperimenti miranti a valutare un possibile sinergismo anti-tumorale fra LBW242 e alcuni chemioterapici anti-tumorali (derivati del platino e del taxolo). Infine, viene previsto lo sviluppo di modelli animali miranti a definire condizioni potenzialmente poi trasferibili in clinica. Quest'ultima parte del progetto si avvale di una collaborazione con la Novartis che detiene il brevetto e produce il composto LBW242. Infine, in questa sezione del progetto verrà utilizzato un derivato dell'LBW242, più potente e più adatto per studi *in vivo*.

Trasferibilità dei risultati

È atteso che gli studi proposti possano portare a definire la sensibilità delle cellule di carcinoma ovarico al mimetico di Smac/Diablo LBW242 e quindi a gettare le basi per un possibile uso clinico sperimentale di questo composto, per il quale è programmata una sperimentazione di fase I da parte della Ditta Novartis.

Studio e caratterizzazione di fattori proteici e di *pathway* molecolari correlati ai processi angiogenici e in particolare allo sviluppo e progressione di patologie umane come cancro, diabete mellito e malattie vascolari, utilizzando le recenti innovazioni che derivano dall'uso delle tecniche di proteomica, micro-RNA, cellule staminali e tecniche di bioinformatica

La regolazione della crescita cellulare e dell'angiogenesi è un campo di estremo interesse nella ricerca bio-medica. 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 e altre patologie in cui l'angiogenesi svolge un ruolo determinante, come il diabete mellito e le patologie ischemiche. A tal fine, si utilizzeranno le tecniche di spettrometria di massa e di cromatografia ed elettroforesi mono- e bi-dimensionale, che consentiranno anche di mettere a punto un Servizio di Analisi Proteomica.

La disponibilità di modelli animali e di cellule staminali e le nuove tecniche per modulare l'espressione di specifici segnali molecolari, consentiranno di analizzare il ruolo di specifici fattori coinvolti nei meccanismi dell'angiogenesi, per es. i fattori di crescita FGF, VEGF, PDGF, HGF, EGF e NGF. Infatti, tali fattori sono considerati elementi importanti nell'insorgenza ed evoluzione di patologie umane come il cancro, il diabete mellito e le malattie ischemiche. In particolare, oltre ad uno studio mirato su citochine e fattori di crescita, si procederà allo studio sistematico dell'intero proteoma, sfruttando le tecniche della siero- e fosfo-proteomica e all'utilizzo di cellule staminali, micro-RNA, modelli animali e banche di campioni biologici da pazienti (tessuti, sieri, vitreo, *liquor* cefalorachidiano) e della bioinformatica. Questi studi consentiranno di identificare nuovi meccanismi patogenetici e profili diagnostici potenzialmente utili anche per mettere a punto nuovi approcci terapeutici.

Risultati attesi nel triennio

- Pubblicazione dei risultati su riviste internazionali.
- Identificazione di nuove vie metaboliche, molecole e meccanismi patogenetici coinvolti nel cancro e nelle patologie vascolari.
- Messa a punto di nuove metodiche utili per diagnostica avanzata.
- Disegno di nuovi protocolli diagnostici e approcci terapeutici.
- Acquisizione in Italia di specifici *know-how* tecnologici da università e istituti esteri.
- 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 al Servizio Sanitario Nazionale dei risultati delle ricerche in oggetto.

Studio *in vitro* dell'influenza esercitata dal microambiente tumorale nella risposta di sferoidi tumorali multicellulari a trattamenti con agenti antineoplastici

Il microambiente tumorale, in particolare la matrice extracellulare (ECM), gioca un ruolo critico nella risposta tumorale ai trattamenti con agenti antineoplastici (radiazioni ionizzanti, RI, e farmaci antitumorali). Nella maggior parte degli studi condotti *in vitro* sugli effetti di tali trattamenti sono stati utilizzati *monolayer* cellulari, nei quali l'architettura spaziale del tumore *in vivo* e le sue interazioni con il microambiente sono sottovalutate. Un modello sperimentale alternativo è rappresentato dagli sferoidi tumorali multicellulari poiché, essendo in essi le cellule disposte in un contesto spaziale tridimensionale, presentano proprietà strutturali, proliferative e metaboliche simili a quelle dei tumori solidi avascolari *in vivo*. L'obiettivo di questa ricerca è quello di valutare *in vitro* l'influenza esercitata dalla ECM nella risposta di sferoidi tumorali di diverso istotipo a differenti dosi di RI e a varie sostanze antineoplastiche di

sintesi e naturali. Con lo scopo di ricreare *in vitro* ancora più strettamente l'eterogeneità del microambiente tumorale, gli stessi studi verranno anche condotti avvalendosi di co-culture realizzate con sferoidi tumorali e fibroblasti umani primari. L'influenza del microambiente nella risposta degli sferoidi ai trattamenti verrà anche stabilita mediante lo studio del coinvolgimento delle vescicole esosomali. Contestualmente verranno condotti studi di metabolomica mediante Risonanza Magnetica Nucleare ad alta risoluzione (1H-NMR).

Risultati attesi nel triennio

L'adesione degli sferoidi ai diversi substrati della ECM potrebbe influenzare l'entità e il tipo di morte cellulare (apoptosi, necrosi e catastrofe mitotica) indotto dai trattamenti con le RI e le sostanze antineoplastiche di sintesi e naturali. L'influenza esercitata dall'adesione alla ECM verrà stabilita grazie al confronto con sferoidi sottoposti agli stessi trattamenti e lasciati in sospensione nel mezzo di coltura. Per questi studi verranno utilizzati approcci metodologici di indagine classici. L'eventuale modulazione qualitativa e quantitativa di differenti molecole di adesione cellulare potrebbe essere uno dei fattori che contribuiscono a differenziare il tipo di risposta ai vari microambienti degli sferoidi esposti ai trattamenti descritti. I *monolayer* di fibroblasti umani primari, sui quali verranno fatti aderire gli sferoidi (co-culture), dovrebbero influenzare in maniera più marcata il tipo e l'entità della risposta ai vari trattamenti, fornendo un quadro ancora più realistico dell'influenza esercitata dall'eterogeneità microambientale. In tale contesto, verrà anche esaminata l'influenza che esosomi isolati dagli sferoidi potrebbero avere nella risposta ai differenti microambienti. Le misure di 1H-NMR forniranno spettri differenziati e tipici per ognuno dei trattamenti. Ciò permetterà di ottenere un quadro metabolomico caratteristico della risposta degli sferoidi ai vari microambienti.

Trasferibilità dei risultati

L'attività di ricerca di questo progetto è rivolta al miglioramento della comprensione dei meccanismi alla base dell'influenza esercitata dal microambiente nella risposta dei tumori ai trattamenti antitumorali. L'utilizzo degli sferoidi tumorali per studiare l'influenza del microambiente tumorale sulla risposta alle RI e ai farmaci antitumorali è un approccio sperimentale utile per predire in maniera più realistica l'efficacia dei trattamenti antineoplastici in vivo e ottimizzarne i protocolli.

Studio sulla fisiopatologia delle malattie lisosomi ali e su nuovi approcci terapeutici per il trattamento

Scopo della nostra ricerca è quello di chiarire i meccanismi biochimici e molecolari alla base di due malattie neurodegenerative ereditarie, la malattia di Gaucher e la leucodistrofia metacromatica.

La malattia di Gaucher è causata da mutazioni della glucosilceramidasi (GCasi) o del suo attivatore proteico, la saposina C. Due sono le mutazioni più comuni della GCasi: la N370S e la L444P. I pazienti omozigoti per la mutazione N370S in genere presentano la forma viscerale (tipo 1), mentre il genotipo L444P è correlato ad una forma più grave della malattia con coinvolgimento nervoso (tipo 2 e tipo 3). Forme neurologiche della malattia possono essere dovute anche a deficit di Sap C. Intendiamo studiare l'effetto della mutazione L444P e del deficit di Sap C per determinare quali fattori siano alla base della patogenesi con danno neuronale. Inizialmente utilizzeremo come modello cellulare fibroblasti di pazienti Gaucher che presentano le mutazioni investigate. In seguito è ipotizzabile l'uso di cellule pluripotenti indotte differenziate in cellule neuronali.

Per la malattia di Gaucher il trattamento che ha dato finora i migliori risultati è la terapia enzimatica sostitutiva (ERT). Tale cura migliora i sintomi clinici viscerali, ma non raggiunge il cervello. Per questo motivo intendiamo preparare liposomi per incorporare e stabilizzare

l'enzima esogeno e per veicolarlo alle cellule bersaglio, i macrofagi, ma soprattutto per indirizzarlo al cervello. È stato infatti riportato che alcuni tipi di liposomi, a differenza dell'enzima libero, riescono a passare la barriera emato-encefalica.

La leucodistrofia metacromatica è causata da deficit dell'arilsolfatasi A (ASA) o del suo attivatore la saposina B (Sap B). Tutti i pazienti presentano coinvolgimento nervoso in quanto il lipide non idrolizzato, il sulfatide, si accumula soprattutto nella materia bianca del sistema nervoso centrale e nei nervi periferici. Intendiamo analizzare cellule provenienti da pazienti con deficit di Sap B per capire a quale stadio viene bloccata la formazione della saposina e quali sono le alterazioni a livello cellulare. Poiché la Sap B è l'attivatore e stabilizzatore dell'ASA, verificheremo inoltre se le proprietà della saposina possano essere sfruttate per stabilizzare e attivare l'enzima da utilizzare per l'ERT nei pazienti affetti da leucodistrofia metacromatica.

Risultati attesi nel triennio

I nostri studi ci permetteranno di raggiungere i seguenti obiettivi:

- comprensione delle basi biochimiche e molecolari della malattia di Gaucher correlata alla mutazione L444P del gene della GCasi o a mutazioni del gene della prosaposina relative alla regione che codifica per la Sap C;
- comprensione delle basi biochimiche e molecolari della leucodistrofia metacromatica correlata a specifiche mutazioni del gene della prosaposina relative alla regione che codifica per la Sap B;
- miglioramento della terapia enzimatica sostitutiva sia per la malattia di Gaucher che per la leucodistrofia metacromatica.

Trasferibilità dei risultati

La comprensione dei meccanismi che alterano il metabolismo degli sfingolipidi, in particolare del glucosilceramide nella malattia di Gaucher e del sulfatide nella leucodistrofia metacromatica, permetterà di applicare le nostre conoscenze ad altre malattie neurodegenerative a base genetica. I risultati ottenuti potranno essere anche utilizzati per sviluppare nuovi approcci terapeutici.

Infine l'utilizzo di liposomi come trasportatori dell'enzima mancante nella terapia enzimatica sostitutiva permetterà un trattamento più efficiente, meno costoso e che forse permetterà di curare anche il danno neuronale.

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 Agenzia Italiana del Farmaco e Centro nazionale per la ricerca e la valutazione dei prodotti immunobiologici dell'ISS. Le ispezioni sono volte alla verifica della conformità ai principi delle norme di Buona Pratica di Fabbricazione (*Good Manufacturing Practice – GMP*). In relazione a questa attività, tre persone del Dipartimento sono inserite nella lista di ispettori nazionali e svolgono in media 12 ispezioni annue ciascuno, in siti di produzione di sostanze farmacologicamente attive e di prodotti medicinali. Una quarta persona svolge ispezioni principalmente presso officine di produzione di medicinali emoderivati in qualità di esperto. Recentemente è stata arruolata una nuova unità in qualità di osservatore per ispezioni ai siti di produzione di sostanze farmacologicamente attive e di prodotti medicinali. Tutti gli ispettori/esperti partecipano periodicamente a corsi di aggiornamento specifici.

Piano triennale

Si prevede il proseguimento di questa attività anche per il triennio 2009-2011.

Autorizzazioni in deroga riguardanti la sperimentazione animale

Su richiesta del Servizio 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 del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, 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.

Piano triennale

Nel triennio 2006-2008 sono stati emessi pareri su una media di circa 40 protocolli per anno. In vista delle nuove normative che la Comunità Europea ha annunciato di voler emettere nel corso del 2009, si prevede che il numero di protocolli soggetti ad approvazione da parte del Ministero sia destinato ad aumentare. È da attendersi quindi un aumento del numero di pareri richiesti al Dipartimento dal SSA.

Controllo di Stato degli emoderivati (*Batch release*)

Il DM del 31 marzo 2008 (GU n. 90 del 16/04/2008) 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 ribadito, come già definito dal DM 22/04/1996, che sono sottoposti a Controllo di Stato, lotto per lotto, i medicinali immunologici e i medicinali derivati da sangue o da plasma umani in applicazione degli articoli 138 e 139 del DL 219 del 24/04/2006. In qualità di "*Official Medicines Control Laboratory (OMCL)*" per l'Italia, l'ISS, e in particolare il Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare 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 nella Comunità Europea i processi di controllo, l'EDQM ha elaborato una linea guida "*EC Administrative Procedure for Official Control Authority Batch Release*" nel quale si ribadisce, tra l'altro, il principio del mutuo riconoscimento del certificato di *Batch release* rilasciato in ambito europeo da uno Stato membro da parte di un altro Stato membro senza la possibilità di ripetere saggi sul lotto in questione già esaminato. Come previsto dal DM 31 marzo 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. In accordo a quanto previsto dalla *EC Administrative Procedure* il Dipartimento ha 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”, ed 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.

Piano triennale

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 e verrà introdotto il controllo dell’emoderivato colla di fibrina.

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 18/05/2001 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) Accertamenti preventivi in previsione di interventi di trapianto di midollo osseo, fecondazione assistita o trattamenti farmacologici. Iii) 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 spettrina dopo digestione triptica.

Piano triennale

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.

Pareri sulla sicurezza e qualità di emoderivati

Sulla base della Legge n. 219 del 21/10/2005 “Nuova disciplina delle attività trasfusionali e della produzione nazionale degli emoderivati” e del DM 31 marzo 2008 (GU n. 90 del 16/04/2008) 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 di EOMM, Laboratorio ufficiale per il controllo degli emoderivati, 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.

Piano triennale

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 specialità medicinali a base di emoderivati (come principi attivi o eccipienti) e commercializzate sul territorio nazionale, devono presentare il documento di *Plasma Master File* (PMF) e i successivi documenti di aggiornamento. La Società titolare di AIC di specialità medicinali a base di emoderivati presenta la richiesta di approvazione del dossier di PMF all'EMA e allo Stato (*Reference Member State*) che è stato designato dall'EMA stesso 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 annualmente di un *Assessment Report* che valuti tutti gli aggiornamenti presenti nel dossier di PMF. Tale attività ha il rispetto di una *time table* molto rigorosa con il fine ultimo del certificato di *plasma Master File* rilasciato dall'EMA. Una volta ottenuta la certificazione EMA le Società titolari di AIC di specialità medicinali a base di emoderivati devono presentare domanda di *Second Step* nei Paesi dove commercializzano le specialità medicinali per le quali il PMF si applica. L'ISS su richiesta dell'AIFA valuta sistematicamente la documentazione tecnica di *Second Step* al fine dell'integrazione del dossier di PMF aggiornato sulle specialità medicinali che presentano un'autorizzazione all'immissione in commercio in Italia.

Piano triennale

Verranno redatti su richiesta dell'EMA gli *Assessment Report* al fine del rilascio del certificato EMA per il PMF esaminato e verrà esaminata, per l'approvazione, la documentazione relativa alla procedura europea di *Second Step* del dossier di *Plasma Master File*. Tale approvazione deve essere rilasciata dal Paese dove la ditta produttrice dell'emoderivato commercializza il medicinale a cui si riferisce il PMF.

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

L'attività consiste nella valutazione ed emissione di parere tecnico-scientifico in base alle informazioni contenute nei dossier presentati per l'approvazione della commercializzazione di prodotti medicinali emoderivati. L'attività si estende anche alla valutazione ai fini dell'approvazione di variazioni delle condizioni dell'autorizzazione all'immissione in commercio. Le consulenze delle attività sopra citate sono rivolte essenzialmente all'AIFA, che, in base al decreto legislativo del 24 aprile 2006, n. 219, trasmette la richiesta di parere all'ISS. Il numero medio di pareri totali è di circa 60 l'anno.

Piano triennale

Tutte le attività suddette proseguiranno per il prossimo triennio. Parte di tali attività rientrerà in quelle previste dalla Convenzione tra ISS-Dipartimento EOMM 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 dicembre 2007 n. 51.

L'attività comprende anche la valutazione della qualità e sicurezza pre-clinica 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 Farmaco 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.

Piano triennale

Le attività suddette proseguiranno per il triennio 2009-2011.

**Dipartimento
Farmaco**

Attività di ricerca

Aspetti fisiopatologici e approcci terapeutici innovativi nel trattamento del dolore acuto e cronico

Il progetto si propone di studiare i meccanismi, e i sistemi endogeni implicati nella genesi di sindromi algiche, allo scopo di individuare alternative terapeutiche nel controllo del dolore acuto e cronico. In Europa il dolore cronico e ricorrente rappresenta un problema sanitario specifico e una patologia di per sé. Sebbene l'eziopatogenesi di alcune sindromi algiche sia ancora poco nota, nuove conoscenze scientifiche hanno condotto ad una continua evoluzione e a miglioramenti nella terapia del dolore. Tuttavia, l'evidenza che gli antinfiammatori e gli analgesici oppiacei inducono effetti indesiderati talvolta anche gravi, rappresenta ancora un fattore limitante il loro impiego terapeutico e incoraggiano la ricerca pre-clinica all'identificazione di nuovi target terapeutici. È stato suggerito che alterazioni funzionali nei sistemi endogeni di controllo della nocicezione siano implicate, per esempio, nella patogenesi dell'emicrania e delle neuropatie, sindromi algiche resistenti al trattamento con antinfiammatori o analgesici oppiacei. È noto che i sistemi peptidergici della nocicettina/recettore NOP, dei cannabinoidi/recettori CB1 e CB2, e probabilmente dei peptidi formilati/recettori FPR, sono coinvolti nella modulazione del dolore e dell'infiammazione.

Sulla base di tali evidenze gli obiettivi del progetto saranno:

– Studio 1

I meccanismi neurobiologici di controllo del dolore e dell'insorgenza della tolleranza analgesica: ruolo modulatore dei sistemi endogeni della nocicettina/recettore NOP e dei cannabinoidi recettori CB1/CB2. È stato evidenziato che i sistemi della nocicettina/recettore NOP e dei cannabinoidi/recettori CB1, CB2 modulano numerose funzioni fisiologiche (Calò, *et al.* 2000; Pacher, *et al.* 2006). La nocicettina e i cannabinoidi sono implicati nel controllo di funzioni endocrine, cardiovascolari, intestinali così come nel controllo della percezione dolorosa, dell'epilessia, dell'ansia e della depressione (Mogil e Pasternak, 2001; Pacher, *et al.* 2006; Chiou, *et al.* 2007). In particolare, la nocicettina o l'antagonista del recettore NOP, UFP-101 e gli agonisti dei recettori dei cannabinoidi inducono analgesia in modelli sperimentali di dolore acuto e prolungato. Inoltre, la nocicettina e il cannabidiolo mostrano proprietà ansiolitiche e anticonvulsivanti, mentre l'UFP-101 ha effetti antidepressivi. Alla luce di tali evidenze saranno studiati: i) gli effetti analgesici/antinfiammatori, antiepilettici e ansiolitici indotti dalla somministrazione singola o ripetuta di agonisti e antagonisti del recettore NOP ([Arg14, Lys15] nociceptin; NNC63-0532, UFP-101, JTC 801) e dei recettori CB1/CB2 dei cannabinoidi (ACEA, ACPA, WIN 55,212-2, oleamide, palmitoiletanolamide, AM 251) in modelli sperimentali di dolore (*formalin test*, artrite da diuvante di Freund, neuropatia, cefalea), convulsioni e ansia. Saranno inoltre studiati gli effetti indotti dai composti sul rilascio di sostanza P, glutammato, GABA, interleuchine, TNF α , nei perfusati o in fettine di midollo con tecniche biochimiche e immunochimiche. Il coinvolgimento di potenziali disfunzioni mitocondriali nella genesi di sindromi algiche sarà verificato valutando con la tecnica dell'*imaging* le possibili alterazioni nella catena di trasporto degli elettroni e la capacità dei singoli composti di inibire le disfunzioni mitocondriali.

– Studio 2

Ruolo dei recettori FPR nel controllo della nocicezione a base infiammatoria.

Recenti lavori sottolineano la stretta correlazione tra leucociti, sistema immunitario e dolore cronico su base infiammatoria. In particolare l'fMLF, nuovi ligandi dei recettori FPR, altri peptidi derivati dal virus HIV, e peptidi amiloidi implicati nella patogenesi dell'Alzheimer (Le, *et al.* 2002) attivano almeno tre tipi di recettori FPR espressi nei

neutrofili e nei monociti, modulando la chemiotassi. L'elevata espressione di questi recettori in epatociti e, soprattutto, in cellule di microglia o in cellule dendritiche indicano un loro coinvolgimento nella eziologia di diverse patologie. Recentemente è stato evidenziato in modelli animali di dolore infiammatorio che la stimolazione dei recettori FPR è in grado di ridurre la risposta nocicettiva (Pieretti, *et al.* 2004). A partire da tali evidenze il nostro progetto ha lo scopo di studiare: i) il ruolo dei recettori FPR nella nocicezione in animali KO per i recettori FPR e FPR-L1 in collaborazione con il *William Harvey Research Institute* di Londra; ii) in collaborazione con l'Università di Firenze e del *National Centre for Drug Screening* di Shanghai le proprietà antinocicettive/antinfiammatorie e gli eventuali effetti indesiderati indotti dal trattamento acuto e cronico con nuovi agonisti/antagonisti non peptidici dei recettori FPR, in modelli sperimentali di dolore-infiammazione acuti e cronici.

– Studio 3

Studi sperimentali e clinici sull'origine della cefalea: nuove strategie di diagnosi e di terapia. L'emicrania è una complessa patologia neurologica caratterizzata da forte cefalea ricorrente con sintomi a carico del sistema vegetativo e sensoriale. L'emicrania ha origine eterogenea e multifattoriale e si sviluppa con meccanismi fisiopatologici ancora poco chiari. La cefalea propria insorge per attivazione di fibre sensoriali trigeminali che trasducono stimoli generati da molecole liberate dal tessuto meningeo in segnali algogeni inviati al cervello. Il dolore emicranico è tipicamente associato a grande ipersensibilità a vari stimoli sensoriali da cui viene esacerbato. Come in molti altri casi di dolore cronico, si instaura un processo di sensibilizzazione delle fibre sensoriali, la cui soglia di attivazione viene abbassata, come dimostrato da diversi studi, per cambiamenti molecolari nelle proteine di membrana neuronali ligandi di agenti algogeni. In questo processo meccanismi infiammatori sembrano giocare un ruolo rilevante, come dimostrato da analisi di metaboliti plasmatici specifici effettuate all'inizio dell'attacco emicranico. La tipica ciclicità degli attacchi pone peraltro il quesito se esista una persistente modifica tissutale meningea che faciliti l'insorgenza della cefalea. Il progetto propone di studiare: i) i processi molecolari della sensibilizzazione neuronale prodotta da metaboliti infiammatori rilasciati durante l'emicrania; ii) individuare possibili strategie terapeutiche per normalizzare l'iperattività sensoriale. Per comprendere le cause della sensibilizzazione neuronale, sarà necessario rivelare le molecole implicate, i loro diversi effetti e tempi di azione sui neuroni trigeminali. A tale fine *biomarker* plasmatici identificati in pazienti cefalalgici saranno studiati per la loro attività sulla sensibilizzazione trigeminale in modelli animali *in vivo* e *in vitro*. Quale modello sperimentale saranno usati neuroni trigeminali di topo impiegando moderne tecnologie elettrofisiologiche e molecolari per analizzare le conseguenze di stimoli chimici tipici del dolore cronico/infiammatorio e per testare l'azione di farmaci mirati a bloccarne l'azione. L'uso di modelli comportamentali animali permetterà di validare i dati ottenuti *in vitro* e permetterà di valutare nuove entità chimiche potenzialmente utili a prevenire, bloccare o revertire la sensibilizzazione trigeminale.

ACC2 – Programma 2 del Programma Straordinario di Ricerca Oncologica 2006
Progetto: Rete nazionale sui modelli sperimentali e *facilities* animali

Favorire l'aggregazione di giovani ricercatori in ambiente scientifico ottimale che li focalizzi nei settori biomedici rappresentato dalla conoscenza delle problematiche precliniche finalizzate alle applicazioni cliniche.

Attivare connessioni strategiche operative con il mondo dell'industria biomedica e affrontare i quesiti della ricerca clinica per apportare le migliori soluzioni scientifiche.

Sviluppare un processo dinamico di formazione avanzata, anche mediante le sinergie con progetti di ricerca per l'ideazione, la prototipizzazione, lo sviluppo e la diffusione di nuove strumentazioni biomediche sempre più all'avanguardia.

Studiare le procedure e i materiali innovativi che ne ottimizzino l'uso in base alla messa a disposizione di nuovi modelli animali di patologie (modelli xenraft, modelli di metastasi, modelli di carcinogenesi, modelli geneticamente modificati) a beneficio del paziente, implementando altresì tecniche di *on the job training* sulle risorse umane coinvolte.

Posizionarsi come un'efficace risorsa interdisciplinare e nazionale per la valutazione tecnologica delle strumentazioni biomediche che fanno uso di metodiche e di nuovi materiali, per la diagnosi e la terapia.

Risultati attesi nel triennio

Realizzazione della rete italiana in Medicina Sperimentale Preclinica.

Realizzazione di una rete di livello nazionale e internazionale di eccellenza specializzata sulle tecnologie applicate ai modelli animali per la salute umana.

Crescita scientifica e aumento delle opportunità di lavoro qualificato sul territorio nazionale.

Miglioramento della qualità della cura e della tutela della salute dei cittadini.

Incentivo per aziende interessate ad investire nell'ambito della rete.

Aumento della domanda di ricerca industriale per effetto dell'intreccio virtuoso fra ricerca di base e ricerca applicata.

Trasferibilità dei risultati

Poter usufruire di modelli pre-clinici è elemento chiave nella lotta contro il cancro. I modelli pre-clinici sono utili sia nella verifica di nuove terapie anti-tumorali, sia sperimentazione *in vitro* e *in vivo* di nuove ipotesi patogenetiche. I modelli sinora utilizzati si avvalgono sia di linee tumorali umane di vario istotipo sia di modelli *in vivo* costituiti per lo più o da topi immunodeficienti (SCID) trapiantati con cellule tumorali umane sia da topi transgenici e *knockout*.

In Italia non esiste a tutt'oggi una rete fra i centri di ricerca che consenta di utilizzare i vari modelli nella maniera più proficua. Mancano inoltre in Italia, ma anche nel resto dei Paesi europei, delle indicazioni ufficiali su quali siano i modelli pre-clinici più credibili fra quelli esistenti.

Si rende quindi necessaria una razionalizzazione e organizzazione delle risorse nazionali in questo ambito.

ACC3 – Programma 3 del Programma Straordinario di ricerca Oncologica 2006 Progetto: Identificazione di marcatori per la predizione della risposta a nuovi farmaci antitumorali (inibitori di HDAC, tirosino chinasi e pompe ioniche)

Fra i meccanismi che condizionano stabilmente il microambiente tumorale vi sono l'alterazione dei gradienti di pH e il continuo rilascio di microvescicole a contenuto acido. Entrambi i fenomeni sono di recente stati proposti come meccanismi chiave sia nella progressione tumorale sia nei fenomeni di resistenza e di non risposta ai farmaci citotossici.

Il presente progetto propone: i) un approfondimento dei meccanismi molecolari legati alle V-ATPasi H⁺ e cellulari responsabili della morte apoptotica in seguito a trattamento con PPI in tumori solidi come melanomi e colon-carcinomi, analizzando anche l'effetto di tale trattamento sul traffico vescicolare e ii) la promozione di studi clinici di fase II basati sul trattamento dei tumori solidi con PPI. Il progetto propone anche la messa a punto un test fluorimetrico di trasporto protonico e di tecniche di spettroscopia di risonanza magnetica per la valutazione dell'attività inibitoria dei PPI sulle V-ATPasi tumorali e per l'analisi della selettiva localizzazione cellulare delle V-ATPasi in relazione al grado di malignità. Inoltre, parte del

progetto si occuperà di verificare quale fra le varie subunità delle V-ATPasi può rappresentare il miglior target per terapie più squisitamente molecolari.

Risultati attesi nel triennio

Definire i meccanismi molecolari legati alle VATPasi H⁺ e cellulari responsabili della morte cellulare indotta da PPI in vari tipi di tumore umano. Arrivare ad ottenere l'approvazione di protocolli clinici per studi di fase II basati nei quali venga testata la potenziale efficacia dei PPI nel trattamento dei tumori solidi. Ci si aspetta inoltre di acquisire risultati pre-clinici che supportino l'uso di metodiche, basate su tecniche di spettroscopia di risonanza magnetica, in grado di misurare il pH dei tessuti *in vivo*, allo scopo di valutare il pH tumorale in seguito a trattamento con PPI. La parte più rivolta al futuro del progetto potrà fornire almeno dati preliminari dell'analisi strutturale delle pompe protoniche espresse dai tumori. In particolare ci si aspetta di acquisire informazioni sul livello di espressione nei tumori umani delle varie subunità delle V-ATPasi. Questo allo scopo di costruire un background sperimentale per l'ideazione e la sintesi di nuovi farmaci specificamente targettati alle VATPasi tumorali.

Trasferibilità dei risultati

L'ottenimento dei dati menzionati precedentemente sarà di grande importanza per meglio definire la terapia anti-tumorale basata sull'uso di alti dosaggi di inibitori di pompa protonica. Si fa presente quanto la fase clinica di questo progetto sia in realtà iniziata con studi di fase II mirati a testare nei pazienti con tumore l'effetto chemosensibilizzante dei PPI. Questo studio creerà i presupposti per studi clinici basati sull'effetto antineoplastico di alte dosi di PPI.

Analisi chimiche quali-quantitative e valutazioni farmaco tossicologiche su nuove sostanze ad azione anabolizzante in collaborazione con i nuclei anti sofisticazioni dell'arma dei carabinieri (NAS)

Sebbene il doping sia un fenomeno ampiamente dimostrato, gli unici risultati certi relativi a tale fenomeno sono quelli riportati dalla Commissione per la vigilanza e il controllo sul doping e per la tutela della salute nelle attività sportive (CVD) che si riferiscono esclusivamente ad atleti tesserati appartenenti alle varie Federazioni. Rilevazioni recenti dimostrano tuttavia come il fenomeno coinvolga non solo lo sport di vertice, ma anche i cosiddetti "sportivi della domenica" cioè quelli che praticano sport a livello amatoriale frequentando le palestre. Poiché il doping rappresenta una costante minaccia alla salute di coloro che praticano attività sportiva, gli obiettivi principali della ricerca sono:

- Analisi dei campioni sequestrati dai Nuclei Anti Sofisticazioni dell'Arma dei Carabinieri delle varie provincie italiane e inviati all'ISS.
- Validazione (secondo le linee guida internazionali dell'FDA) di tecniche di separazione in cromatografia liquida e gas cromatografia accoppiate a tecniche di rivelazione in spettrometria di massa e spettrometria di massa tandem per la quantificazione delle nuove sostanze presenti nei campioni sequestrati.
- Analisi dei campioni sottoposti a sequestro. I principi attivi di tali prodotti verranno analizzati utilizzando metodologie di separazione in cromatografia liquida e gas cromatografia accoppiate a tecniche di rivelazione in spettrometria di massa e spettrometria di massa tandem.
- Produzione di Report per CVD, NAS e autorità sanitarie.

Risultati attesi nel triennio

- Acquisizione di una più profonda conoscenza delle varie sostanze illecite presenti sul mercato al fine di creare un Laboratorio di Riferimento per il controllo e le analisi delle varie sostanze sottoposte a sequestro.

- Stabilire una rete di collaborazione con Laboratori e Forze dell'Ordine con l'obiettivo di sviluppare in modo coordinato un'attività di ricerca e controllo delle sostanze (anche di nuova concezione) che possono apparire sul mercato caratterizzando dal punto di vista farmacotossicologico i componenti di interesse doping o comunque pericolosi per la salute di quanti praticano attività sportiva e controllare, in accordo con i NAS, la rete di vendita attraverso i canali Internet dei prodotti.
- Potenziare l'attività dei NAS mediante l'aggiornamento del personale specializzato in grado di contrastare l'aumento del fenomeno doping.

Trasferibilità dei risultati

I risultati saranno oggetto di pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali, in modo da renderli accessibili alla comunità scientifica. Saranno poi oggetto di Report utilizzati dalla Commissione per la vigilanza e il controllo sul doping e per la tutela della salute nelle attività sportive (CVD). Inoltre tali risultati potranno essere utilizzati dalla Commissione per i propri compiti istituzionali: si ritiene infatti che uno studio sui diversi principi attivi, conosciuti e non, presenti nei prodotti sequestrati dalla Forze dell'ordine possa fornire maggior chiarezza e permettere un monitoraggio più esteso del fenomeno doping.

Approcci innovativi nello studio dell'induzione /riparazione del danno ossidativo del DNA in modelli di malattie neurodegenerative: basi molecolari e identificazione di possibili target terapeutici

Lo scopo del progetto è verificare se la modulazione di specifici meccanismi di induzione, prevenzione e riparazione del danno ossidativo del DNA possa rappresentare un approccio neuroprotettivo. A tale scopo sarà intrapreso uno studio multidisciplinare che coinvolgerà vari gruppi e utilizzerà nuovi modelli di animali transgenici e opportune metodologie. Le specifiche finalità del progetto sono: i) verificare se, in modelli sperimentali di malattie neurodegenerative, topi e/o preparazioni cellulari overesprimenti l'idrolasi hMTH1 (un enzima che previene l'incorporazione delle purine ossidate nel DNA) sono meno vulnerabili a stimoli tossici; ii) misurare possibili variazioni nell'espressione di hMTH1 in modelli di neurodegenerazione (trattamenti con diverse neurotossine; topi transgenici per malattie neurodegenerative); iii) verificare se l'overespressione di hMTH1 attenua l'espressione del fenotipo neurologico in modelli *in vivo* di malattie neurodegenerative. A tale scopo provvederemo a generare topi doppi transgenici incrociando i nostri topi transgenici hMTH1 con topi R6/2, transgenici per la malattia di Huntington. In questi topi doppi transgenici sarà valutato se il fenotipo comportamentale e i principali *marker* della malattia risultino attenuati e/o ritardati nella loro comparsa rispetto al controllo (singolo transgenico R6/2); iv) valutare l'influenza dell'overespressione sul processo di attivazione microgliale indotta attraverso differenti meccanismi di neurotossicità; v) caratterizzare a livello molecolare i modelli citati attraverso lo studio dei possibili targets molecolari dell'ossidazione, la valutazione delle alterazioni nell'organizzazione del citoscheletro, e lo studio delle interazioni tra proteine *scaffold-adaptor* e i loro partner associati; vi) chiarire se uno dei principali meccanismi di riparazione del DNA, riparazione per escissione di basi (BER), svolge un ruolo funzionale nella patogenesi del danno neuronale in modelli sperimentali di malattie neurodegenerative.

Il punto di forza dello studio consiste soprattutto nella disponibilità di modelli originali e nell'integrazione di molteplici competenze. In particolare, la stretta cooperazione tra gruppi con un solido background nello studio del danno e riparazione del DNA e gruppi con una valida e riconosciuta esperienza in modelli *in vivo* e *in vitro* di neurodegenerazione, rappresenta un importante valore aggiunto del progetto.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto permetterà di chiarire le basi molecolari dei meccanismi recentemente identificati di neuroprotezione basati sull'aumentata espressione dell'idrolasi hMTH1. In particolare l'approccio proposto permetterà di identificare la capacità di hMTH1 di proteggere il genoma mitocondriale contro il danno ossidativo del DNA, definire il livello di protezione fornito dall'overespressione contro il danno letale, ed identificare le proteine ossidate in specifici compartimenti intracellulari. Tutti questi studi potranno permettere una migliore comprensione dei meccanismi molecolari alla base della protezione fornita da MTH1 contro la neurodegenerazione.

Trasferibilità dei risultati

Dal momento che questo è un progetto di ricerca di base, la sua rilevanza per la salute pubblica non risulta essere immediata. Tuttavia esso potrà contribuire alla comprensione dei meccanismi attraverso i quali il danno ossidativo del DNA può intervenire nella neurodegenerazione e quindi rappresentare un possibile *target* per la neuroprotezione.

Sebbene considerazioni di carattere clinico siano premature, i risultati di questo progetto potrebbero aprire nuove prospettive per lo sviluppo di strategie neuroprotettive. Considerando che le malattie neurodegenerative sono malattie gravi, spesso invalidanti e generalmente intrattabili, la ricerca di nuovi, efficienti approcci terapeutici sono estremamente rilevanti per la salute pubblica.

Associazione tra fattori di virulenza batterici e cancro coloretale

Il cancro del colon è una delle forme più comuni di cancro ed è importante trovare metodi di screening che permettano di 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 dal CNF1 di *E. coli* implicato nella protezione dall'apoptosi, nell'attivazione di NF-kB e nell'alterazione del ciclo cellulare e da altri fattori in grado di causare danni al DNA e di bloccare il ciclo cellulare come il Cif (Fattore Inibente il Ciclo) e la CDT (Tossina Citoletale *Distending*) e un prodotto dell'isola genomica pks. Anche la tossina del *B. fragilis* BFT, attivando fattori coinvolti nella proliferazione, rappresenta un ipotetico fattore di rischio tumorale.

La ricerca si propone di verificare la presenza del gene per tali fattori di virulenza nei polipi coloretali a diversi stadi della malattia. Verrà isolato il DNA dalla biopsia e tramite PCR verrà analizzata la presenza dei geni per tali fattori. Poiché la formazione di tumori è correlata ai microRNA, in quei polipi risultati positivi per almeno un fattore di virulenza verrà analizzato il profilo di espressione di tali RNA e l'attivazione di NF-kB.

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 un'associazione significativa tra i fattori di virulenza all'esame e lo sviluppo e la progressione della malattia. Inoltre, poiché c'è una stretta relazione fra l'attivazione di NF-kB e i processi infiammatori cronici, come anche tra il profilo di espressione dei microRNA e lo sviluppo tumorale, ci attendiamo di trovare una correlazione tra la presenza dei fattori di virulenza in esame e la presenza di un particolare profilo molecolare in termini di microRNA e di NF-kB.

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 della loro distribuzione. Inoltre, l'identificazione di profili di espressione di microRNA e la correlazione della presenza di fattori di virulenza con l'attivazione di NF- κ B in polipi a grado di malignità diversa, può contribuire a identificare nuovi *marker* diagnostici precoci e ad aprire prospettive per lo sviluppo di nuove strategie preventive contro tali tipi di tumori.

Attività di contrasto alla contraffazione farmaceutica: i) Sviluppo di metodi analitici e loro applicazione ii) Screening della contraffazione farmaceutica in internet iii) Formazione e informazione sul fenomeno

Che cosa si conosce già sull'argomento.

Il fenomeno della contraffazione farmaceutica ha avuto negli ultimi anni un andamento esponenzialmente crescente, rappresentando un grave problema di salute pubblica. La contraffazione può riguardare sia prodotti sotto brevetto che prodotti generici e può presentarsi in diverse forme: perfetta imitazione di medicinali registrati; farmaci contenenti quantità inferiore di principio attivo o di bassa qualità; farmaci senza principio attivo; farmaci contenenti sostanze diverse da quelle dichiarate e/o sostanze tossiche. Un medicinale contraffatto costituisce un grave rischio per la salute: per la potenziale inefficacia terapeutica legata all'assenza dell'appropriato principio attivo nella giusta quantità; per l'insorgenza di resistenze, nel caso degli antibatterici; per la possibile tossicità legata alla scarsa qualità delle materie prime e al mancato rispetto delle *Good Manufacturing Practice* (GMP) durante il processo produttivo.

Nei Paesi industrializzati la contraffazione farmaceutica riguarda soprattutto farmaci nuovi e costosi, i cosiddetti *life-style product* (anabolizzanti, prodotti contro l'impotenza, alcuni glucocorticoidi, anoressizzanti e alcuni psicotropici). Tali prodotti contraffatti sono spesso commercializzati illegalmente nei negozi etnici, nelle palestre, nei sexy-shop e attraverso internet.

I punti principali delle attività di contrasto alla lotta alla contraffazione farmaceutica, individuati sia dalla WHO che dal Consiglio d'Europa, sono lo sviluppo di strategie nazionali, regionali e internazionali per la valutazione dell'entità del fenomeno, l'informazione sul tema ai cittadini e a tutti i livelli del Servizio Sanitario mediante campagne efficaci di comunicazione sulla contraffazione e lo sviluppo di competenze tecniche e metodi analitici per l'analisi di campioni potenzialmente contraffatti. Il Consiglio d'Europa ha individuato nel modello dello SPOC nazionale (*Single Point of Contact*) la strategia per una lotta efficace contro la contraffazione farmaceutica. In Italia lo SPOC è il Gruppo di lavoro sui farmaci contraffatti, istituito con Determinazione AIFA del 4 aprile 2007 (denominato IMPACT-Italia nel 2008) che è attualmente costituito da membri delle istituzioni che si occupano del fenomeno (l'AIFA, il Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, l'ISS, i Carabinieri NAS, il Ministero dell'Interno, l'Agenzia delle Dogane).

Il presente progetto di ricerca triennale intende continuare le attività di contrasto al fenomeno della contraffazione farmaceutica che l'ISS (Dipartimento del Farmaco) ha già intrapreso e implementarle nel triennio 2009-2011 anche come membro di IMPACT-Italia.

Attività del progetto

– Sviluppo di metodi cromatografici di screening

Negli ultimi anni sono stati riscontrati sul territorio nazionale (sequestri dei Carabinieri NAS e della GdF) ed europeo (*Rapid Alert*) numerosi casi di vendita illegale di creme e gel *for export only*, cioè prodotti in Europa per l'esportazione in Africa, a base di glucocorticoidi (clobetasolo, betametasone, desametasone, fluocinonide, ecc.).

Questi farmaci e i loro contraffatti sono importati e venduti illegalmente in Italia presso negozi etnici come cosmetici ad azione sbiancante per la pelle. Sempre più frequentemente l'ISS è coinvolto da parte delle autorità competenti (Procure della Repubblica, AIFA) per l'analisi di questi campioni e la verifica della loro possibile contraffazione. I metodi ufficiali di farmacopea per i prodotti finiti (metodi USP e BP) sono complessi, spesso obsoleti e propongono metodi analitici differenti per i diversi principi attivi. Il progetto prevede lo sviluppo di metodi cromatografici per lo screening rapido di questi prodotti, in grado di identificare e dosare più principi attivi contemporaneamente o principi attivi diversi estratti da differenti matrici.

- Applicazioni innovative di metodi chimico-fisici e tecnologici allo studio di medicinali contraffatti

Saranno sviluppate applicazioni innovative di metodi chimico-fisici, quali la risonanza magnetica nucleare (NMR), la spettroscopia infrarossa (IR), l'analisi termica (DSC e TGA), la microscopia ottica e la densitometria e di metodi di tecnologia farmaceutica (test di dissoluzione) per l'individuazione dei casi di presunta contraffazione di principi attivi (presenza di sostanze non dichiarate) ed eccipienti.

- Screening su campioni acquistati in internet per la valutazione della qualità dei prodotti e l'individuazione di farmaci contraffatti

La vendita in internet di medicinali sta diventando un pericoloso canale di smercio di farmaci contraffatti. Un primo studio pilota condotto dall'ISS (in collaborazione con l'AIFA, i Carabinieri NAS e l'Istituto Mario Negri, sotto l'egida della WHO) nel 2008 su farmaci contro l'impotenza e anabolizzanti ha evidenziato che il 74% dei farmaci pervenuti erano copie illegali, senza autorizzazione all'immissione in commercio in Italia e il 21% erano farmaci contraffatti, ovvero farmaci che non contenevano il principio attivo, oppure che contenevano un principio attivo diverso dal dichiarato e, comunque, potenzialmente pericolosi per la salute. Nella seconda fase dello studio saranno prese in considerazione nuove tipologie di farmaci e saranno messe a punto metodiche per l'identificazione di casi di contraffazione più "raffinata".

- Formazione e informazione sul fenomeno

L'informazione e la comunicazione del rischio di acquisto di farmaci da canali illegali (palestre, internet, afro-shop, sexy-shop) è un aspetto cruciale per prevenire e contrastare il fenomeno. A questo scopo sarà sviluppato un sito web di informazione al pubblico sia sul fenomeno della contraffazione farmaceutica sia sui rischi associati all'acquisto di medicinali da canali non autorizzati.

Altre attività di formazione e informazione saranno effettuate mediante seminari e pubblicazioni divulgative sul fenomeno.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto fornirà:

- nuovi strumenti analitici (metodi analitici convalidati e applicazioni innovative di metodi chimico-fisici) esportabili in laboratori nazionali ed extranazionali, per la lotta alla contraffazione farmaceutica;
- valutazione del rischio associato all'acquisto di farmaci online;
- campagna di informazione al pubblico con creazione di un sito web;
- pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali e rapporti interni.

Trasferibilità dei risultati

- Impiego dei metodi analitici sviluppati da laboratori di controllo nazionali ed extranazionali.
- Raccolta di dati che saranno utilizzati per la campagna d'informazione sul fenomeno.

Attività di supporto regolatorio, revisione dello scenario normativo regolatorio nazionale ed europeo e realizzazione di *Consensus document* e *Conference*

Durante lo sviluppo di un nuovo prodotto terapeutico gli aspetti di preparazione e i risultati degli studi preclinici devono essere forniti all'Autorità Regolatoria per ottenere l'autorizzazione alla sperimentazione clinica.

La Direttiva europea 2001/20/EC, recepita in Italia con il DL.vo 211/2003, sancisce che nessuna sperimentazione, ad eccezione di quella non interventistica (studi osservazionali) è esclusa dalle norme di buona pratica regolatoria, vale a dire dai principi delle buone pratiche di fabbricazione, di laboratorio e cliniche (GMP, GLP e GCP).

Pertanto la conoscenza delle basi legali e delle linee guida che attualmente regolano il processo autorizzativo risulta fondamentale, soprattutto per sponsor non industriali, rappresentando un supporto indispensabile per la sottomissione delle richieste di autorizzazione alla conduzione di studi clinici, in particolare di fase I (FTIH).

Queste richieste, infatti, se non gestite correttamente, possono rallentare lo sviluppo di prodotti non industriali derivati da indagini di ricercatori indipendenti, essendo tale attività condotta in strutture ospedaliere e cliniche universitarie, in cui la gestione dell'incrementato carico regolatorio post Direttiva europea, può risultare problematica anche a causa della mancanza di esperti di aspetti regolatori.

Si rende di conseguenza necessario:

- fornire un'attività mirata in modo specifico a coprire la carenza di esperienza regolatoria del mondo accademico e ospedaliero;
- diffondere queste informazioni per consentire un dialogo e una più rapida interazione fra ricercatori clinici e autorità regolatorie per affrontare nel modo migliore possibile l'aspetto della riduzione dei tempi della ricerca translazionale e consentire un più rapido trasferimento dei risultati di laboratorio al letto del malato, senza influenzare la sicurezza del paziente.

Risultati attesi nel triennio

- Creazione di un coordinamento informativo centrale per sponsor non industriali, mediante l'istituzione di un gruppo di lavoro, con il compito di raccolta codificata della documentazione normativa (leggi e decreti) che ha un impatto sulle autorizzazioni di studi clinici con bioterapie antitumorali.
- Censimento delle linee guida già emanate dall'agenzia europea del farmaco (EMA), e da altre agenzie internazionali (FDA), al fine di evidenziarne esclusivamente gli aspetti che specificamente si applicano alle bioterapie.
- Rendere disponibili le suddette documentazioni mediante pubblicazione di rapporti informativi aggiornati e/o documenti tecnici scaricabili dal web in collaborazione con altre unità del progetto.
- Organizzazione di workshop formativi dedicati a personale di strutture di ricerca non industriali, riguardanti specificamente aspetti regolatori.
- Organizzazione di riunioni periodiche fra ricercatori ed esperti regolatori volti anche all'elaborazione di documenti condivisi.
- Organizzazione di una Conferenza conclusiva, con elaborazione di un *Consensus Document* finale, contenente la raccolta della documentazione normativa esistente, la eventuale revisione delle linee guida non cliniche già emanate che si applicano alle bioterapie, ed eventuali nuove proposte operative di linee guida dedicate.

Trasferibilità dei risultati

Diffondere le conoscenze sul corrente stato dell'arte regolatorio e normativo relativo alle autorizzazioni di *trial* clinici e fornire le basi, per esperti regolatori, nell'ambito di strutture di

ricerca non industriali, al fine di accelerare le procedure per l'accesso alla sperimentazione clinica delle bioterapie antitumorali.

CHEMORES – Molecular mechanism underlying chemotherapy resistance, therapeutic escape, efficacy and toxicity

Definire le migliori condizioni per una piena attivazione dei PPI *in vitro* e *in vivo*. Ciò includerà anche esperimenti con lo scopo di stabilire l'abilità di differenti tipi istologici di tumori umani di acidificare i loro microambienti. Esperimenti preliminari hanno mostrato che i linfomi B acidificano il mezzo di coltura meno che i melanomi e alcuni carcinomi. Questo progetto vuole estendere gli esperimenti di dose-risposta sia *in vitro* che *in vivo* e verificare anche se le dosi effettive dei PPI possono cambiare in funzione dell'istologia del tumore. L'ipotesi è di fornire informazioni pre-cliniche utili per definire la dose dei PPI per ottenere un controllo ottimale del pH del microambiente tumorale specifico del tumore e del paziente. Il progetto investigherà l'effetto del trattamento dei PPI sul traffico di vescicole acide nelle cellule tumorali. Questi studi includeranno anche l'analisi dell'effetto dei PPI nell'inibizione del fenomeno di rilascio delle vescicole acide, come anche il rilascio degli esosomi e il fenomeno del cannibalismo. Un'importante *goal* sarà identificare siti specifici d'interazione tra PPI e V-H⁺ ATPasi tumorali. Noi vogliamo anche esplorare nuove tecniche che possono essere d'aiuto nel trattare pazienti con tumore, come la Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) per misurare l'acidità tumorale *in vivo* prima e dopo il trattamento con i PPI, oppure l'uso di topi SCID inoculati sotto cute con cellule di melanoma umano. Tramite questo modello, il livello dell'acidità tumorale *in vivo*, sarà investigata per mezzo di sonde specifiche che una volta attivate, saranno rilevate mediante NMR. Se questi risultati saranno incoraggianti, potranno essere definiti studi clinici pilota sull'uso dei PPI in combinazione con il trattamento dei farmaci in pazienti con tumore. Infine, vogliamo verificare il livello di espressione e di attivazione di alcune pompe protoniche in tumori maligni, per ottenere nuovi bersagli genetici per possibili studi farmaco genomici.

Risultati attesi nel triennio

Il primo anno sarà impiegato per delineare il meccanismo alla base dell'effetto del trattamento con i PPI su cellule tumorali e definire le dosi necessarie per ottenere chemio-sensibilizzazione tumorale. La maggior parte degli esperimenti sarà eseguita su linee cellulari derivanti sia da melanomi primari che da lesioni metastatiche dei pazienti. Noi abbiamo la disponibilità di 60 linee cellulari di melanoma (48 metastatiche e 12 primarie). Comunque, verranno testate anche linee cellulari derivanti da tumore della mammella, colon carcinoma e carcinoma della prostata. In queste cellule tumorali, usando differenti metodologie, sarà valutato il pH extracellulare, intracellulare e la produzione di metaboliti. Nelle stesse cellule, mediante analisi al citofluorimetro, sarà esaminata anche l'interazione dei PPI con le V-ATPasi.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questo progetto potranno essere traslati su *trial* clinici con lo scopo di verificare l'effetto del trattamento dei PPI in pazienti con tumore. Infatti, due *trial* clinici sono iniziati in Italia su pazienti con melanoma e con osteosarcoma. Quindi, oltre a verificare l'efficacia del trattamento, verranno valutati nei pazienti trattati anche altri parametri come il livello di acidità tumorale e il livello plasmatico di vescicole acide rilasciate dai tumori.

Costituzione di un network collaborativo per l'ottimizzazione dei flussi informativi relativi ai prodotti delle medicine tradizionali utilizzati in Italia

I prodotti a base di “erbe” sono oggetto di valutazione da parte delle Autorità Sanitarie preposte a stabilirne la loro classificazione. La questione si rivela assai complessa, non tanto per una ristretta lista di piante, confinate al solo settore terapeutico e pertanto assoggettabili ai criteri previsti dalla normativa del settore farmaceutico (Dir. 2001/83/CE e Dir. 2004/24/CE), ma in riferimento a tutti gli altri prodotti (integratori alimentari, cosmetici, dispositivi medici) che seguono percorsi normativi di autorizzazione/etichettatura differenti anche se strettamente legati ai requisiti previsti dalla produzione in “qualità”.

Come Dipartimento del Farmaco dell'ISS siamo sempre più frequentemente chiamati ad esprimere pareri che consentano di escludere o accertare la pertinenza al mondo farmaceutico di prodotti di natura vegetale, fra i quali particolare importanza rivestono quelli provenienti dalle Medicine Tradizionali (MT), soprattutto cinese e indiana, e che, in considerazione dell'impiego sempre più diffuso, costituiscono un problema di grosso impatto sulla salute pubblica.

Un esempio frequente è la richiesta da parte dei NAS o magistratura di pareri su prodotti della MT liberamente venduti sul mercato italiano (erboristerie cinesi/ mercatini rionali/ internet).

La valutazione dell'impatto sulla salute pubblica di tali prodotti presenti sul mercato è, come detto precedentemente, complicata da un quadro normativo carente che non tiene conto della condizione *border line* esistente fra le varie tipologie di prodotti a base vegetale “autorizzabili” nelle rispettive categorie di appartenenza (integratori alimentari, dispositivi medici, cosmetici). È sempre più frequentemente richiesta la produzione di pareri sulla farmaco-tossicologia, sulle azioni metaboliche e in generale sulla sicurezza di tali prodotti. Quest'attività di valutazione/controllo ha bisogno di competenze trasversalmente cooperanti: dalla botanica alla fitochimica, farmacognosia, farmacologia, tossicologia, cosmesi, presenti nel nostro Istituto.

- Obiettivi:

Nell'ottica di organizzare una rete di collaborazione trasversale, sarebbe auspicabile censire per tipologia le attività dei vari gruppi coinvolti nel nostro Dipartimento in riferimento agli aspetti di controllo e valutazione dei prodotti delle varie MT e per i quali siamo chiamati a rispondere come ISS.

Obiettivo principale è quello di creare un database multidisciplinare per i prodotti appartenenti alla MT.

- Metodi:

- Realizzazione di un database su piattaforma web da parte dell'Unità Informatica del Dipartimento del Farmaco.
- Acquisizione dei dati attraverso la rete delle farmacie, delle erboristerie o da altre fonti che possano contribuire ad acquisire informazioni sui prodotti in questione.
- Verrà richiesta la collaborazione di strutture presenti all'interno dell'ISS: Farmacodipendenza, tossicodipendenza e doping (Farmaco), Centro nazionale Epidemiologia, sorveglianza e promozione della salute, Dipartimento Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Dipartimento Ambiente e connessa prevenzione primaria, Ufficio Relazioni Esterne.
- Verrà richiesta la collaborazione di strutture e figure professionali presenti all'esterno dell'ISS: Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, *European Food Safety Authority* (EFSA), AIFA, Forze dell'Ordine (Ministero Grazia e Giustizia, NAS, Finanza, Polizia), Università, CNR, Federfarma, esperti in MTC, Ayurveda, Fitoterapia.

Risultati attesi nel triennio

- Maggiore conoscenza della tipologia dei prodotti delle medicine tradizionali utilizzate all'interno del territorio italiano.
- Ottimizzazione della collaborazione dell'ISS con le forze dell'ordine nell'ambito dell'attività di controllo, peraltro già in atto.
- Collaborazione scientifica con altre strutture di ricerca, nazionali e internazionali.

Trasferibilità dei risultati

- Acquisizione di informazioni riguardo: la provenienza, la composizione, l'inquadramento tassonomico, i sinonimi, le classificazioni, il tipo di impiego, gli eventuali effetti collaterali, la valutazione del rischio nella popolazione pediatrica in gravidanza, i relativi elementi bibliografici, le notizie da Materie Mediche e in generale quante più conoscenze scientificamente attendibili sui prodotti della MT oggetto di valutazione.
- Acquisizione di documenti a supporto delle richieste di pareri di competenza e valutativi in ambito regolatorio (normative e documenti inerenti l'attività regolatoria, dossier informativi, resoconti dell'attività di controllo, bibliografie/dossier dei prodotti vegetali, Materia Medica Cinese e Ayurvedica, Farmacopea Europea, liste di sostanze particolarmente pericolose come ad esempio gli Alcaloidi, l'elenco delle sostanze che presentano interazioni con farmaci o che sono particolarmente pericolose in gravidanza).
- Facilitazione di scambi di informazioni tra l'ISS e le Strutture istituzionali e accademiche per approfondire conoscenze utili nell'ambito dell'attività di controllo e ricerca.

Definizione di biomarcatori predittivi delle complicanze cardiovascolari in soggetti diabetici e individuazione di nuovi bersagli terapeutici

Il diabete di tipo 2 (T2D) è caratterizzato da insulino-resistenza, deficit di secrezione di insulina con conseguente aumento della glicemia a cui si associano dislipidemia e ipertensione arteriosa con evoluzione verso arteriosclerosi e rischio d'infarto.

Nello stato infiammatorio cronico coinvolto nella patogenesi del T2D svolgono un ruolo gli adipociti del WAT, i macrofagi e PBMC che secernono mediatori pro-infiammatori, citochine (IL-1beta, TNF-alfa e IL-6), e adipochine (leptina, resistina, adiponectina, visfatina). La leptina è prodotta principalmente dagli adipociti e i suoi livelli plasmatici correlano con la massa corporea e aumentano con stimoli infiammatori quali IL-1, IL-6 e LPS. Abbiamo dimostrato che la leptina attiva le cellule dendritiche e aumenta la produzione di IL-6 e IL-1beta, responsabili del differenziamento dei Th17. I Th17 sono cellule infiammatorie che concorrono a mantenere lo stato infiammatorio nel diabete e nelle patologie cardiovascolari (CVD). Lo stato infiammatorio associato al T2D potrebbe essere dovuto alla disregolazione dei livelli di citochine e adipochine prodotte dal WAT che si ripercuote sul sistema immune, coinvolgendo i Th17.

Ci proponiamo di:

- studiare il ruolo predittivo delle adipochine nella progressione di T2D e CVD per individuare diversi profili di rischio;
- caratterizzare il profilo immunologico per individuare marcatori immunologici associati ai livelli di adipochine e alla progressione della T2D e CVD con particolare attenzione alle Th17 per individuare fattori di rischio/protezione nei confronti di un'evoluzione della patologia diabetica e della complicazioni cardiovascolari.

Risultati attesi nel triennio

In questo progetto ci proponiamo di studiare le adipochine sotto due punti di vista:

- Il loro ruolo predittivo a lungo termine nella progressione del diabete e del danno cardiovascolare, al fine di individuare diversi profili di rischio cardiovascolare nel diabete tipo 2.

Tale obiettivo si realizzerà attraverso l'adozione di protocolli di caratterizzazione fenotipica, per definire sottogruppi omogenei di soggetti all'interno di due popolazioni che saranno seguite nel tempo: una popolazione di diabetici suddivisi in obesi e non obesi e un campione della popolazione generale di soggetti non diabetici, obesi o non obesi. Questi soggetti verranno valutati a livello fenotipico, clinico e biochimico e verrà valutata la progressione del danno vascolare.

Questo al fine di definire le complesse relazioni tra caratteristiche fenotipiche, parametri clinici e biochimici di rischio cardiovascolare, e valutare quindi l'impatto dei diversi fenotipi del diabete tipo 2 sul profilo di rischio cardiovascolare, e valutare il ruolo delle adipochine nel determinare i vari gradi di rischio cardiovascolare.

- Gli stessi soggetti 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 sia della patologia diabetica che delle complicazioni cardiovascolari.

In particolare vorremmo studiare l'effetto delle adipochine sulle popolazioni immuni e valutare l'effetto della leptina nell'induzione dei Th17 che potrebbero concorrere allo stato infiammatorio associato al T2D, all'obesità e all'aterosclerosi.

Trasferibilità dei risultati

L'incidenza del T2D è in continuo aumento nel mondo, ed è destinato a diventare un problema sempre più importante per la salute pubblica. Inoltre l'età di insorgenza del diabete tipo 2 si è ridotta e la sua prevalenza sta aumentando anche in giovane età (sotto i 30 anni) e nei bambini.

Questo progetto potrebbe fornire una nuova base di conoscenze per individualizzare e quindi ottimizzare l'approccio clinico e terapeutico al paziente affetto da diabete tipo 2 con particolare riferimento all'obiettivo della riduzione del rischio cardiovascolare.

L'identificazione di soggetti con alto rischio di sviluppare eventi cardiovascolari acuti permetterebbe di focalizzare la terapia e gli interventi preventivi, con migliori risultati clinici e risparmio in termini economici.

Inoltre il nostro obiettivo è di identificare nuovi target clinici rilevanti per le terapie: la comprensione del ruolo delle adipochine 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.

Differenze di genere nella modulazione della reattività vascolare e loro influenza sulla patogenesi della vasculopatia diabetica

L'incidenza delle malattie cardiovascolari nelle donne in premenopausa è minore rispetto agli uomini di pari età, ma nelle donne diabetiche le complicanze vascolari hanno una prognosi peggiore che nell'uomo.

La compromissione della vasodilatazione endotelio-dipendente, con conseguente rimodellamento della parete vascolare in senso pro-aterosclerotico, costituisce l'alterazione principale della vasculopatia diabetica: uno sbilanciamento nella produzione/liberazione dei vari fattori endoteliali, in seguito a fenomeni infiammatori o stress ossidativo, potrebbe essere responsabile della maggiore disposizione delle donne alle complicanze vascolari.

L'osservazione clinica che trattamenti prolungati e/o elevati dosaggi di insulina, possono essere correlati ad aterosclerosi generalizzata, spingono a ricercare agenti farmacologici alternativi a basso profilo tossicologico.

Lo studio verrà condotto *in vitro* su segmenti arteriosi e venosi di conigli di entrambi i sessi.

In primo luogo saranno evidenziate e caratterizzate le differenze di genere per quanto riguarda gli effetti funzionali e la produzione dei fattori endoteliali in seguito alla attivazione della NOS costitutiva (mediante uso di neuromediatrici e autacoidi con attività endotelio-dipendente) e della NOS inducibile (mediante incubazione con citochine o LPS). Verranno eseguite misure quantitative dell'NO e dei prostanoidei (trombossano A2) prodotti in risposta a tali stimoli, verificando anche l'espressione degli enzimi responsabili della loro sintesi (NOS costitutiva e inducibile, cicloossigenasi). Gli esperimenti verranno condotti in parallelo su vasi incubati con un medium contenente diverse concentrazioni di glucosio.

Gli effetti del diabete conclamato verranno studiati su vasi provenienti da animali resi diabetici mediante allossana.

Risultati attesi nel triennio

- Dimostrazione che la motilità vascolare in risposta a stimoli fisiologici (neurotrasmettitori, agonisti endotelio dipendenti) o pro-infiammatori (citochine) viene modulata dall'endotelio mediante la liberazione di fattori vasoattivi qualitativamente/quantitativamente diversa nei due sessi.
- Determinazione nei due sessi dell'influenza di elevate concentrazione di glucosio sulla produzione dei fattori endoteliali.
- Messa a punto di un modello di diabete da allossana nel coniglio, con caratterizzazione delle risposte vascolari a stimoli endotelio-dipendenti.
- Ricerca di nuovi agenti farmacologici di origine vegetale a basso profilo tossicologico, e dimostrazione delle loro proprietà terapeutiche su modelli sperimentali precedentemente validati.

Trasferibilità dei risultati

- Messa in evidenza di differenze biologiche di genere in grado di fornire indicazioni sulla diversa evoluzione delle complicanze vascolari in diabetici dei due sessi.
- Indicazioni per una eventuale terapia differenziata in base al genere.
- Messa a punto di modelli preclinici da utilizzare in farmacologia previsionale.
- Individuazione di nuove sostanze farmacologicamente attive, di basso profilo tossicologico, da utilizzare in terapia.

Effetti immunomodulanti della proteina Nef di HIV-1

Il sistema immune mucosale gioca un ruolo chiave sia nella trasmissione dell'HIV che nella patogenesi dell'AIDS. Più dell'85% delle infezioni da HIV sono trasmesse per via mucosale e tutti gli stadi dell'infezione sono caratterizzati da difetti qualitativi e quantitativi dell'immunità mucosale. Le superfici mucosali del tratto gastrointestinale, anorettale e genitourinario sono la principale via di ingresso dell'HIV-1 nell'organismo. Le cellule epiteliali rappresentano la prima barriera che il virus incontra a livello mucosale e le alterazioni di tale barriera, a seguito di traumi o infezioni, accelerano la trasmissione del virus e l'istaurarsi di infezioni opportunistiche. In assenza di interruzioni delle superfici mucosali, il virus può penetrare nell'organismo sia in forma libera che in associazione a cellule mononucleate. Le particelle di HIV rilasciate possono infettare produttivamente i macrofagi o i linfociti intraepiteliali, favorendo così la diffusione dell'infezione. In seguito ad infezione o alterazioni dell'integrità della barriera i segnali che derivano dalle cellule epiteliali o dai microbi traslocati inducono uno

stato di infiammazione locale e sistemica, vengono rilasciate citochine e chemochine che richiamano monociti, linfociti B, neutrofilo e cellule dendritiche (DC).

Sulla base di queste premesse ci proponiamo di valutare l'effetto della proteina Nef ricombinante su cellule epiteliali. Questo può essere utile sia per definire il ruolo di Nef nella patogenesi dell'AIDS che nel disegno di vaccini preventivi o terapeutici contro l'HIV che potrebbero essere somministrati per via mucosale.

Risultati attesi nel triennio

Il presente progetto è finalizzato a definire l'effetto della proteina Nef ricombinante su cellule epiteliali. Lo studio prevede l'allestimento di sistemi *in vitro* che impiegano linee di cellule epiteliali di diversa origine (Hep2, T24, Caco2). Verrà valutato se Nef è in grado di modulare il rilascio di citochine pro-infiammatorie, contribuendo alle alterazioni della funzionalità intestinale tipiche dell'AIDS, e di chemochine che potrebbero richiamare DC o linfociti B. Valuteremo inoltre se Nef è in grado di modulare l'espressione di molecole di adesione o di co-recettori di HIV sulla superficie delle cellule epiteliali e i livelli di proliferazione/apoptosi. Inoltre, poiché le cellule epiteliali sono in stretto contatto con le DC a livello delle mucose intestinali, dove contribuiscono a mantenere un microambiente anti-infiammatorio e tollerogenico, verranno allestite co-culture di DC e cellule epiteliali, per valutare l'interferenza di Nef nel *cross-talk* DC/cellule epiteliali.

Nei diversi distretti mucosali analizzati Nef potrebbe aumentare l'istaurarsi di infezioni opportunistiche alterando la permeabilità e l'integrità della barriera epiteliale agendo quindi come fattore patogenico, attrarre neutrofilo e cellule del sistema immune responsabili del microambiente infiammatorio aumentando così la carica virale a livello delle secrezioni genitali e favorendo la trasmissione secondaria dell'HIV.

Trasferibilità dei risultati

Lo studio degli eventi che avvengono a livello dei siti mucosali è rilevante per la comprensione della patogenesi dell'AIDS (infezioni opportunistiche, attivazione immunitaria cronica, patologie intestinali) e per supportare la messa a punto di vaccini preventivi o terapeutici contro l'HIV da somministrare per via mucosale. L'impiego di opportuni modelli *in vitro* potrebbe consentire di saggiare l'efficacia e l'immunotossicità di farmaci di nuova generazione.

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 le cellule epiteliali. Questo, al fine di definire il ruolo della proteina Nef nell'immunopatogenesi dell'AIDS. 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.

Enantiomeri di inibitori della pompa protonica: separazione cromatografica su scala semipreparativa e attività antineoplastica

Gli Inibitori della Pompa Protonica (IPP) sono farmaci di recente scoperta, molto efficaci nella terapia di diverse patologie di interesse gastroenterologico, a causa della loro potente azione di riduzione della secrezione acida gastrica.

Nella pratica clinica, hanno largamente sostituito le molecole anti-H₂ nel trattamento delle ulcere, delle gastriti, delle esofagiti, della malattia da reflusso gastroesofageo e altre patologie acido-correlate. Sono oggi cinque gli IPP disponibili in Italia: il capostipite omeprazolo, il lansoprazolo, il pantoprazolo, il rabeprazolo e l'esomeprazolo.

Recentemente è stato avviato uno studio clinico coordinato dal gruppo scientifico del Dipartimento del Farmaco e in collaborazione con la Ditta farmaceutica AstraZeneca che ha come obiettivo principale quello di verificare la dose di PPI più efficace nel rendere i melanomi,

che sono tra i tumori più resistenti alle terapie convenzionali, suscettibili al trattamento con alcuni chemioterapici. Le ragioni dell'ipotesi sull'attività antitumorale degli antiacidi sta nel fatto che i PPI necessitano di un ambiente acido per essere trasformati nel farmaco attivo. È quindi evidente che in condizioni normali lo stomaco sia l'unico sito del nostro corpo nel quale questi farmaci possono essere attivati, essendo gli altri tessuti a pH mediamente neutro. Nei pazienti con tumore, tuttavia, poiché anche il tumore è acido, è possibile attivare i PPI, suggerendo un'estrema selettività di questa classe di farmaci proprio per l'ambiente tumorale. L'inibizione delle pompe protoniche cellulari, chiamate ATPasi vacuolari porta al blocco del meccanismo di acidificazione e quindi alla rimozione di uno dei fattori che impedisce al farmaco antitumorale di entrare (ed agire) all'interno del bersaglio biologico. Parallelamente, si stanno effettuando una serie di studi preclinici allo scopo di verificare alcune ipotesi sull'uso degli inibitori della pompa protonica come farmaci antineoplastici.

Gli IPP sono chirali (il centro stereogenico è rappresentato dall'atomo di zolfo del gruppo solfossido) e possono esistere nella forma racemica (miscela equimolare dei due enantiomeri) o sotto forma di due enantiomeri con configurazione assoluta opposta (R o S).

Ad eccezione dell'esomeprazolo, enantiomero con configurazione assoluta (S) dell'omeprazolo, gli IPP sono venduti in forma racemica.

L'interazione di un farmaco chirale con il suo bersaglio biologico è fortemente dipendente dalla stereochimica cioè dalla disposizione tridimensionale dei gruppi chimici che la determinano. Qualsiasi sistema biologico ospita molecole chirali (proteine, enzimi, zuccheri, acidi nucleici) che possono interagire con i costituenti enantiomerici di un farmaco chirale in modo differente. Nella valutazione dell'azione biologica di un farmaco con centri stereogenici è quindi di fondamentale importanza impiegare separatamente in saggi *in vivo* e *in vitro* i singoli enantiomeri. È evidente d'altra parte, che l'applicazione di farmaci enantiomericamente puri impone una serie di operazioni aggiuntive legate alla chiralità. In particolare risulta stringente mettere a punto metodiche per isolare forme enantiomeriche con elevato grado di purezza ottica e protocolli adatti per lo studio dei loro profili farmacocinetici e farmacodinamici.

Le tecniche cromatografiche ad elevate prestazioni basate sull'impiego di fasi stazionarie chirali (FSC), rappresentano il metodo di scelta per la determinazione diretta e accurata della purezza enantiomerica e la produzione di entrambi gli enantiomeri di un composto chirale su scala semipreparativa e preparativa.

Risultati attesi nel triennio

In questo contesto, sarà oggetto della nostra attività di ricerca lo sviluppo di sistemi cromatografici basati su fasi stazionarie polisaccaridiche in grado di separare su scala analitica e semipreparativa gli enantiomeri di IPP disponibili in commercio.

Mettere a punto un sistema HPLC enantioselettivo significa valutare l'influenza della composizione della fase mobile sulle prestazioni globali dell'FSC a livello analitico e trasferire il sistema ottimizzato FSC/eluente a livello semipreparativo. La disponibilità di entrambe le forme enantiomericamente pure in quantità dell'ordine di alcune decine di mg permetterà di sviluppare protocolli di ricerca in grado di valutare l'attività antitumorale dei singoli antipodi ottici di IPP.

Infatti, è stato recentemente dimostrato che i PPI esercitano un'attività antineoplastica agendo sia come agenti chemiosensibilizzanti (Luciani, *et al.* *JNCI* 2004) sia come agenti antineoplastici (De Milito, *et al.* *Cancer Res* 2006). La capacità della forma racemica e degli enantiomeri di IPP di agire come farmaci antineoplastici verrà analizzata in sistemi cellulari *in vitro* utilizzando cellule di melanoma umano derivanti da lesioni primarie e metastatiche. I saggi prevedono l'analisi della proliferazione e vitalità cellulare mediante test di screening in micropiastre (incorporazione di timidina radioattiva, test di citotossicità quali WST-1, MTT) e la valutazione della morte cellulare attraverso lo studio di alcuni meccanismi quali apoptosi e

autofagia. L'azione antineoplastica degli enantiomeri di IPP verrà anche studiata *in vivo* utilizzando un modello murino (topi SCID) per la crescita di tumori solidi umani.

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni scientifiche

Farmacologia della connettività neuronale del Sistema Nervoso Centrale

La connettività della rete neurale, ovvero il numero di connessioni fra i neuroni dell'SNC, la loro funzionalità e la loro capacità di modificarsi, gioca un ruolo critico nelle capacità cognitive. È accertato, infatti, che essa sia alterata nelle molteplici sindromi caratterizzate da ritardo mentale (Ramakers, *et al.* 2002). Il nostro gruppo ha inoltre mostrato come la sua manipolazione farmacologica sia in grado di determinare un potenziamento dell'apprendimento e della memoria nell'animale da esperimento (Diana, *et al.* 2007). Gli studi futuri saranno orientati alla definizione del ruolo della connettività in patologie diverse dai ritardi mentali. È stato infatti segnalato che il livello delle capacità cognitive nella demenza tipo Alzheimer sia in relazione con il numero di terminali sinaptici, piuttosto che con altri aspetti neuropatologici specifici, come il numero e la localizzazione della placche di amiloide o dei *neurofibrillary tangle* (Lassmann, *et al.* 1993). Data l'impraticabilità di parte degli studi proposti nell'umano, ci avvarremo prevalentemente di modelli animali, quali topi modificati geneticamente e animali lesionati in specifiche aree cerebrali. Un tale approccio è propedeutico alla messa a punto di trattamenti che agiscano in maniera primaria e selettiva a livello delle connessioni nervose. Saranno valutati, come indici di patologia e di efficacia dei trattamenti, parametri comportamentali, elettrofisiologici, morfologici, biochimici e biologico-molecolari.

Risultati attesi nel triennio

Ci aspettiamo di caratterizzare i meccanismi che presiedono allo stato del citoscheletro neuronale, e, di conseguenza, alla formazione e alla modifica degli elementi sinaptici, in alcune patologie dementigene o associate a ritardo mentale, o, ancora, in condizioni nelle quali le funzioni cognitive non siano primariamente colpite, come, ad esempio, talune patologie neurodegenerative e quelle cerebrovascolari. In prima battuta, studieremo il comportamento di alcune vie metaboliche che si dipartono dalle proteine con attività GTPasica, le quali giocano un ruolo essenziale nella regolazione dello stato dell'actina. Il funzionamento di queste proteine regolatorie può essere manipolato attraverso molecole naturali, ovvero alcune proteine batteriche, e farmaci di sintesi, sebbene, al momento, pochi di questi ultimi siano realmente disponibili. Uno dei risultati principali del nostro lavoro, pertanto, dovrebbe consistere: i) nella messa a punto e ii) nella sperimentazione di trattamenti di tipo sintomatico e patogenetico per le demenze, i ritardi mentali ed altre patologie neurodegenerative.

La messa a punto di nuove molecole si avvarrà della collaborazione con chimici esperti in *drug design*. Le proteine batteriche provviste di efficacia farmacologica potranno essere modificate attraverso tecniche di biologia molecolare al fine di migliorarne le proprietà farmaco-tossicologiche.

Trasferibilità dei risultati

Lo sviluppo di terapie per la malattia di Alzheimer, i ritardi mentali e le altre patologie neurodegenerative sta ricevendo crescente attenzione dalle case farmaceutiche e dalle istituzioni preposte alla salute pubblica. Infatti, esso comporterebbe consistenti risparmi per i servizi sanitari e migliorerebbe sostanzialmente lo stato di salute delle popolazioni. Purtroppo, i trattamenti fin qui disponibili mostrano efficacia alquanto limitata. La maggior parte di essi si basa sulla modulazione di sistemi neurotrasmettitoriali. Al contrario, i nostri studi intendono ripristinare la funzione dell'SNC attraverso una stimolazione diretta delle sue capacità di connessione. Abbiamo protetto con un brevetto internazionale (WO2006105998) l'uso di alcune

molecole in grado di produrre un tale effetto, e intendiamo brevettare altresì eventuali nuovi approcci terapeutici di provata efficacia. Il progetto, pertanto, dischiude interessanti possibilità di sfruttamento commerciale.

FIRB P93: Sviluppo di nuovi farmaci biologici e strategie innovative per l'immunoterapia dei tumori

I tumori si creano un ambiente acido rispetto ai tessuti normali circostanti. L'acidità tumorale riveste un ruolo primario nella resistenza di molti tumori umani alla chemioterapia. Ci sono infatti evidenze che l'alcalinizzazione dell'ambiente tumorale rende i tumori sensibili ai farmaci citotossici. In particolare un gruppo di farmaci, normalmente usati come antiacidi nella terapia della malattia peptica, sono in grado di sovvertire la resistenza intrinseca di alcuni tumori ai chemioterapici. Questi farmaci inibiscono le pompe protoniche (PPI) agendo preferenzialmente sulle ATPasi vacuolari. Dati preliminari hanno mostrato che i PPI inibiscono alcuni meccanismi interni alle cellule tumorali, fra cui il traffico di vescicole acide e il rilascio di esosomi. Obiettivo di questo progetto sarà verificare sia *in vitro* che *in vivo* l'effetto del pretrattamento con PPI sulla suscettibilità delle cellule tumorali alla immunoterapia adottiva. Saranno inoltre studiati i meccanismi alla base degli effetti dei PPI sulle cellule tumorali. Si ritiene che di per se l'acidità possa essere un meccanismo di escape tumorale. Per questo studio saranno utilizzati diversi modelli *in vitro* ed *in vivo* messi a punto nel laboratorio del proponente. I modelli *in vivo* sono costituiti da linee di cellule tumorali umane ottenute da pazienti.

Risultati attesi nel triennio

Ci si aspetta di determinare sulle linee trattate: i) il livello di apoptosi e ciclo cellulare tramite analisi citofluorimetrica; ii) il livello di attivazione di alcune vie di segnale correlate all'apoptosi (caspasi e potenziale mitocondriale); iii) alcuni aspetti differenziativi valutati anche dal punto di vista morfologico; iv) il livello di acidità intra-ed extra-cellulare; v) l'attivazione dei *pathway* autofagocitici. Inoltre, sarebbe di grande importanza dimostrare che il pretrattamento con PPI sia in grado di aumentare l'effetto citotossico di CTL adottivi sia *in vitro* che *in vivo*.

Trasferibilità dei risultati

Tali risultati rappresenterebbero la prima evidenza che un trattamento anti-acido basato sulla inibizione farmacologica delle pompe protoniche è in grado di potenziare sia la risposta immune anti-tumorale che l'efficacia di immunoterapie adottive anti-tumorali.

Help-mild: identificazione del rischio individuale di tumore al polmone nei fumatori mediante analisi del profilo di proteomica in soggetti sottoposti a tac a spirale o controllo

Il fumo costituisce uno dei maggiori fattori di rischio nello sviluppo di patologie neoplastiche. Al fine di diminuire l'incidenza del tumore al polmone, è necessario potenziare la prevenzione primaria attraverso la lotta al consumo di tabacco e, contemporaneamente, avviare ricerche per valutare l'efficacia degli screening per riconoscere precocemente la malattia sulla popolazione a rischio. Il Progetto MILD (*Multicenter Italian Lung cancer Detection*) ha l'obiettivo di ridurre la mortalità per cancro polmonare in soggetti ad alto rischio utilizzando la TAC spirale associata a un programma di prevenzione primaria per la disassuefazione da fumo. Il Progetto MILD si propone inoltre di identificare il rischio individuale di tumore al polmone nei forti fumatori mediante analisi del profilo proteomico, ponendo particolare attenzione

all'infiammazione polmonare e altri eventi biologici correlati alla carcinogenesi indotta dal tabacco. I danni funzionali saranno misurati mediante spirometria.

Nello studio verranno reclutati 1.000 soggetti di età superiore ai 49 anni, liberi da patologia neoplastica, che abbiano già smesso di fumare o che siano disposti a rientrare in un programma attivo di *smoking cessation*. È prevista una randomizzazione dei volontari in due gruppi: un gruppo di controllo (sottoposto ad una valutazione della funzionalità polmonare e un prelievo del sangue) e un gruppo di intervento che esegue anche esame TAC. Lo studio valuterà se uno o la combinazione di questi metodi può identificare soggetti con rischio individuale più elevato di insorgenza di cancro polmonare o patologie respiratorie fumo-correlate. Un database appositamente creato permetterà di analizzare statisticamente i risultati ottenuti.

Risultati attesi nel triennio

A tutt'oggi studi preliminari non hanno in maniera chiara dimostrato che gli screening nazionali per la diagnosi precoce ottengano benefici richiesti.

Su *Journal of the American Medical Association* del 2007 (*JAMA*, 297(9):953-61) sono stati pubblicati i risultati di tre studi, eseguiti dall'Istituto Tumori di Milano, da *Mayo Clinic* in Rochester e da *Moffitt Cancer Center* in Tampa, sulla diagnosi precoce del tumore al polmone con TAC spirale: I tre studi non hanno dimostrato in maniera chiara che gli screening nazionali per la diagnosi precoce ottengono i benefici richiesti. Al fine di fare chiarezza in tal senso, il Progetto *help-MILD* intende ampliare la casistica a disposizione della comunità scientifica identificando al contempo il rischio individuale di tumore al polmone nei forti fumatori mediante analisi del profilo proteomico e del danno individuale.

Trasferibilità dei risultati

I risultati dello studio saranno oggetto di pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali, in modo da renderli accessibili alla comunità scientifica.

Inoltre, dati del progetto, laddove particolarmente interessanti, potranno essere presentati a convegni nazionali e internazionali specifici.

A fronte delle informazioni ottenute dagli studi sperimentali, l'obiettivo generale del progetto è quello di contribuire a nuove strategie di prevenzione promuovendo l'interazione fra ricerca e intervento sanitario.

Impiego di sistemi cromatografici enantioselettivi nello sviluppo di nuovi farmaci (inibitori LSD1, agenti anti HIV-1, inibitori MAO)

Il riconoscimento molecolare gioca un ruolo fondamentale in tutti i sistemi biologici ed è alla base dell'interazione tra biomolecole (proteine, acidi nucleici, carboidrati) e ligandi naturali o sintetici. Considerevole importanza nel processo di riconoscimento hanno gli aspetti stereochimici. Nel caso di un farmaco chirale, la forma racemica non può essere considerata dal punto di vista biologico la semplice miscela equimolare di due enantiomeri, ma una specie chimica differente dai singoli antipodi ottici.

L'eventualità che due enantiomeri posseggano lo stesso tipo di attività biologica con uguale potenza risulta piuttosto rara, mentre si verifica più spesso un distinto comportamento sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo. È possibile riconoscere fundamentalmente tre situazioni differenti:

- Entrambi gli enantiomeri posseggono attività farmacologiche identiche con potenza uguale o diversa.
- Soltanto uno dei due enantiomeri risulta farmacologicamente attivo.
- I due enantiomeri hanno azioni farmacologiche qualitativamente diverse.

La modulazione chirale è quindi un aspetto molto importante per ottimizzare l'efficacia terapeutica e ridurre gli effetti collaterali e riguarda una percentuale di principi attivi ragguardevole, tra l'altro in continuo aumento.

Lo studio delle interazioni di entrambe le forme enantiomeriche di ligandi chirali con i siti di legame del bersaglio biologico permette di avere importanti informazioni a livello molecolare sui fenomeni di bioriconoscimento e progettare razionalmente nuove e selettive molecole farmacologicamente attive.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto di ricerca che presentiamo ha come obiettivo lo sviluppo di sistemi HPLC enantioselettivi da applicare nella risoluzione su scala analitica e semipreparativa di enantiomeri di composti chirali di interesse farmaceutico. L'attività di ricerca sarà completata dalla caratterizzazione chimico-fisica, strutturale e biologica degli enantiomeri isolati.

Classi di sostanze chirali studiate.

– Inibitori LSD1

L'istone demetilasi specifica per la lisina (LSD1) è un enzima flavina-dipendente in grado di catalizzare la demetilazione degli istoni H3 e risulta sovraespressa in alcuni tumori considerati ad alto rischio. Nel contesto delle cosiddette terapie epigenetiche c'è un crescente interesse nell'LSD1 come potenziale target farmacologico. Nell'ambito di una collaborazione con il Prof. A. Mai (Università di Roma) e il Prof. A. Mattevi (Università di Pavia) saranno valutati come inibitori LSD1 gli enantiomeri di una serie di ligandi chirali di nuova sintesi o già noti in campo farmaceutico (Tranilcipromina). Attraverso studi cristallografici saranno definite le basi strutturali e biochimiche del loro meccanismo di azione.

– Inibitori non-nucleosidici della trascrittasi inversa di HIV-1

Un altro importante target dei nostri studi è rappresentato dalla classe di composti chirali sintetizzati dal gruppo del Prof. A. Mai e del Prof. R. Silvestri (Università di Roma) con potenziale attività inibitoria *in vitro* nei confronti della forma *wild type* dell'enzima trascrittasi inversa (RT) del virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1) e di alcune sue forme mutanti.

– Inibitori delle monoamminoossidasi di tipo A e B (sintetizzati dal gruppo del Prof. F. Chimenti dell'Università di Roma).

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni.

Individuazione di bioindicatori *real-time* in patologie con complicanze vascolari

Lo stress ossidativo rappresenta un fattore di rischio per le malattie con complicanze cardiovascolari (incluse l'Aterosclerosi, la Sindrome Metabolica e la BPCO). Nel corso degli anni è stato anche ipotizzato il ruolo chiave dell'adesione cellula-cellula come meccanismo più generale coinvolto nell'occlusione vascolare. 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 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).

Sulla base di questo studio, ci proponiamo di identificare bioindicatori che, in tempo reale, possano essere predittivi sia della progressione di patologie con complicanze vascolari che della risposta ad un trattamento farmacologico sul sangue periferico di pazienti con Sindrome Metabolica.

In particolare, valuteremo:

- *Marker* plasmatici quali la presenza anticorpi anti LDL ossidate, la produzione di citochine infiammatorie (IL-2, IL-6 e TNFalfa) e di chemochine che attraggono i monociti (MCP-1).
- *Marker* relativi alla morfologia, all'invecchiamento ed alle capacità adesive del globulo rosso.
- *Marker* relativi allo stato di attivazione e aggregazione delle piastrine.
- 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.

Inibizione farmacologica delle tirosin kinasi e destino cellulare

Sono stati recentemente individuati agenti farmacologici capaci di inibire la proliferazione cellulare e indurre apoptosi. Le ricerche sono state focalizzate alla individuazione di composti che siano in grado di agire selettivamente su cellule neoplastiche. Tra questi agenti sono da annoverare gli inibitori delle tirosin kinasi. In particolare, capostipite di questa famiglia è l'Imatinib (Glivec) che agisce bloccando la fosforilazione del recettore PDGF. L'impiego di questo farmaco nella terapia della leucemia mieloide cronica e del GIST (un sarcoma gastro intestinale) si è dimostrato particolarmente efficace. Questa famiglia di composti è già di largo impiego nella pratica clinica e sono in corso di sperimentazione composti analoghi con più potente attività farmacologica. Il nostro studio è focalizzato alla individuazione di possibili ulteriori target terapeutici e/o alla modulazione della sua efficacia farmacologica tramite l'impiego di agenti sensibilizzanti.

Risultati attesi nel triennio

Questo progetto si propone di individuare i meccanismi molecolari alla base dell'attività del Glivec e dei suoi derivati in cellule di diverso istotipo. In particolare, verranno effettuati studi su cellule di sarcoma di Kaposi e su altri tipi cellulari (es. Prostatiche) e verranno valutati gli effetti dei farmaci in esame. Inoltre, sulla base dei dati clinici che mostrano l'insorgenza di resistenza farmacologica agli inibitori delle kinasi, verrà valutata l'attività farmacologica dei composti in esame in cellule rese farmacoresistenti. L'obiettivo è di valutare agenti capaci di sensibilizzare le cellule neoplastiche al trattamento chemioterapico.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti forniranno indicazioni sperimentali e pre-cliniche per realizzare: i) un *refining* terapeutico, ii) ottenere una maggiore suscettibilità farmacologica, iii) individuare altri possibili applicazioni di questi farmaci e iv) fornire strategie terapeutiche finalizzate al superamento della farmacoresistenza

Interazioni funzionali tra i recettori A2A dell'adenosina ippocampali e la neurotrofina BDNF in un modello transgenico di taupatia *Alzheimer's disease* (AD)-like

La malattia di Alzheimer (MA) rappresenta un'emergenza socio-sanitaria con una forte incidenza in Italia, considerando che il nostro Paese è al primo posto in Europa per numero di malati ed è il secondo Paese al mondo per anzianità della popolazione.

Con l'aumento previsto della popolazione sopra i 65 anni si stima che l'incidenza totale della MA quadruplicherà per il 2050. Dal punto di vista clinico, uno dei sintomi più precoci e caratteristici nella MA è la perdita di memoria. Con il progredire della malattia, il paziente perde la sua autosufficienza, avendo bisogno, di conseguenza, di assistenza e cure costanti. Negli stadi finali della malattia tutte le funzioni fondamentali del sistema nervoso si perdono a causa della degenerazione e della conseguente morte delle cellule nervose, che conducono i pazienti in uno stato di completa incapacità mentale. MA, come molte malattie del cervello, è ad oggi incurabile. La diagnosi definitiva di MA è basata sull'analisi neuropatologica del cervello del paziente, ed è stabilita sulla base della presenza sia di placche amiloidi, composte da aggregati del peptide beta-amiloide (A β) – derivato dal taglio sequenziale della proteina precursore dell'amiloide (*amyloid precursor protein*, APP) – che di degenerazione neurofibrillare (*neurofibrillary degeneration*, NFD) caratterizzata dall'accumulo intraneuronale di filamenti composti da una proteina associata ai microtubuli chiamata Tau, che risulta essere, in questi filamenti, fosforilata e aggregata in modo anomalo. Durante il normale processo di invecchiamento, un'eccessiva fosforilazione di Tau avviene nella corteccia trans-entorinale per poi diffondersi alla corteccia entorinale e all'ippocampo. Una volta che l'ippocampo è raggiunto, le placche amiloidi si formano e la Tau "anomala" si diffonde alle *polymodal association area* e infine a diverse altre aree corticali. I meccanismi che legano la formazione e l'aggregazione del peptide beta-amiloide alla fisiopatologia della MA sono stati e continuano ad essere molto studiati. Al contrario, i meccanismi che legano le anomalie di Tau alla MA sono meno chiari, nonostante esistano prove convincenti che indicano che la presenza della Tau "patologica" è strettamente correlata al declino cognitivo osservato nella malattia.

I recettori A2A dell'adenosina sono recettori accoppiati alle proteine G, abbondanti nel sistema nervoso centrale, in particolare nello striato, e, in misura minore, anche nell'ippocampo. A livello sinaptico questi recettori sono localizzati sia sui terminali nervosi, dove modulano il rilascio di neurotrasmettitori come il glutammato, sia a livello post-sinaptico dove trasducono segnali importanti per l'espressione genica e la sopravvivenza neuronale. Date le loro fondamentali funzioni sinaptiche i recettori A2A dell'adenosina sono considerati un possibile *target* per la neuroprotezione nelle malattie neurodegenerative e nell'invecchiamento. Infatti, sia l'espressione che la risposta fisiologica dei recettori A2A sono fortemente aumentate nell'ippocampo di ratti "anziani" come pure, cosa molto rilevante, in questi animali c'è una migliore facilitazione sinaptica, forse per bilanciare la riduzione nel rilascio di neurotrasmettitori dovuta all'età. Una strategia simile potrebbe anche essere attuata nel corso di patologie, dal momento che un aumento dei recettori A2A è stato riscontrato nella malattia di Pick o in modelli di malattia di Huntington. Inoltre, anche se lavori recenti indicano un aumentato *binding* di recettori A2A nell'ippocampo di pazienti di MA, si sa ancora molto poco della possibile relazione tra questi recettori e le patologie amiloidi/Tau. I neuroni dipendono anche dal "sostegno" offerto dalle neurotrofine. Tra queste, BDNF è espressa in modo esteso e abbondante nel cervello. BDNF è anche implicata nella crescita assonale, nella plasticità sinaptica, nell'apprendimento e nella memoria e i livelli di questa neurotrofina si riducono nelle malattie neurodegenerative. In particolare, l'espressione di BDNF e del suo recettore specifico TrkB, risultano ridotte nelle aree cerebrali post-mortem di pazienti di Alzheimer, specialmente in ippocampo; questa perdita può contribuire a parecchi sintomi della malattia come i disturbi

della memoria, i deficit nella trasmissione sinaptica e la neurodegenerazione. Comunque, molti di questi studi sono stati realizzati in stadi molto avanzati della MA e quindi la presenza di anomalie nell'interazione BDNF/TrkB in fasi precoci è ancora poco definita. Inoltre, sebbene patologie legate alla Tau siano riscontrate nell'ippocampo durante l'invecchiamento, poco si conosce della potenziale influenza di queste alterazioni sui difetti precoci della memoria e sull'interazione BDNF/TrkB. Come poco si sa della relazione tra recettori A2A e BDNF nel sistema nervoso e, in particolare, in ippocampo. I recettori A2A dell'adenosina e i recettori delle neurotrofine mostrano una notevole sovrapposizione nella loro distribuzione. Un'interazione di questi due sistemi potrebbe essere molto importante sia in condizioni fisiologiche che patologiche.

I recettori A2A modulano l'effetto sinaptico esercitato da BDNF in ippocampo. Infatti, come mostrato di recente, le funzioni di BDNF sono molto ridotte nel cervello di topi *knock-out* per i recettori A2A. Inoltre, i recettori TrkB possono essere transattivati *in vitro* e *in vivo* dai recettori A2A anche in assenza di BDNF. Questi dati supportano l'idea che entrambi i sistemi interagiscono a livello sinaptico e che questa interazione possa essere di primaria importanza nel regolare la plasticità sinaptica ippocampale.

Risultati attesi nel triennio

Con il presente progetto noi ci proponiamo di valutare l'importanza dell'interazione tra i recettori A2A e il *signalling* di BDNF nel cervello di topi che overesprimono una forma mutata della proteina Tau e in topi doppi mutanti, knock-out per i recettori A2A e che sviluppano taupatia.

Con il presente progetto, in particolare, vorremmo rispondere ai seguenti punti: i) c'è una modulazione differente della funzionalità di BDNF da parte dei recettori A2A in topi *wild type* e transgenici Tau? ii) quali sono le conseguenze fisiopatologiche della eliminazione genetica dei recettori A2A nei topi transgenici Tau? Questi obiettivi sono innovativi dal momento che, allo stato attuale, l'interazione tra i recettori A2A e il BDNF in ippocampo e il loro coinvolgimento nelle alterazioni della proteina Tau non sono mai state investigate. Il risultato del nostro progetto chiarirà se i recettori A2A possono essere scelti come *target* specifico per favorire o sostituire l'azione trofica di BDNF, fornendo, al tempo stesso, nuovi dati sul ruolo dei recettori A2A nelle taupatie e su nuovi meccanismi con possibili risvolti terapeutici.

Trasferibilità dei risultati

Sebbene il presente progetto sia prevalentemente di ricerca di base, potrebbe ugualmente contribuire fortemente allo sviluppo di nuovi approcci terapeutici della MA e alla conoscenza e comprensione dei meccanismi responsabili della neurodegenerazione in questa patologia. Inoltre, la disponibilità di ligandi che agiscono sui recettori A2A, già precedentemente testati negli esseri umani e con caratteristiche accettabili di *safety*, faciliterebbe e renderebbe più rapido il trasferimento dei risultati in studi clinici.

Italia/USA Malattie Rare : New experimental approaches for investigation on new therapies against rare human bone tumors

I tumori maligni dell'osso che includono l'osteosarcoma (OS) e il sarcoma di Ewing, sono tumori rari sia negli adulti che nei bambini e sono caratterizzati da una elevata aggressività biologica. La strategia del trattamento normalmente si basa sulla chirurgia e chemioterapia combinata. La chemioterapia (una miscela di quattro farmaci) viene somministrata al paziente prima e dopo la rimozione chirurgica del tumore (chemioterapia neoadiuvante). Tuttavia, il più recente miglioramento nella cura dei pazienti con tumore localizzato, è stata raggiunta intensificando la dose del farmaco somministrato, avendo però come effetti collaterali una tossicità acuta e lo sviluppo di metastasi. Inoltre, il 35% dei pazienti mostra resistenza tumorale

alle terapie sistemiche e i trattamenti dei pazienti ad alto rischio sono del tutto inadeguati e nessun nuovo farmaco è stato riportato essere realmente efficace nei sarcomi. Pertanto, nuovi trattamenti sono auspicabili.

In questo progetto, ci proponiamo di sviluppare dei modelli *in vitro* e *in vivo* per valutare nuove e potenziali strategie terapeutiche allo scopo di inibire la crescita e lo sviluppo di metastasi di tumori umani dell'osso. Il primo obiettivo sarà investigare l'importanza dell'ezrina negli osteosarcomi e in seguito l'espressione e la funzione delle V-ATPasi. Inoltre eseguiremo esperimenti volti all'analisi della composizione molecolare delle micro-vescicole rilasciate dalle cellule maligne isolate dal midollo osseo.

Risultati attesi nel triennio

I risultati preliminari hanno mostrato che l'ezrina è coinvolta in molti processi dei tumori del midollo osseo, inclusa la farmacoresistenza e il rilascio di micro-vescicole. Inoltre, è stato dimostrato un coinvolgimento della V-ATPasi nel comportamento maligno dei tumori rari dell'osso e alcuni inibitori delle V-ATPasi interferiscono con il potenziale metastatico di questi tumori. Studi di MRS hanno mostrato che tumori del midollo osseo sono chiaramente acidi e che l'inibizione dell'attività delle V-ATPasi tramite inibitori delle pompe protoniche (PPI) determina un'aumento del pH di questi tumori. Infine, il trattamento di un esteso numero di linee cellulari, derivate da tumori dell'osso, quali osteosarcomi e sarcomi di Ewing, con inibitori dell'IGF-IR o c-src, (specifici inibitori delle tirosinchinasi), ha mostrato efficacia nell'inibire la crescita delle cellule tumorali. Alla luce di studi pre-clinici e clinici incoraggianti, ci proponiamo di dimostrare che l'uso dei PPI possa migliorare la terapia dei tumori del midollo osseo.

Trasferibilità dei risultati

I nostri risultati preliminari suggeriscono che i nuovi *pathway* molecolari associati ai tumori rari dell'osso possono rappresentare validi bersagli per futuri approcci anti-tumorali. In particolare, i risultati dei trials clinici nei pazienti con osteosarcoma dimostreranno se l'uso dei PPI può essere considerato come un trattamento innovativo di queste malattie.

L'interazione tra i recettori A2A dell'adenosina, mGlu5 del glutammato e CB1 dei cannabinoidi come strategia terapeutica per il trattamento della corea di Huntington

La corea di Huntington è una malattia neurodegenerativa progressiva e altamente invalidante caratterizzata da disturbi del movimento, sintomi psichiatrici e morte precoce. Dal punto di vista neuropatologico, si osserva una marcata e selettiva degenerazione dei neuroni spinosi medi dello striato e, in misura minore, dei neuroni corticali. Sebbene la mutazione genica responsabile della malattia sia stata individuata, la terapia resta però esclusivamente sintomatica e per di più non soddisfacente per il controllo dei sintomi sia motori che psichiatrici.

A livello dei neuroni spinosi medi dello striato vi è una elevata espressione dei recettori A2A dell'adenosina e dei recettori CB1 dei cannabinoidi. Sia in modelli animali di corea di Huntington che nei pazienti è stata dimostrata una modificazione della espressione dei due recettori che si verifica in una fase molto precoce della malattia, quando ancora non è possibile identificare una perdita di neuroni striatali. Anche i recettori metabotropici di tipo 5 del glutammato (mGlu5) sono espressi a livello striatale e la loro attività è strettamente regolata dallo stato di attivazione dei recettori A2A dell'adenosina e inoltre la loro stimolazione induce, tramite l'attivazione della fosfolipasi C e della diacilglicerolo lipasi, la sintesi di endocannabinoidi e quindi la stimolazione dei recettori CB1.

Lo scopo del progetto sarà quello di verificare il ruolo dei recettori CB1 nella patogenesi della corea di Huntington, ipotizzando un loro possibile utilizzo per il trattamento della malattia.

Data la dimostrata interazione tra i recettori CB1 e A2A, A2A e mGlu5 e le evidenze di interazione anche tra CB1 e mGlu5, sarà interessante verificare l'esistenza di un *menage à trois* tra CB1, A2A e mGlu5 e soprattutto investigare se questa interazione possa essere sfruttata a fini terapeutici

Risultati attesi nel triennio

Valutazione dei possibili effetti neuroprotettivi dei ligandi CB1 in tessuti cerebrali di topi normali e topi *knock out* per i recettori CB1 e A2A.

Valutazione degli effetti dei ligandi CB1 in modelli di neurodegenerazione *in vivo* (trattamento con acido 3-nitropropionico o topi transgenici per la corea di Huntington).

Trasferibilità dei risultati

Ciascuna delle metodologie utilizzate è ampiamente validata dalla letteratura scientifica internazionale, e il gruppo proponente ha documentata esperienza nella loro applicazione. Lo studio potrebbe fornire un apporto conoscitivo rilevante sul ruolo dei recettori cannabinoidi CB1 nella modulazione dei fenomeni neurodegenerativi responsabili della corea di Huntington. Considerando la sostanziale sovrapposibilità dei meccanismi patogenetici coinvolti nelle diverse patologie neurodegenerative, tali risultati potrebbero essere applicabili ad un vasto numero di malattie.

La farmaco-economia come parametro di valutazione dei farmaci nell'ambito degli studi clinici

La Farmaco-economia è una disciplina che identifica, stima e mette a confronto i costi e i benefici dei farmaci. Queste valutazioni trovano spazio all'interno del gruppo di lavoro PROMOTE, coordinato dall'ISS, il cui obiettivo primario, è la diffusione e il corretto utilizzo dei *Patient Reported Outcome* (PRO). I PRO sono utilizzati per descrivere, monitorare e valutare la qualità della vita correlata alla salute e in ambito farmaco-economico vengono usati per identificare il valore attribuito da una persona al proprio stato di salute espresso in termini di preferenza. Le valutazioni farmacoeconomiche forniscono informazioni utili nel processo di *decision-making* e costituiscono un fondamentale ausilio per una adeguata programmazione sanitaria; l'importanza della farmacoeconomia cresce con la disponibilità di terapie ad alto costo che determinano un incremento della spesa farmaceutica, il contenimento della quale si deve fondare sulla razionalizzazione delle risorse. Le valutazioni farmaco economiche possono essere condotte trasversalmente, su qualsiasi area medica, nell'ambito di studi clinici, sperimentali e osservazionali. Ad oggi, all'interno del gruppo Promote sono in corso studi clini che mirano a valutare i farmaci antiretrovirali per il trattamento dell'infezione da HIV.

Risultati attesi nel triennio

Studio LIPO: è un *trial* clinico randomizzato con l'obiettivo di valutare l'efficacia di interventi chirurgici mirati al trattamento della lipoatrofia al volto dei pazienti con infezione da HIV. La valutazione farmacoeconomica permetterà di stimare il rapporto incrementale costo/efficacia (ICER) che definisce quale è il costo aggiuntivo da sostenere per ottenere un incremento unitario di efficacia definita come la riduzione del grado di lipodistrofia.

Studio NIA: è una coorte che si propone di analizzare i dati di pazienti già trattati con farmaci appartenenti alle tre classi principali (IP, NRTI, NNRTI), e che iniziano una terapia con farmaci di diversa classe (inibitori della fusione, inibitori dell'integrasi, antagonisti del corecettore CCR5, ecc.). La valutazione farmaco economica ha come obiettivo la stima dei costi diretti e intangibili e dei QALY.

Trasferibilità dei risultati

Dai risultati dello studio LIPO si potranno ottenere informazioni, che insieme ad altre relative a questo intervento, potrebbero essere sfruttate per implementare questi interventi a carico dell'SSN. Con lo studio NIA si potranno stimare i costi della patologia da HIV in considerazione dei nuovi farmaci disponibili con dati provenienti dalla pratica clinica. Questi risultati, in associazione a ulteriori contributi scientifici provenienti da altri studi realizzati da strutture indipendenti, potrebbero costituire uno strumento utile per il Servizio Sanitario nel processo di programmazione sanitaria basata sull'allocazione efficiente delle risorse.

Ligandi dei recettori beta-adrenergici e farmacologia sperimentale dell'ipertrofia cardiaca patologica

L'ipertrofia cardiaca patologica inizia, nella maggioranza dei casi, come un fenomeno di adattamento alle mutate condizioni emodinamiche indotte, per esempio, da perdita di massa contrattile o da stress biomeccanico del ventricolo sinistro. Il cuore si rimodella biochimicamente e strutturalmente nel tentativo di ridurre lo stress parietale e mantenere invariata la gittata sistolica. Tuttavia, con il perdurare della condizione che ha provocato l'attivazione dei meccanismi adattativi, si innesca un circolo vizioso che conduce inesorabilmente verso un punto di non ritorno dominato da apoptosi e dalla progressiva sostituzione dei miocardiociti con tessuto fibroso.

Sebbene vi sia una discreta conoscenza dei fattori che inducono ipertrofia, poco è noto sui meccanismi che contrastano la crescita cardiaca patologica. Il propranololo, un beta-bloccante non selettivo, è in grado di attenuare in maniera marcata (-70%) lo sviluppo dell'ipertrofia cardiaca in risposta ad un incrementato carico sul ventricolo sinistro come per esempio accade nel modello sperimentale di stenosi chirurgica dell'arco aortico. Tuttavia i meccanismi molecolari che sottendono tale effetto rimangono ignoti. Lo scopo del presente progetto è quello di individuare le vie di segnalazione intracellulare coinvolte nell'attività anti-ipertrofica del propranololo.

Risultati attesi nel triennio

Due diverse categorie di risultati sono attesi da questo progetto e comprendono:

- Arricchimento di conoscenze su meccanismi patogenetici dell'ipertrofia cardiaca patologica.
- Nuove conoscenze sul meccanismo di azione dei farmaci anti ipertrofici.

Lo studio infatti prevede il confronto tra farmaci beta-bloccanti che hanno un diverso impatto sullo sviluppo dell'ipertrofia cardiaca e tende a chiarire la base molecolare di tali differenze.

Trasferibilità dei risultati

- Ottenere e divulgare dati sul ruolo di alcune molecole e vie di segnalazione nel promuovere il processo di ipertrofia cardiaca patologica.
- Il possibile chiarimento dei meccanismi molecolari alla base dell'efficacia di certe terapie farmacologiche sperimentali potrebbe stimolare nuovi *trial* clinici con farmaci mai sinora utilizzati in campo cardiologico.

Linee Guida europee sulle resistenze ai farmaci antiretrovirali

Nel 2001 è stato istituito un panel di esperti europei, con lo scopo di produrre Linee Guida rivolte a clinici e virologi per una corretta gestione delle resistenze ai farmaci anti-HIV. Una prima versione delle Linee Guida è stata pubblicata nel 2004 (A-M Vandamme, *et al. Antiviral Therapy* 2004;9:829-48). In considerazione della dinamicità della ricerca sull'HIV e

dell'introduzione di numerosi nuovi farmaci antiretrovirali, la stesura delle Linee Guida rappresenta un processo continuo. Pertanto, all'inizio del 2009 si è deciso di rinnovare l'intero panel di esperti e di istituire un *writing committee*, incaricato di elaborare una proposta di aggiornamento delle Raccomandazioni. I partecipanti meno attivi sono stati quindi sostituiti con nuovi membri, che includono anche ricercatori dell'est europeo, ed è stato designato un nuovo *writing committee*, composto da: A-M Vandamme (Belgio), coordinatore; C Stephan (Germania); R Camacho (Portogallo); H Walter (Germania); J-C Schmidt (Lussemburgo), D Paraskevis (Grecia), V Soriano (Spagna), L Palmisano (Italia); A De Luca (Italia); M Poljak (Slovenia); A Sonnerborg (Svezia), B Clotet (Spagna). Nei prossimi anni, attraverso un processo basato su: preparazione e diffusione di questionari, lavoro online, teleconferenze e incontri, verrà elaborato un documento finale che copra tutti gli argomenti correlati alla resistenza ai farmaci anti HIV: resistenza ai nuovi antiretrovirali, utilizzo dei test di resistenza, aspetti tecnici dei test di resistenza, differenze tra ceppi B e non B di HIV e tra HIV-1 e HIV-2. Questo documento sarà la base per la diffusione delle Linee Guida mediante modalità diverse: articoli scientifici, presentazioni, sito web dell'*European AIDS Clinical Society* (EACS).

Risultati attesi nel triennio

Le Linee Guida europee sulle resistenze ai farmaci antiretrovirali rappresentano uno strumento essenziale per aiutare i clinici a disegnare dei regimi terapeutici personalizzati e per fornire ai laboratori di virologia le indicazioni per la standardizzazione dei test di resistenza e l'adozione dei controlli di qualità più appropriati. Il progetto si propone anche di assicurare un'ampia diffusione delle Linee Guida, utilizzando canali diversi: pubblicazione su una rivista scientifica con alto *Impact Factor*; comunicazioni a congressi e workshop, preparazione di una versione divulgativa rivolta a medici non specialisti e alle persone sieropositive, inserimento delle Linee Guida sul sito web di una società scientifica (ad esempio l'EACS). Quest'ultima modalità di comunicazione, in particolare, appare particolarmente adatta a documenti che trattano temi in rapida evoluzione, come quello delle resistenze ai farmaci antiretrovirali.

Trasferibilità dei risultati

L'adesione alle Linee Guida da parte degli specialisti in malattie infettive ha come ricaduta un'ottimizzazione delle decisioni terapeutiche per i pazienti HIV+. Infatti è noto che l'utilizzo di un trattamento antiretrovirale scelto in base al profilo di resistenza del virus del singolo paziente si associa a una maggiore probabilità di risposta terapeutica, a una maggiore durata della risposta nel tempo e alla salvaguardia di altre opzioni terapeutiche per il futuro. Una maggiore percentuale di pazienti con risposte virologiche stabili e durature si associa anche a una minore circolazione di ceppi resistenti e a una ridotta probabilità di trasmissione dell'HIV.

Lo 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 dall'ISS. Una delle aree di attività del NEAT è quella della ricerca clinica, nell'ambito della quale sono stati disegnati due studi clinici strategici, il NEAT 001 e il NEAT 002. Il primo di questi studi, il NEAT 001, si propone di confrontare due regimi HAART innovativi in soggetti HIV+ mai trattati con antiretrovirali. I due regimi sono rappresentati da: darunavir + emtricitabina+ tenofovir e da darunavir+ raltegravir. Saranno studiati 800 pazienti (400 per braccio terapeutico), arruolati in diversi Paesi europei, e trattati per 96 settimane. L'innovatività dello studio consiste: i) nell'inclusione di un braccio terapeutico che include due soli farmaci antiretrovirali (darunavir+raltegravir), estremamente potenti, senza il cosiddetto *backbone*

nucleosidico (composto da due inibitori della trascrittasi inversa), che è una componente classica della HAART. In questo modo si potranno evitare gli effetti tossici legati agli analoghi nucleosidici; ii) la durata dello studio, 96 settimane, che permetterà di osservare gli effetti a lungo termine dei due trattamenti; l'*endpoint* primario dello studio, che include non solo la risposta virologica, ma anche alcuni parametri clinici; iii) l'inclusione, tra gli *endpoint* secondari, di parametri *patient-oriented* come la qualità della vita; iv) l'inclusione di sottostudi mirati ad aspetti particolari, come i disturbi cognitivi, la farmacogenomica, la farmacoeconomia. L'intero studio durerà quattro anni.

L'ISS coordinerà l'attività dei centri clinici italiani che parteciperanno al NEAT 001.

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 farmacoeconomia, la comparsa di eventuali disturbi cognitivi, le alterazioni metaboliche.

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 (sottostudio farmacoeconomico), per le loro decisioni in materia di politica sanitaria.

Lo studio clinico NEAT 002: A randomised controlled trial of immediate versus deferred treatment of acute hepatitis C virus (HCV) infection in patients with HIV co-infection

Lo studio NEAT 002 è uno studio multinazionale, multicentrico, disegnato nell'ambito del progetto europeo NEAT (*European AIDS Treatment Network*), coordinato dall'ISS. Una delle aree di attività del NEAT è quella della ricerca clinica, nell'ambito della quale sono stati disegnati due studi clinici strategici, il NEAT 001 e il NEAT 002. Il secondo di questi studi, il NEAT 002, è stato disegnato per fornire una risposta a un quesito ancora non risolto: la terapia ottimale dell'epatite acuta da HCV in soggetti HIV+. L'epatite da HCV, infatti, ha una prognosi peggiore nelle persone HIV+ che in quelle HIV-, e risponde meno favorevolmente alle terapie disponibili. Teoricamente, potrebbe essere importante individuare tempestivamente i soggetti HIV+ che contraggono una infezione da HCV e trattarli precocemente, per evitare la cronicizzazione della malattia. Nello studio NEAT 002 verranno quindi valutati: l'efficacia di una terapia precoce dell'infezione acuta da HCV in soggetti HIV+ (*endpoint* primario), la composizione del regime terapeutico (interferon da solo o interferon + ribavirina), la durata del trattamento (24 *versus* 48 settimane). La risposta alla terapia sarà valutata in termini di *sustained virologic response*, cioè *clearance* persistente dell'HCV RNA. Saranno arruolati 400 pazienti provenienti da Paesi europei diversi; l'arruolamento richiederà circa due anni, considerando la difficoltà di individuare la popolazione oggetto dello studio.

L'ISS coordinerà l'attività dei centri clinici italiani che parteciperanno al NEAT 002.

Risultati attesi nel triennio

Il NEAT 002 fornirà una risposta a un problema che attualmente non è risolto, e cioè la possibilità che il trattamento precoce dell'infezione acuta da HCV in soggetti con infezione da HIV possa rallentare l'evoluzione clinica in epatite cronica e cirrosi. Inoltre lo studio fornirà indicazioni sul regime terapeutico migliore (interferon da solo o associato a ribavirina), e sulla durata del trattamento (24 o 48 settimane). Oltre all'efficacia, la fattibilità dei due regimi sarà valutata in termini di tossicità e tollerabilità.

Trasferibilità dei risultati

I risultati del NEAT 002 avranno una ricaduta immediata sulla pratica clinica, in quanto forniranno ai clinici informazioni (attualmente non disponibili) sul trattamento dell'epatite acuta da HCV in soggetti HIV+. Se dallo studio emergerà un vantaggio di questo trattamento in termini di ridotta progressione clinica dell'infezione da HCV, saranno rinforzati i programmi di screening per l'epatite acuta da HCV, che spesso decorre asintomatica. Inoltre i risultati del NEAT 002 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.

Malattia di Niemann Pick e recettori A2A dell'adenosina: dalla fisiopatologia alla terapia

La malattia di Niemann Pick di tipo C (NPC) è una malattia rara ereditaria (con frequenza dell'ordine di 1/150.000 nati) a trasmissione autosomica recessiva, caratterizzata da accumulo di colesterolo e da severa e progressiva degenerazione neuronale. Nella maggior parte dei casi la malattia è causata da una mutazione nel gene *npc1* che controlla il *trafficking* e l'omeostasi del colesterolo. Tuttavia i meccanismi responsabili della neurodegenerazione e dell'esito fatale della malattia non sono ancora conosciuti e, attualmente, non è disponibile alcun trattamento efficace per i pazienti. Il tentativo di abbassare farmacologicamente i livelli di colesterolo non ha portato ad alcun beneficio clinico suggerendo quindi che l'accumulo di colesterolo non è responsabile, da solo, della patogenesi della malattia ma altri fattori debbono essere chiamati in causa.

L'ipotesi alla base di questo progetto è che un sottotipo specifico di recettore per l'adenosina, il recettore A2A, possa avere un ruolo nella patogenesi della malattia. Questa ipotesi è basata sull'osservazione che i recettori A2A, in grado di modulare la sopravvivenza neuronale e il differenziamento, controllano anche numerosi meccanismi che risultano essere coinvolti nella patogenesi della NPC e che il *signalling* del recettore A2A è fortemente regolato dal contenuto in membrana di colesterolo. Quindi, scopo di questo progetto sarà quello di chiarire il ruolo svolto dai recettori A2A nella NPC e in particolare di: i) valutare se e come la mutazione nel gene *npc1* modifica l'espressione, il *signalling* e la funzionalità dei recettori A2A, utilizzando sia un modello murino di NPC, sia campioni di cellule provenienti da pazienti; ii) valutare l'effetto della attivazione o dell'inibizione del recettore A2A nei modelli sperimentali di NPC attraverso il trattamento con agonisti e antagonisti selettivi del recettore A2A o attraverso l'incrocio di topi mancanti del gene *npc1* con topi *knock out* per il recettore A2A; iii) identificare e validare il recettore A2A come possibile target terapeutico per il trattamento della malattia.

Risultati attesi nel triennio

I risultati scientifici previsti possono essere delineati come segue: i) individuare le alterazioni nella espressione, nel *signalling* e nella funzionalità del recettore A2A nei modelli di malattia o

nei pazienti; ii) chiarire gli effetti del blocco o dell'attivazione del recettore A2A nei modelli *in vivo* e *in vitro*; iii) verificare se il recettore A2A può rappresentare un valido *target* terapeutico.

Trasferibilità dei risultati

Sebbene questo sia un progetto di ricerca di base e le ricadute saranno principalmente di tipo conoscitivo, tuttavia tale studio potrà contribuire molto alla conoscenza della malattia e alla comprensione dei meccanismi responsabili della neurodegenerazione. Data l'originalità della ipotesi di lavoro, i risultati dello studio potrebbero aprire nuove prospettive per il trattamento della NPC. La disponibilità di ligandi per il recettore A2A, già in uso in clinica con un buon profilo di sicurezza, faciliterebbe la traslazione clinica dei risultati. Inoltre è importante sottolineare come i risultati di questo progetto potrebbero essere estesi ad altre malattie rare caratterizzate da alterato metabolismo del colesterolo (come la corea di Huntington) o ad altre taupatie.

Meccanismi di apoptosi e autofagia in patologia umana: loro ruolo e modulazione farmacologica

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.

La ricerca verrà effettuata in collaborazione con numerosi gruppi di ricerca italiani.

Risultati attesi nel triennio

Principali finalità del progetto sono: i) 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, ii) l'analisi dei meccanismi chiave nella suscettibilità cellulare a degenerazione e determinazione di parametri di possibile longevità o di morte cellulare in differenti istotipi e iii) 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 sui meccanismi patogenetici che determinano tutte quelle patologie che hanno come *hallmark* una alterazione dei processi di 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.

Meccanismi molecolari che regolano l'espressione genica fetale nell'ipertrofia cardiaca patologica

Il cuore sottoposto a un sovraccarico pressorio per un periodo prolungato, come nell'ipertensione, si adatta aumentando la sua massa. Tale processo, inizialmente benefico,

tuttavia evolve inevitabilmente verso l'insufficienza cardiaca (ipertrofia cardiaca patologica, ICP). L'ICP da sovraccarico emodinamico è caratterizzata oltre che da un aumento delle strutture sarcomeriche, anche dalla riespressione di geni normalmente attivi solo durante la vita fetale (peptide atriale natriuretico, ANP; β -miosina, β -MHC; α -actina scheletrica, skACT). Il significato di questo cambiamento è a tutt'oggi controverso e i meccanismi molecolari che lo regolano non sono completamente noti. In particolare, non è chiaro il contributo svolto dalla stimolazione cronica del sistema β -adrenergico (β -AR), che si verifica in condizioni di sovraccarico pressorio. A tale riguardo, abbiamo recentemente dimostrato che: i) in cardiomiociti neonatali di ratto il segnale β -AR regola negativamente l'espressione genica indotta dall'attivazione del segnale α 1-AR e che tale regolazione inibitoria è già operativa nel cuore in condizioni fisiologiche, (Patrizio, *et al. J Mol Cell Cardiol* 2008); ii) il propranololo, un antagonista β -AR non selettivo con attività anti-ipertrofica potenzia l'aumento di ANP, β -MHC e skACT che si osserva in topi sottoposti a sovraccarico emodinamico e in colture di cardiomiociti neonatali trattati con stimoli ipertrofici (Patrizio, *et al.* 2007).

Scopo di questo progetto sarà quello di chiarire le vie di trasduzione del segnale coinvolte nell'azione inibitoria esercitata dal sistema β -adrenergico Gs-mediato sull'espressione genica fetale indotta dall'attivazione del sistema α 1-adrenergico Gq-mediato, individuandone in particolare i geni e le corrispondenti proteine interessate.

Risultati attesi nel triennio

Nello specifico intendiamo:

- valutare il ruolo svolto dai sottotipi di recettori β -adrenergici, β 1, β 2 e β 3;
- individuare nuove molecole target coinvolte nella modulazione negativa Gs-mediata;
- valutare gli effetti di altri β -bloccanti di ampio impiego clinico sull'espressione genica indotta dall'attivazione della via Gq-mediata;
- realizzare una nuova classificazione dei β -antagonisti, sulla base della loro azione sull'espressione genica fetale associata all'ipertrofia cardiaca da sovraccarico pressorio.

Tali studi farmacologici verranno condotti:

- *in vivo* su topi C57BL/6 *wilde type* e geneticamente modificati (β 1KO, β 2KO, β 1 β 2DKO) già in nostro possesso;
- *in vitro* su colture purificate di cardiomiociti ventricolari neonatali di ratto, allestite presso il nostro Reparto;
- *in vitro* sulle due linee cellulari H969, di origine cardiomiocitaria murina, e HEK 293 ingegnerizzate ed esprimenti permanentemente e singolarmente i diversi sottotipi di recettori adrenergici ritenuti essere coinvolti.

Trasferibilità dei risultati

Nell'ipotesi di un ruolo benefico svolto dai geni fetali nell'evoluzione della cardiomiopatia ipertrofica da sovraccarico pressorio, la possibilità di regolare la loro espressione sarebbe fondamentale per evitare il progressivo declino verso lo scompenso cardiaco. In questo senso la comprensione dei meccanismi molecolari che regolano la riespressione genica fetale rivestono un ruolo di primaria importanza.

Inoltre, le informazioni attese dallo studio descritto potrebbero definire nuovi target molecolari su cui impostare trials clinici mirati.

Infine, sempre ipotizzando un ruolo cardioprotettivo svolto dai geni fetali, il potenziamento esercitato dal propranololo potrebbe essere alla base dell'effetto benefico esercitato dal beta-blocco nella terapia dell'insufficienza cardiaca caratterizzata da una notevole presenza di catecolamine circolanti e il cui meccanismo è da ritenersi a tutt'oggi sconosciuto.

Modulazione dell'omeostasi linfocitaria, meccanismi di autoimmunità e differenza di genere

L'omeostasi linfocitaria è regolata sia dalla proliferazione e differenziazione cellulare che dalla morte cellulare programmata o apoptosi. Un aumento di apoptosi, dovuta ad una persistente attivazione del sistema immunitario, può condurre a linfopenia ed esaurimento della funzione timica. Una riduzione di apoptosi invece può condurre alla comparsa di malattie autoimmuni, sia su base genetica che infettiva, caratterizzate da un'aumentata e cronica linfoproliferazione. Recentemente, lo stress ossidativo, che gioca un ruolo importante nella cascata d'eventi responsabili dell'apoptosi, è stato correlato alla patogenesi di malattie rare e/o autoimmuni. Questo progetto si propone di analizzare due patologie rare la Sclerosi Sistemica (malattia rara autoimmune) e l'anemia di Fanconi (malattia genetica rara infantile), apparentemente distanti dal punto di vista clinico, ma accumulate da difetti dell'apoptosi linfocitaria, sbilancio ossidativo e incidenza diversa per età e sesso.

Lo studio prevede le seguenti analisi *ex vivo*:

- Meccanismi patogenetici coinvolti nella disregolazione dell'omeostasi T cellulare con particolare riferimento alla cascata apoptotica mediata da CD95/Fas.
- Ruolo dei mitocondri nel processo apoptotico con particolare riferimento alla generazione di radicali liberi dell'ossigeno.
- Effetti *in vitro* di agenti farmacologici capaci di modulare l'apoptosi linfocitaria e d'indurre stress ossidativo.
- Studi di fase 3 in pazienti con patologie su base autoimmune in collaborazione con gruppi clinici utilizzando farmaci modulatori dell'omeostasi linfocitaria e/o bilancio *redox*.

Gli aspetti di *gender difference* saranno specificatamente valutati per tutte le analisi sopraelencate.

Risultati attesi nel triennio

- Individuazione di fattori responsabili dell'alterata omeostasi T cellulare con particolare attenzione al binomio genere/età.
- Individuazione e valutazione di bioindicatori di malattia utilizzabili sia a fini diagnostici che prognostici.
- Individuazione e valutazione *in vitro* di molecole capaci di modulare l'apoptosi linfocitaria.

Trasferibilità dei risultati

Individuazione di sostanze capaci, sia *in vitro* che *in vivo*, di ristabilire una corretta omeostasi linfocitaria contribuendo allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

Modulazione glutammatergica in terapie farmacologiche e riabilitative di malattie neurodegenerative

La corea di Huntington (CH) è una malattia genetica rara causata dall'espansione di una tripletta CAG nell'esone 1 del gene che codifica per la proteina huntingtina, e risulta nella degenerazione selettiva dei neuroni striatali del tipo *medium size spiny neurons*. Nell'ipotesi che meccanismi eccitotossici siano coinvolti nella patogenesi della CH, lo studio sarà orientato a valutare se interventi in grado di ridurre il rilascio di glutammato e/o di modulare l'attivazione dei suoi recettori possano avere effetti neuroprotettivi, rallentando la progressione della malattia. Verranno studiati in particolare i recettori A2A dell'adenosina (A2AR, densamente espressi a livello dello striato e coinvolti nella regolazione dei livelli extracellulari di glutammato) e i recettori metabotropici di tipo 5 del glutammato (mGlu5R) in quanto funzionalmente correlati agli A2AR. Da studi precedenti è emerso che gli A2AR possono

giocare ruoli diversi, anche opposti, nella modulazione dei fenomeni neurodegenerativi a seconda dello stadio di progressione della malattia, da cui la necessità di approfondire lo studio del ruolo di tali recettori, e dei loro ligandi potenzialmente utili a fini terapeutici, in momenti diversi della malattia stessa. Obiettivi specifici dello studio saranno quindi: i) caratterizzare i meccanismi patogenetici responsabili della neurodegenerazione nella CH in fasi differenti dello sviluppo della malattia; ii) valutare se, e in quali fasi, il blocco degli A2AR, possa rappresentare un target per prevenire o rallentare i processi degenerativi; iii) investigare se gli mGlu5 siano coinvolti nella patogenesi della CH.

Lo studio verrà effettuato utilizzando topi R6/2 transgenici che esprimono la mutazione umana nel gene dell'huntingtina (tg) e topi *wild type* (wt) nelle tre differenti fasi dello sviluppo della malattia (asintomatica, presintomatica e francamente sintomatica) per valutare a che tempi compaiono eventuali alterazioni. Nella prima fase dello studio, gli animali saranno caratterizzati dal punto di vista comportamentale attraverso il test dell'*open field* spaziale (che misura l'attività esplorativa e la risposta al riarrangiamento nello spazio di oggetti familiari o all'introduzione di nuovi oggetti) e l'*elevated plus maze*, un labirinto a croce rialzato utilizzato per la valutazione dell'ansia basata sulla naturale avversione ed evitamento dei roditori per gli spazi aperti (dove è più difficile difendersi) e sulla loro preferenza per gli spazi chiusi. Allo scopo di valutare la comparsa di disturbi motori, gli animali saranno sottoposti al *rota-rod test*, un test classico per lo studio della coordinazione dei movimenti che consiste in un cilindro rotante, a diverse velocità, con il quale viene valutato il tempo di permanenza degli animali sul cilindro in movimento. In una seconda fase verranno effettuati studi di elettrofisiologia per valutare la trasmissione sinaptica in fettine corticostriatali ottenute da topi tg e wt. Potenziali extracellulari di campo saranno registrati nello striato dorsale in seguito alla stimolazione delle vie afferenti corticali glutamatergiche allo scopo di valutare possibili differenze tra animali tg e wt nella trasmissione sinaptica basale o nella risposta alla stimolazione dei recettori A2A, mGlu5 o NMDA e nel caso, in quale fase della malattia tali differenze cominciano a manifestarsi. In una terza fase, attraverso la microdialisi cerebrale che consente tramite una cannula impiantata nello striato di raccogliere i fluidi extracellulari e di misurarne tramite HPLC i livelli extracellulari di glutammato, si potrà verificare se la modulazione del rilascio di glutammato da parte dei recettori A2A o dei recettori mGlu5 è modificata col progredire della malattia. Nell'ultima fase gli animali, nelle tre diverse fasi della malattia, saranno trattati cronicamente per via intraperitoneale con antagonisti selettivi dei recettori A2A e verrà valutato se, e in quale fase, il trattamento previene o ritarda la comparsa di eventuali alterazioni comportamentali, motorie o della trasmissione sinaptica evidenziate nelle fasi precedenti dello studio.

Risultati attesi nel triennio

Attraverso queste valutazioni sarà possibile capire se esistono nello sviluppo della malattia periodi critici in cui il blocco dei recettori A2A risulta avere effetti benefici o, al contrario, peggiorativi a seconda dei meccanismi degenerativi in atto al momento del trattamento. Inoltre, vista l'aumentata sensibilità alla tossicità da NMDA dimostrata nei topi R6/2, si valuterà se la capacità di agonisti mGlu5R di modulare l'attività dei recettori NMDA possa essere alterata nelle varie fasi della malattia.

Trasferibilità dei risultati

Essendo un progetto di ricerca di base, le ricadute saranno principalmente di tipo conoscitivo e porteranno a pubblicazioni scientifiche. Tuttavia tale studio potrà portare alla identificazione di nuovi bersagli terapeutici o finestre temporali importanti per la definizione di nuove strategie per il trattamento delle malattie neurodegenerative.

NIAQoL – Nuovi Inibitori Anti-HIV / Quality of Life Valutazione d'efficacia dei nuovi regimi terapeutici antiretrovirali nel modificare gli elementi che influenzano la qualità della vita delle persone con infezione da HIV. Studio pilota

Lo studio NIAQoL si inserisce all'interno di uno studio multicentrico di coorte (NIA – Nuovi Inibitori Anti-HIV) che si propone di analizzare i dati, raccolti nella routine della pratica clinica, provenienti da pazienti con infezione da HIV già trattati con farmaci appartenenti alle tre classi principali (IP, NRTI, NNRTI) e che iniziano una terapia con farmaci di diversa classe (inibitori della fusione, inibitori dell'integrasi, antagonisti del co-recettore CCR5, ecc.). Lo studio NIAQoL analizzerà in modo specifico informazioni derivanti da valutazioni espresse dello stesso paziente (misure paziente-centrate), attraverso misurazioni della qualità della vita correlata alla salute (HRQoL). Particolare attenzione verrà dedicata all'effetto di specifici quadri patologici, come la lipodistrofia, correlabili all'uso dei farmaci. Inoltre, le informazioni paziente-centrate verranno integrate con dati clinici, immunologici e virologici raccolti nell'ambito dello studio di coorte principale NIA. In tal modo, sarà possibile una valutazione completa e più approfondita dell'impatto delle nuove terapie antiretrovirali sui pazienti con infezione da HIV nel corso della comune pratica clinica.

È previsto il contributo di circa 20 centri clinici distribuiti sull'intero territorio nazionale

Risultati attesi nel triennio

Per il raggiungimento degli obiettivi verranno utilizzati tre questionari autosomministrati e validati:

- due questionari per la valutazione della HRQoL: un questionario generico (EQ-5D) e un questionario specifico per la popolazione HIV+ (ISSQoL);
- un questionario per valutare la relazione tra sindrome lipodistrofica e qualità della vita (ABCD).

Lo studio pilota NIAQoL avrà una durata iniziale di un anno. Alla fine di questo periodo saranno valutati i seguenti risultati preliminari:

- Misura del cambiamento della HRQoL nelle dimensioni esplorate dai tre questionari (ISSQoL, EQ-5D, ABCD).
- Misura dell'associazione tra i cambiamenti osservati nella HRQoL e altre variabili cliniche potenzialmente correlate ad essa.
- Misura dell'associazione tra i cambiamenti osservati nella HRQoL e i dati di efficacia (risposta immunologica e virologica) e sicurezza (es. reazioni avverse).

Lo studio, inoltre, si inserisce nel più ampio proposito di realizzare una rete stabile rivolta a monitorare la qualità della vita delle persone con infezione da HIV e intervenire sul territorio per modificare eventuali fattori (sanitari, socio-assistenziali, ecc.) che possano verosimilmente condizionarne il livello.

Trasferibilità dei risultati

Attraverso i risultati dello studio saranno ottenute informazioni direttamente riportate dal paziente sull'efficacia delle terapie antiretrovirali di recente introduzione. Le valutazioni paziente-centrate, insieme ai dati clinici e immuno-virologici raccolti nell'ambito dello studio di coorte principale NIA, permetteranno una valutazione più approfondita dell'impatto dei nuovi regimi terapeutici antiretrovirali sui pazienti HIV+ nel contesto della comune pratica clinica. Le informazioni prodotte dallo studio e diffuse attraverso pubblicazioni su riviste scientifiche potranno fornire un contributo significativo al SSN nella tutela della salute pubblica

Nuove molecole per lo studio di clustering omo ed eterodimerici del Recettore Opioido della Nocicettina

L'ipotesi dell'esistenza in membrana cellulare di formazioni oligomeriche di recettori GPCR ha di recente trovato riscontro in numerose evidenze sperimentali anche se il ruolo che l'oligomerizzazione può svolgere nella biosintesi e nel *trafficking* dei GPCR non è attualmente chiarito. La presenza di *clustering* di recettori oppioidi mu, delta e kappa è stata indagata farmacologicamente con l'ausilio di "ligandi bivalenti" costituiti da due farmacofori uniti da *linker* di opportuna struttura e lunghezza.

Attualmente esistono scarse evidenze sulla presenza di formazioni oligomeriche del recettore oppioide della nocicettina. Un'indagine sulla sua tendenza alla polimerizzazione potrebbe aiutare a comprenderne la variabilità di funzione e a definirne l'eventuale ruolo di target farmacologico nella terapia del dolore. Questa ricerca si propone di fornire un mezzo per lo studio della oligomerizzazione del recettore NOP attraverso lo sviluppo di nuove strutture bivalenti ad attività agonista, antagonista o mista agonista/antagonista della nocicettina.

Lo studio comprenderà le seguenti fasi:

- Sintesi e caratterizzazione di prototipi molecolari.
- Studio delle proprietà farmacologiche delle molecole dimeriche e dei rispettivi monomeri.
- Studio dell'interazione ligando-recettore con tecniche di Risonanza Magnetica Nucleare.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio proposto porterà all'individuazione di nuove strutture chimiche e alla definizione delle loro relazioni attività-struttura.

Le proprietà farmacologiche dei ligandi bivalenti messe confronto con quelle degli *scaffold* monomerici potranno fornire indicazioni utili circa la presenza di formazioni recettoriali oligomeriche del recettore NOP. Lo studio NMR del complesso ligando-recettore, nel mettere in evidenza le variazioni e preferenze conformazionali dei ligandi in interazione con la proteina, fornirà utili indicazioni per la progettazione di nuove strutture molecolari attive.

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni scientifiche.

Nuove strategie terapeutiche 7OCF/OCF1

Questo progetto si propone di sviluppare farmaci innovativi ed efficaci contro i tumori, concentrando l'attenzione sull'importanza del microambiente e del genoma tumorale nell'induzione della resistenza all'apoptosi delle cellule tumorali. Le UO1 e UO5 analizzeranno se i PPI inducono cambiamenti metabolici nelle cellule tumorali e se inibiscono il traffico delle micro vescicole acide. L'UO3 studierà il comportamento degli enzimi catepsine, noti regolare il potenziale metastatico, dopo aver modificato il microambiente tumorale. Gli anticorpi monoclonali (mAbs) vengono usati correntemente nelle terapie contro il cancro, ma è necessario scoprire nuovi bersagli tumorali verso cui produrne altri. Le UO2 e 4 produrranno mAbs diretti verso nuovi antigeni tumorali. L'UO5 valuterà se le micro vescicole tumorali costituiscono un componente importante nello sviluppo delle metastasi e se possono essere considerate un sistema specifico di trasporto dei farmaci verso il tumore. L'UO6 studierà l'efficacia dell'inibizione della RT (attraverso RNA interference mediato da adenovirus o da inibitori farmacologici), come nuove strategie inducenti il differenziamento cellulare contro il cancro. Questo approccio può essere particolarmente utile in tumori resistenti alle chemioterapie convenzionali. L'UO7 caratterizzerà i meccanismi molecolari responsabili dell'attività antiapoptotica della chinasi IκB. L'U.O.8 si occuperà dell'uso delle tossine batteriche dirette contro i recettori claudina-3 e -4 nel trattamento di pazienti con tumori in stadio avanzato.

Risultati attesi nel triennio

i) Caratterizzare il ruolo dei gradienti di pH tumorale nello sviluppo delle metastasi, definire il possibile effetto antineoplastico del trattamento anti-acido basato sull'uso degli inibitori delle pompe protoniche e identificare nuovi geni/proteine coinvolti nella regolazione del pH tumorale. ii) Ottenere immunosieri da animali contro nuovi antigeni tumore associati. (iii) Valutare il ruolo della catepsina B nelle metastasi tumorali. iv) Valutare l'effetto dell'espressione e inibizione di specifiche fosfolipasi, in relazione alla stimolazione di EGF e ErbB2 nelle cellule tumorali. v) Caratterizzare le proteine e i lipidi delle micro vescicole isolate dalle cellule tumorali. vi) Chiarire i meccanismi epigenetici RT-dipendenti, che controllano la crescita e il differenziamento cellulare e definire le condizioni per una terapia antitumorale basata sull'inibizione della RT endogena. vii) Identificare i meccanismi molecolari responsabili dell'attività anti-apoptotica del complesso della chinasi I κ B. viii) Valutare l'efficacia e la tossicità della terapia basata sui CPE in modelli murini immunodeficienti (SCID) clinicamente rilevanti. Sfruttare l'alta affinità di legame al CPE della claudina-3 e -4 per produrre proteine di fusione capaci di trasportare in modo specifico e selettivo composti terapeutici a tumori chemio-resistenti. ix) Ottenere frammenti variabili a singola catena (scFv) altamente specifici e produrre anticorpi monoclonali umani verso tutte le proteine caratterizzate.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti da questo progetto avranno un elevato potenziale dal punto di vista traslazionale, dal bancone alla clinica. Gli esempi maggiormente rilevanti sono: i) usare i composti anti-acidi, come i PPI, nel trattamento dei tumori umani, come nuovo approccio nella terapia antitumorale, ii) utilizzare mAbs umani sottoforma di scFv diretti verso nuovi antigeni tumorali, utili sia nel trattare tumori umani non responsivi, sia nel trasporto specifico di molecole antitumorali nel sito del tumore, iii) studiare l'efficacia degli inibitori dell'enzima PC-PLC nel trattamento del carcinoma mammario, iv) sviluppare protocolli di terapia antitumorale che induca il differenziamento di tumori umani, basati sull'inibizione endogena della RT, v) usare le tossine batteriche come farmaci antitumorali, per lo sviluppo di *trial* clinici in grado di prevenire la progressione del carcinoma ovarico chemio-resistente.

Nuovi approcci metodologici per la comprensione dell'eterogeneità genomica nelle malattie mentali con particolare attenzione alla schizofrenia

La comprensione dei meccanismi molecolari, che sono alla base delle malattie multi-geniche e multi-fattoriali, non può prescindere dallo studio del genoma in tutta la sua complessità, infatti solo il 2% codifica per proteine mentre il 45% è costituito da elementi ripetuti. In particolare gli elementi ripetuti attivi, quali le *long interspersed nucleotide sequence* (LINE1) e i retrovirus endogeni umani (HERV), possono contribuire alla regolazione dell'espressione genica. Studi precedenti hanno evidenziato la presenza di trascritti di HERV in campioni biologici di pazienti affetti da schizofrenia, autismo e disturbi bipolari (Frank, *et al.* 2005). In questo progetto studieremo parallelamente alle interazioni geni/ambiente anche il contributo degli elementi ripetuti; infatti l'estrema variabilità ed eterogeneità del fenotipo schizofrenico è difficilmente spiegabile senza l'azione regolativa degli elementi ripetuti che costituiscono l'*environment* genomico. Gli studi di associazione *genome-wide* (GWAS) saranno messi in relazione con la regolazione dell'espressione degli elementi ripetuti e, 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 della schizofrenia.

Risultati attesi nel triennio

Studi di correlazione tra l'espressione degli elementi ripetuti e il fenotipo schizofrenico. In campioni biologici di pazienti (cervello, fluido cerebrospinale e plasma) verranno valutati: i)

l'espressione degli elementi ripetuti e l'attività della trascrittasi inversa endogena; ii) le modificazioni epigenetiche (metilazione del DNA e acetilazione degli istoni); iii) l'eventuale presenza di riarrangiamenti della cromatina in seguito ad eventi di retro-trasposizione.

Successivamente nel modello animale verranno utilizzati farmaci in grado di modulare l'espressione degli elementi ripetuti, al fine di valutarne l'influenza sulla variabilità e sull'eterogeneità del fenotipo schizofrenico.

Trasferibilità dei risultati

Per poter disegnare una terapia che si adatti il meglio possibile al genotipo di un paziente bisogna considerare non solo la sequenza del suo DNA, ma la sua espressione, la sua traduzione e la sua regolazione epigenetica. Solo identificando nuovi target molecolari, quali gli elementi ripetuti, che partecipano alla definizione del fenotipo schizofrenico, potremo pensare a terapie innovative che influenzino non solo l'azione dei singoli geni, ma anche le componenti genomiche che ne regolano l'espressione. La trasferibilità di questa ricerca potrebbe consistere nell'associare alle terapie già in uso farmaci che siano in grado di modulare lo stato di attivazione degli elementi ripetuti, e quindi contribuire ad una maggiore efficacia nel trattamento della schizofrenia.

Nuovi consumi giovanili: supplementi dietetici, *energy drink*, droghe non droghe e farmaci psicotropi per il miglioramento delle performance psicofisiche

Nel corso degli ultimi anni, la letteratura internazionale da una parte e gli organi di informazione dall'altra, si sono sempre più spesso occupati di ricerche e notizie relative al consumo in continua ascesa di nuove sostanze volte al miglioramento delle performance fisiche e/o psichiche del soggetto.

Il miglioramento delle prestazioni fisiche viene ricercato attraverso il consumo spesso eccessivo e, per lo più senza controllo medico, di integratori dietetici contenenti vitamine, aminoacidi, creatina ecc.

Ben noto è inoltre il consumo, tra i giovani soprattutto, di bevande energetiche contenenti dosi elevate di caffeina (*Energy drink*), di *smart-drug* (le droghe-non droghe) e farmaci di natura anfetamino-simile quali il Ritalin (metilfenidato) o lo Sparlon (modafinil) per potenziare le capacità di veglia, di attenzione e di memoria.

Se da una parte le *smart drug*, gli integratori dietetici e le *energy drink* sono liberamente venduti in *Smart shop*, erboristerie, negozi naturalistici ecc., dall'altra esiste un commercio via internet che consente l'acquisto in totale anonimato di sostanze illecite o illecitamente vendute (quali farmaci psicoattivi o viagra).

Il Progetto di ricerca propone:

- la messa a punto, la validazione e la diffusione di questionari sull'uso di tutte le sostanze sopradescritte in *cluster* giovanili di alcune Regioni italiane e di diverse fasce di età (tra i 14 e i 35 anni), nonché la raccolta e la elaborazione dei dati prodotti per informare correttamente sui nuovi consumi giovanili;
- l'analisi quali-quantitativa e farmaco-tossicologica di queste nuove sostanze mediante cromatografia (liquida o gassosa) accoppiata alla spettrometria di massa.

Risultati attesi nel triennio

Similmente alle ricerche condotte in passato dal Reparto Farmacodipendenza, tossicodipendenza e doping sulle prime *Smart drug* in commercio in Italia, si provvederà, attraverso l'utilizzo di analisi in gas cromatografia o cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa di identificare e quantificare i principi attivi contenuti nei nuovi prodotti in commercio con le caratteristiche sopramenzionate. Si provvederà inoltre ad effettuare estese ricerche bibliografiche sulla farmacologia di questi principi attivi, sugli eventuali effetti avversi

a breve e lungo termine, su intossicazioni riportate e sulle eventuali interazioni farmacologiche con altre sostanze, al fine di tracciare un quadro completo sulla sicurezza d'uso di tali prodotti. Il principio guida di chi si occupa di salute pubblica, e dunque anche l'obiettivo principe del presente progetto, è quello di tentare di salvaguardare la salute degli individui non solo attraverso l'ausilio del legislatore, ma anche attraverso la promozione diretta di campagne di educazione/sensibilizzazione che forniscano all'utente le informazioni necessarie a difendere la propria salute. Il presente progetto intende colmare vuoti di carattere scientifico/istituzionale su prodotti di nuova generazione di cui poco o nulla si conosce circa la sicurezza nell'uso o l'efficacia nel trattamento.

Trasferibilità dei risultati

I risultati dello studio saranno oggetto di pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali, in modo da renderli accessibili alla comunità scientifica. Inoltre, dati del progetto, laddove particolarmente interessanti, potranno essere presentati a convegni nazionali e internazionali specifici. Poiché il Progetto è stato finanziato dal Dipartimento della Gioventù della Presidenza del Consiglio dei Ministri, verranno prodotti dei report di cui si potrà prevedere la diffusione nelle scuole primarie e secondarie.

Operazione Naso Rosso

Il progetto Operazione Naso Rosso si propone sia di sensibilizzare i giovani sul tema della sicurezza stradale e della responsabilità della guida per prevenire il fenomeno delle stragi del sabato sera, sia di sperimentare nuovi modelli d'intervento come la misura del tasso alcolemico all'uscita dalle discoteche e riportare a casa chi non è in grado di guidare.

Il progetto intende valutare se nelle Province italiane in cui si svolgerà l'Operazione Naso Rosso ci sarà una diminuzione di incidenti stradali, di morti e di feriti.

Le attività previste dal progetto saranno relative alla: i) ricerca e identificazione dei principali luoghi di aggregazione e di divertimento giovanile; ii) formazione delle unità di contatto e di accompagnamento; iii) formazione degli educatori al *counseling*; iv) formazione dei gestori e del personale dei locali notturni; v) elaborazione e predisposizione del materiale informativo/prevenzione destinato ai giovani; vi) costruzione di un pacchetto formativo e identificazione dei locali che sottoscrivono gli standard di qualità dei locali di divertimento notturno; vii) identificazione e predisposizione della *location* all'interno della quale svolgere attività di *counseling* e accompagnamento; viii) avvio di attività/punti informativi di *counseling* e accompagnamento; ix) istituzione di un numero verde che fornisce informazioni sul progetto; x) attivazione di un sito internet in collegamento con Dipartimento della Gioventù della Presidenza del Consiglio dei Ministri.

Risultati attesi nel triennio

Ridurre il numero di morti e feriti per incidenti stradali causati dall'alcol.

Trasferibilità dei risultati

I risultati dello studio saranno oggetto di pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali, in modo da renderli accessibili alla comunità scientifica.

La fase attuativa del progetto prevede la raccolta dei dati statistici ed epidemiologici nelle discoteche sugli interventi effettuati e verifica presso Prefetture, PS e forze dell'ordine, degli incidenti notturni nei giorni di intervento a confronto con gli anni precedenti. Verrà dunque prodotta una relazione sulle osservazioni emerse, al fine di arricchire il quadro epidemiologico del fenomeno sia a livello territoriale che nazionale. Inoltre, dati del progetto, laddove particolarmente interessanti, potranno essere presentati a convegni nazionali e internazionali specifici. Verranno prodotti dei report di cui si potrà prevedere la diffusione nelle scuole primarie e secondarie o negli ambienti tipici di aggregazione giovanile.

Profilo beneficio\rischio dei trattamenti farmacologici per la terapia delle patologie psichiatriche a maggior prevalenza e lo impatto in pediatria e adolescenza: ADHD, depressione maggiore, psicosi. Studio osservazionale di fase 4

Studio osservazionale, fase 4 per indagare i meccanismi di azione degli psicofarmaci in relazione al rapporto beneficio\rischio: studio di genetica su sottopopolazioni (*non responders*, ADR). Definire il profilo beneficio\rischio nella popolazione pediatrica delle principali categorie di psicofarmaci: SSRI, antipsicotici, psicostimolanti. 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, stratificati per posologia (bassa, media, alta) e per età (7-11; 12-18).
- Incidenza degli eventi avversi per tipo e gravità. Descrizione, per causa, dei pazienti che interrompono la terapia.
- Valutazione dell'effetto dei farmaci sulla crescita somatica 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.

L'analisi degli eventi avversi sarà fatta con metodi bayesiani che permettono di "amplificare il segnale" rappresentato da ogni singolo evento avverso.

Risultati attesi nel triennio

Stima puntuale del rischio globale di insorgenza di eventi avversi per principio attivo e categoria terapeutica (SSRI, Antipsicotici, Psicostimolanti, SNRI). Stima del rischio (OR) di insorgenza di eventi avversi gravi: eventi cardiovascolari, epatotossicità, ideazione suicidaria, ritardo o arresto della crescita somatica e della maturazione sessuale, allucinazioni, psicosi iatrogena. Valutazione nella popolazione pediatrica reale del profilo beneficio\rischio. Incidenza d'uso di alcune categorie di farmaci psicotropi nella popolazione italiana in età evolutiva.

Trasferibilità dei risultati

I risultati saranno utili alle Agenzie regolatorie nazionali (AIFA) e internazionali (EMA, FDA) per i provvedimenti necessari a garantire l'uso appropriato di queste categorie di farmaci nella popolazione pediatrica.

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 che seguono donne HIV-positivie in gravidanza e i loro neonati su tutto il territorio nazionale in oltre 35 centri clinici.

Alla data odierna (marzo 2009), le gravidanze segnalate al progetto sono oltre 2.000, con un ritmo costante di circa 250-300 segnalazioni/anno. I medici partecipanti e i membri dell'*advisory board* del progetto ricevono periodicamente un report aggiornato sui dati raccolti. Lo studio ha raccolto e diffuso importanti informazioni, che comprendono aspetti demografici e clinici sulle caratteristiche delle donne HIV-positivie in gravidanza, dati di sicurezza nella madre, andamento clinico ed immunologico durante la gravidanza, uso di farmaci antiretrovirali durante la gravidanza e il parto, ricoveri e relative patologie responsabili, esiti e durata della

gravidanza. Le informazioni ottenute hanno rilevanza particolare in quanto illustrano un fenomeno precedentemente esplorato in maniera soltanto parziale a livello nazionale.

Si prevede di continuare la sorveglianza a lungo termine, con particolare riferimento alla definizione della sicurezza dei nuovi farmaci antiretrovirali sia nelle madri che nei neonati esposti.

Risultati attesi nel triennio

L'ampia casistica del progetto verrà utilizzata per analisi che affiancheranno quelle già pubblicate, approfondendo la valutazione della sicurezza degli antiretrovirali e la definizione di aspetti epidemiologici, virologici e di farmacocinetica. Le valutazioni previste per il prossimo triennio includono: i) lo studio delle relazioni fra terapia antiretrovirale ed esiti della gravidanza, con particolare riferimento ad abortività, parto pretermine, difetti congeniti, complicanze della gravidanza e del parto; ii) la definizione di frequenza e determinanti di condizioni di rischio per la trasmissione verticale dell'infezione (diagnosi e terapia tardiva, cesareo d'urgenza e parto vaginale, elevata carica virale); iii) 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; iv) la definizione dei possibili rischi per i neonati non infetti della esposizione prenatale e postnatale agli antiretrovirali; la definizione di frequenza, caratteristiche e significato prognostico della farmacoresistenza agli antiretrovirali in gravidanza; v) farmacocinetica degli antiretrovirali in gravidanza.

La durata del progetto è aperta, allo scopo di eseguire un monitoraggio continuo sui farmaci anti-HIV di nuova introduzione. Sono inoltre previsti collegamenti e scambio di dati con altri network per integrazione reciproca di dati mancanti e 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 farmacosorveglianza in gravidanza, nella gestione della gravidanza in donne con infezione da HIV, e nello studio degli effetti della terapia.

Progetto Trial clinico di fase II randomizzato sull'uso dei PPI nel trattamento del cancro alla mammella

Lo scopo principale di questo studio è valutare se il pretrattamento con l'esomeprazolo seguito dalla chemioterapia rispetto al solo trattamento di chemioterapia sia capace di controllare la progressione della malattia nei pazienti con cancro alla mammella metastatico e recidivo nonché migliorare la tollerabilità alla chemioterapia.

Il nostro primo obiettivo sarà capire se il pretrattamento con esomeprazolo seguito da una combinazione di "taxotere" e cisplatino siano in grado di rallentare il tempo della progressione (TTP) del tumore alla mammella metastatico e recidivo rispetto al solo utilizzo di trattamenti chemioterapici.

Il secondo step delle nostre ricerche sarà rivolto alla valutazione delle risposte complessive, in ciascun braccio, al trattamento: tempi e durata della risposta (in pazienti che rispondono alla terapia), tempi del fallimento (in pazienti che non rispondono alla terapia) e tassi di sopravvivenza.

Circa 90 pazienti saranno arruolati per uno studio clinico aperto randomizzato di Fase II. Questi pazienti saranno randomizzati su tre tipologie di trattamento: i) chemioterapia; ii) chemioterapia con esomeprazolo 160 mg al giorno; iii) chemioterapia con esomeprazolo 200 mg al giorno.

L'assegnazione randomizzata sarà pari a "1:1:1" e il trattamento, in tutti i bracci sperimentali, avrà una durata di 18 settimane per la chemioterapia e 15 mesi per l'esomeprazolo.

Ogni paziente sarà clinicamente valutato al *baseline* e ogni sei settimane, cioè 11 valutazioni di follow up dopo il *baseline*.

Risultati attesi nel triennio

Il primo *endpoint* dello studio è il tempo di progressione del tumore (TTP) o di morte.

Questo è definito come il tempo che intercorre fra la data di randomizzazione e il momento di progressione della malattia o morte dovuta ad una qualsiasi causa, e si baserà sulla popolazione *per-protocol*.

I pazienti senza progressione della malattia, né morte saranno censiti alla data ultima di assenza di progressione della malattia.

I pazienti per i quali non è stata fatta una valutazione del tumore dopo il *baseline*, ma che sono ancora vivi al momento del *cut-off* dei dati clinici, saranno censiti al giorno 1.

L'analisi dell'efficacia primaria (*per-protocol*) sarà ripetuta per la popolazione *intent-to-treat* (tutti i pazienti randomizzati). I risultati di questa analisi *intent-to-treat* saranno confrontati con i risultati dell'analisi *per-protocol*.

Possibili incongruenze nei risultati delle due analisi saranno analizzate e chiarite nella relazione finale.

Sia per l'una che per l'altra popolazione esaminate saranno riportati i risultati di un modello di regressione dei rischi proporzionali per accertare l'affidabilità dell'analisi primaria.

Il modello includerà anche il trattamento, l'età e l'eventuale precedente trattamento con paclitaxel (si/no).

Oltre ai rapporti di rischio e agli intervalli di confidenza del 95% correlati, i risultati di queste analisi saranno riassunti per ciascun braccio di trattamento mediante grafici di Kaplan-Meier, le mediane e gli intervalli di confidenza del 95%.

I nostri obiettivi saranno ovviamente rivolti ad ottenere una risposta clinica in termini di tasso complessivo di risposta e sopravvivenza totale al fine di supportare l'efficacia dei PPI nel miglioramento delle terapie esistenti contro il cancro della mammella.

Trasferibilità dei risultati

Nel caso in cui questo studio produrrà dati a supporto dell'efficacia dei PPI per il trattamento del tumore della mammella metastatico e recidivo, costituirà la prima evidenza clinica del potenziale effetto antineoplastico del trattamento antiacido, basato sull'inibizione di pompe protoniche.

Progettualità per il piano triennale 2009-2011, del gruppo di lavoro "Area sostanze naturali"

L'argomento "Sostanze Naturali" all'interno dell'ISS può essere considerato sotto molteplici punti di vista: i) Ricerca, ii) Controllo, iii) Divulgazione scientifica.

Esistono poi le aree di interesse che possono inquadrare una sostanza naturale come: i) Farmaco, ii) *Herbal products* (nell'ambito della Medicina Tradizionale di ciascuna nazione,

Fitoterapia), iii) Integratore alimentare, iv) Dispositivo medico, v) Rimedio omeopatico, vi) •Cosmetico. Queste aree non sono sempre distinguibili nettamente tra loro, tant'è che sia a livello di Organizzazione Mondiale della Sanità che di Agenzie Europee (EMEA ed EFSA) sono in atto tutta una serie di studi e approfondimenti per fare chiarezza e dare delle linee guida. In questo contesto, l'ISS, in collaborazione con il Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, l'AIFA e alcune strutture istituzionali e scientifiche, ha il ruolo di approfondire in ambito soprattutto nazionale questa tematica sia dal punto di vista scientifico che valutativo, attività che peraltro già sostiene.

– Attività correnti

- Gruppo di lavoro denominato “Piante e derivati destinati al consumo umano”. Ha come obiettivo quello della valutazione delle piante ammesse negli integratori alimentari. Collaborazioni esterne: Direzione generale della sicurezza degli alimenti e della nutrizione del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, European Food Safety Authority (EFSA) (Parola chiave: integratori alimentari).
- Gruppo di Studio “Terapie Innovative e Sostanze Naturali” (TISNa). Questo gruppo di studio, trasversale all'ISS, si pone l'obiettivo di approfondire le tematiche scientifiche sulle sostanze naturali attraverso incontri, workshop e convegni. (Parola chiave: sostanze naturali).
- *WHO working group on clinical studies on phytotherapy*. Questo gruppo ha lo scopo di pianificare Linee Guida internazionali sugli studi clinici in Fitoterapia. Collaborazioni esterne: WHO, *WHO Collaborating Centre for Traditional Medicine* dell'Università degli Studi di Milano. (Parole chiave: fitoterapia, medicina tradizionale).

– Linee strategiche di ricerca per il triennio

- Costituzione di un network collaborativo per l'ottimizzazione dei flussi informativi relativi ai prodotti delle medicine tradizionali utilizzati in Italia. Tale progetto ha come obiettivo la creazione di un database multidisciplinare per i prodotti appartenenti alle Medicine Tradizionali utilizzati in Italia. In relazione a questa attività sono previsti due convegni per il 2009 riguardanti le medicine tradizionali cinese e ayurvedica. Collaborazioni ISS: Dipartimento del Farmaco (Reparto di Farmacodipendenza, tossicodipendenza e doping), Centro nazionale di Epidemiologia, sorveglianza e promozione della salute, Dipartimento Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Dipartimento Ambiente e connessa prevenzione primaria, Ufficio Relazioni Esterne. Collaborazioni esterne: Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, AIFA, Forze dell'Ordine (Ministero Grazia e Giustizia, NAS, Finanza, Polizia), Università, CNR, Federfarma, esperti in Medicina Tradizionale Cinese, Ayurveda, Fitoterapia. (Parole chiave: integratori alimentari, fitoterapia, sostanze naturali, cosmetici, fitoterapia, medicina tradizionale).
- Convenzione con l'azienda ABOCA, di durata 18 mesi iniziali. Sta per essere iniziato uno studio atto a stabilire una metodologia di discernimento tra dispositivo medico e farmaco, in ambito di fitocomplessi opportunamente lavorati. Gruppo di lavoro ISS: Dipartimento del Farmaco, Dipartimento Ambiente e connessa Prevenzione Primaria. Collaborazioni esterne: ABOCA. (Parola chiave: dispositivo medico).
- Nell'ambito dell'oncologia pediatrica, pianificazione di studi di fase I-III sui tumori solidi individuati in precedenza in collaborazione con l'IRCCS “G. Gaslini” di Genova. In particolare, traslare i risultati ottenuti *in vitro* e/o su modello animale da alcuni gruppi di ricercatori dell'ISS: studi *in vitro* sull'uso di sostanze naturali estratte da piante sembrano promettenti ed è ragionevole intraprendere studi clinici. Questi ultimi possono essere disegnati con metodi nuovi che permettano di ridurre il numero

di bambini coinvolti e il loro tempo di esposizione ai farmaci in studio. (Parole chiave: sostanze naturali, farmaco).

- Proseguimento dell'attività nell'ambito del *WHO working group on clinical studies on phytotherapy*. Pianificazione di linee guida internazionali in fitoterapia. (Parole chiave: fitoterapia, medicina tradizionale).
- Proseguimento dell'attività nell'ambito del gruppo di lavoro denominato "Piante e derivati destinati al consumo umano". (Parola chiave: integratori alimentari).
- Proseguimento dell'attività nell'ambito del Gruppo di Studio "Terapie Innovative e Sostanze Naturali" (TISNa). Pianificazione di incontri, workshop e convegni. (Parola chiave: sostanze naturali).

Progettualità per il triennio 2009-2011 del Reparto di Farmacologia preclinica

Il Reparto continuerà a svolgere attività nel settore della farmacologia previsionale in patologie di organi vitali quali cuore e cervello. Gli studi consentiranno approfondimenti dei modelli sperimentali utilizzati per l'inquadramento di nuovi farmaci da sviluppare in clinica nella progressione e nel contenimento dello scompenso cardiaco e delle patologie neurodegenerative. L'impiego di farmaci di uso clinico ben consolidato e delle tecniche di biochimica e biologia molecolare, anche in animali geneticamente modificati, consentirà di aumentare le conoscenze sui meccanismi dei modelli sperimentali e sulla loro capacità predittiva. Ciò potrà contribuire da un lato alla validazione dei modelli e dall'altro all'identificazione di nuove strategie terapeutiche per queste patologie.

Sono previsti tre protocolli sperimentali volti a studiare i determinanti biochimici dei processi di proliferazione e differenziamento neuronale e l'espressione genomica comparativa nelle diverse fasi dello scompenso cardiaco:

- Definizione del meccanismo alla base dell'efficacia clinica nello scompenso cardiaco di alcuni beta-bloccanti (carvedilolo, metoprololo) ma non di altri (ad es. bucindolo). Gli studi riguarderanno le modifiche geniche a livello cardiaco dopo somministrazione *in vivo* del beta-bloccante propranololo, anche con l'impiego di animali geneticamente modificati.
- Identificazione dei meccanismi molecolari che regolano l'espressione genica fetale nell'ipertrofia cardiaca da sovraccarico pressorio. Gli studi *in vivo*, su animali *wild type* e geneticamente modificati (beta2KO, beta1,beta2DKO), e *in vitro*, su colture di miocardiociti neonatali di ratto, esamineranno le vie di trasduzione del segnale coinvolte nell'inibizione del sistema beta-adrenergico Gs-mediato sull'espressione genica fetale indotta dall'attivazione del sistema alfa1-adrenergico Gq-mediato, individuandone in particolare i geni e le corrispondenti proteine interessate.
- Studio *in vitro* dei processi di differenziamento e proliferazione delle cellule neuronali nelle cellule neuronali da embrioni di ratto. Saranno studiati i meccanismi responsabili dell'effetto neurotossico, e della sua reversibilità, in particolari condizioni di coltura (concentrazioni micromolari, nelle fasi precoci di coltura) di farmaci ad uso clinico consolidato (fluoxetina, desipramina, mifepristone) o sperimentali (PK11195, Ro 5-4864), rispetto ad altri che sembrano avere un effetto ancora non ben definito (buspirone, benzodiazepine). Ciò consentirà approfondimenti sul possibile ruolo dei neurotrasmettitori monoaminergici (DA, NE e 5-HT) e dei processi di steroidogenesi a livello mitocondriale nei meccanismi di neuroprotezione/neurotossicità.

La ricaduta di questa attività in ambito regolatorio consiste nella formulazione di pareri in questi settori di competenza per:

- L'ammissibilità di nuovi farmaci sperimentazione clinica di fase I ("comma C", DPR 439/2001)
- L'autorizzazione in deroga per la sperimentazione animale (art. 8 e 9, DL.vo 116/92)
- L'efficacia e tollerabilità dei farmaci (AIFA, EMEA, altri organismi pubblici e privati).

Il Reparto comprende le seguenti unità operative:

- Neuropsicofarmacologia sperimentale
- Fisiopatologia cardiovascolare sperimentale.

Progettualità per il triennio 2009-2011 del Reparto di Farmacologia biochimica e Unità di coordinamento dell'attività di consulenza tecnico scientifica

Attività di valutazione

Valutare qualità e sicurezza dei medicinali è uno degli obiettivi programmatici del Reparto e coinvolge tutti i ricercatori che vi afferiscono, che operano già da molti anni a supporto delle attività di autorizzazione alle sperimentazioni di fase I e di registrazione europea dei prodotti medicinali. Nell'ultimo decennio, l'accelerazione dei processi di sviluppo dei medicinali e la simultanea necessità di operare su mercati sempre più globali, hanno spinto il mondo farmaceutico verso un percorso di standardizzazione di alcune sue pratiche fondamentali, per cui lo sviluppo dei medicinali richiede attualmente l'applicazione di una metodologia internazionalmente codificata, aderente a norme e linee guida internazionali. Presupposto per poter formulare un rapporto di valutazione di standard internazionale è perciò la conoscenza di queste norme e linee guida, e non ultimo delle procedure di buona pratica (GMP, GLP, GCP) che ne regolano la produzione e la sperimentazione non e clinica. La sempre maggiore integrazione europea anche nel campo dei medicinali e, d'altro lato, la tendenza ad assumere forti poteri decisionali in campo di assistenza farmaceutica da parte delle regioni italiane sta creando una forte esigenza di personale qualificato che sia in grado di valutare le informazioni precliniche e cliniche sui farmaci, dai punti di vista più diversi.

- Obiettivi

- Al momento non esiste una Struttura Valutativa Nazionale, che operi fornendo non solo valutazioni di standard europeo, ma anche formazione di valutatori e procedure di buona prassi in ambito valutativo. L'obiettivo principale del Reparto nei prossimi tre anni sarà volto all'analisi degli atti normativi mediante i quali formalizzare la creazione di un Programma Nazionale Formazione Valutatori (PNFV), attraverso una struttura che operi stabilmente all'interno del Dipartimento del Farmaco, in considerazione della riconosciuta esperienza pluriennale accumulata sul campo da un consistente numero di valutatori del Dipartimento. Il PNFV dovrà fornire una formazione agli esperti interni all'ISS che intendono acquisire la professionalità come valutatori, e inoltre avere on la possibilità di interagire direttamente con AIFA, Comitati Etici, e con i Servizi Sanitari Regionali. Gli assessorati regionali alla sanità e le aziende sanitarie (AUSL e Ospedali), infatti, in particolare alla luce della più recente normativa di tipo "devolutivo", hanno parimenti una forte esigenza di personale qualificato che sia in grado di valutare le informazioni precliniche e cliniche sui farmaci, dai punti di vista più diversi.
- I DL.vi 211/2003, 200/2007 e DPR 430/2001 hanno indicato l'ISS come l'Autorità Competente per l'autorizzazione di tutte le sperimentazione cliniche di Fase I, da condursi sul territorio nazionale. Il Reparto partecipa a tale attività attivamente con tutto il personale laureato del Reparto, che è anche parte della Segreteria Tecnico Scientifica della Commissione di fase I. Poiché le nuove normative hanno avuto un forte impatto regolatorio sulle sperimentazioni di fase I non commerciali condotte in

IRCSS, ospedali, Centri di Medicina nucleare ecc., le richieste di chiarimenti da parte di ricercatori di questi siti, è andata aumentando in maniera esponenziale nell'ultimo anno. Vi è quindi l'intento di promuovere lo sviluppo di uno sportello informatico informativo sul territorio nazionale (www.Info-Reg.gov.it), in collaborazione con il servizio informatico del Dipartimento. Tale sito più interattivo dell'attuale sito web della fase I, sarà mirato a fornire contenuti relativi al complessivo contesto normativo, sulle linee guida disponibili e sulle procedure di preparazione dei dossier dei prodotti in investigazione (IMPD), con sezioni dedicate per tipo di farmaco (chimico, biologico, terapia avanzata, radiofarmaco ecc.) e alla loro presentazione e inserimento nelle banche dati specifiche (Osservatorio delle sperimentazioni cliniche) come da Decreto Ministeriale dicembre 2007.

Attività di ricerca

La metodologia con cui procedere alla valutazione della qualità, sicurezza ed efficacia di nuove sostanze si è modificata nel corso dei tempi, ed è ormai unanimemente riconosciuto che solo un approccio che obbedisce a principi scientifici rappresenta la più affidabile base di valutazione (*Scientific Based Drug Assessment* o valutazione scientifica dei dati – SBDA). L'SBDA è lo strumento per proteggere la salute pubblica sia durante la fase autorizzativa dello sviluppo di un prodotto medicinale, che per la sua registrazione. L'attività di ricerca del Reparto è finalizzata primariamente a mantenere elevata e ad accrescere la capacità di SBDA dei singoli ricercatori permettendo loro di formulare rapporti valutativi di elevato standard internazionale. Le ricerche sono volte all'analisi dei meccanismi di effetto/tossicità dei medicinali di origine chimica e contenenti sostanze naturali di origine vegetale, allo sviluppo di una banca dati struttura attività, con particolare riguardo agli effetti epatotossici.

Nel Reparto sono in corso i seguenti progetti:

- Sostanze naturali ad attività anticolinesterasica estratte da piante appartenenti alla flora sud americana: valutazioni fitochimico-analitiche degli estratti, caratterizzazione del meccanismo d'azione e delle cinetiche di inibizione enzimatica
 Obiettivi: analizzare la potenzialità di nuove molecole ad attività anticolinesterasica derivate da sostanze vegetali. L'interesse verso le attività biologiche delle sostanze naturali si è notevolmente ampliato negli ultimi anni e il progetto intende anche proporre protocolli per una corretta valutazione della sicurezza di questi prodotti, al fine di un loro eventuale sviluppo come prodotti medicinali, o approcci valutativi diversificati per eventuali sviluppi quali integratori.
 I nuovi orientamenti delineati dalle Direttive comunitarie nell'ambito degli integratori alimentari e cosmetici obbligano che il percorso produttivo sia effettuato in conformità ai sistemi di qualità, garantendo il monitoraggio attraverso un piano di autocontrollo degli aspetti legati alla tossicità "estrinseca" (es. problemi di contaminazione e/o adulterazione). Sono invece oggetto di discussione tutti gli aspetti relativi alle proprietà biologiche/farmacologiche e tossicologiche "intrinseche" del prodotto contenente sostanze vegetali e che rappresentano il discriminante per la corretta collocazione sul mercato o per il ritiro da esso. Il panorama delle criticità nel processo valutativo è molto più ampio di quello accennato e gli strumenti tecnici a disposizione del valutatore (es. liste positive e negative di specie vegetali/sostanze naturali ammesse o non ammesse nelle categorie rispettive di appartenenza), a volte sono insufficienti inducendo ad un approccio valutativo molto complesso e basato sull'approccio caso per caso.
- Influenza del genere sulle alterazioni della funzionalità endoteliale coinvolte nella patogenesi della vasculopatia diabetica
 Obiettivi: verificare l'ipotesi che la disfunzione endoteliale della vasculopatia diabetica venga determinata da alterazioni qualitative e/o quantitative dei fattori di origine

endoteliale con modalità diverse nei due sessi. S'intende inoltre valutare la possibilità che medicinali di origine vegetale siano fonte di nuove entità molecolari potenzialmente utili per la terapia farmacologica a sostegno delle complicanze vascolari e infiammatorie del diabete. Poiché la disfunzione endoteliale rappresenta un *biomarker* precoce di alterazione cardiovascolare, l'esperienza acquisita può essere estesa alla sua caratterizzazione in patologie diverse da quella diabetica.

- Banca dati su effetti epatotossici da farmaci
Obiettivi: l'insorgenza di effetti avversi è una delle cause principali di ritiro dal mercato di farmaci, dell'interruzione del loro sviluppo o della necessità di inserire speciali avvertenze nei foglietti illustrativi, pur se autorizzati sulla base delle attuali richieste regolatorie standard. I farmaci possono avere effetti tossici per il fegato a causa di disordini del sistema enzimatico di metabolizzazione dei farmaci. Non esistono fonti ufficiali commerciali o pubbliche, che forniscono informazioni sui dati tossicologici correlati alla struttura chimica. È stata quindi creata una Banca Dati in grado di fornire tali informazioni. La prima analisi dei dati raccolti, sarà indagare se vi possa essere una stratificazione degli effetti relativa al sistema enzimatico di metabolizzazione di fase I (CYP 450) o 2 (metabolismo glutazione dipendente) o alla reazione con il DNA di cellule epatiche causandone la morte. Tale analisi è considerata propedeutica a indagini tossico genomiche, volte all'individuazione di *biomarker* di tossicità epatica.
- Attività di supporto regolatorio, revisione dello scenario normativo regolatorio nazionale ed europeo e realizzazione di *consensus document* e *conference*
Obiettivi: Il momento della prima somministrazione all'uomo rappresenta una pietra miliare nello sviluppo di una nuova terapia ed è anche il primo passo del processo autorizzativo, in accordo al DL.vo 211/2003, che recepisce la Direttiva europea 2001/20/EC. Alcuni punti della Direttiva hanno avuto un consistente impatto sulla produzione e sperimentazione non clinica dei medicinali (piccole molecole chimiche, biologici, vaccini, terapie geniche e cellulari) e in particolare sulle sperimentazioni cliniche accademiche. La Direttiva richiede infatti che per ogni sperimentazione l'applicazione delle norme di buona pratica regolatoria, vale a dire dai principi delle buone pratiche di fabbricazione, di laboratorio e cliniche (GMP, GLP e GCP). Questo aspetto è un cambiamento estremamente significativo rispetto alla situazione pre direttiva, e in grado di rallentare lo sviluppo proprio dei prodotti non industriali derivati da indagini di investigatori indipendenti, la cui preparazione poteva avvenire in strutture ospedaliere e cliniche universitarie, in cui la gestione dell'incrementato carico regolatorio può risultare problematica anche a causa della mancanza di esperti regolatori. Obiettivo principale del WP4 è la realizzazione di attività di supporto regolatorio volte a coprire questa carenza e a creare gli strumenti per una più rapida interazione fra ricercatori clinici e autorità regolatorie. Il raggiungimento di tale obiettivo potrebbe ridurre i tempi della ricerca translazionale e consentire un più rapido trasferimento dei risultati di laboratorio al letto del malato, senza influenzare la sicurezza del paziente.

Progettualità per il triennio 2009-2011 del Reparto Farmacodipendenze, tossicodipendenze e doping

Nel Reparto Farmacodipendenze, tossicodipendenze e doping si eseguono attività di ricerca, controllo, formazione ed informazione.

Attività di ricerca

Il Reparto è impegnato nell'attuazione dei seguenti Progetti:

- Valutazione dell’esposizione prenatale ad alcol, tabacco e sostanze d’abuso mediante l’analisi di biomarcatori in meconio neonatale. Lo studio si propone di individuare: i) la prevalenza dell’esposizione cronica fetale, conseguente al consumo materno in gravidanza, all’alcol, tabacco e a sostanze d’abuso; ii) mettere a punto e validare nuove metodologie d’analisi specifiche e sensibili utili per la monitoraggio routinario ospedaliero dell’esposizione neonatale; iii) correlare i risultati ottenuti con le variabili sociodemografiche materne e antropometriche e somatometriche del neonato e con osservazioni cliniche su quest’ultimo.
- *Help-mild*: identificazione del rischio individuale di tumore al polmone nei fumatori mediante analisi del profilo di proteomica in soggetti sottoposti a tac a spirale o controllo. Il Progetto MILD (*Multicenter Italian Lung cancer Detection*) ha l’obiettivo di ridurre la mortalità per cancro polmonare in soggetti ad alto rischio utilizzando la TAC spirale associata a un programma di prevenzione primaria per la disassuefazione da fumo. Il Progetto MILD si propone inoltre di identificare il rischio individuale di tumore al polmone nei forti fumatori mediante analisi del profilo proteomico, ponendo particolare attenzione all’infiammazione polmonare e altri eventi biologici correlati alla carcinogenesi indotta dal tabacco. I danni funzionali saranno misurati mediante spirometria.
- Operazione Naso Rosso. Il progetto Operazione Naso Rosso si propone sia di sensibilizzare i giovani sul tema della sicurezza stradale e della responsabilità della guida per prevenire il fenomeno delle stragi del sabato sera, sia di sperimentare nuovi modelli d’intervento come la misura del tasso alcolemico all’uscita dalle discoteche e riportare a casa chi non è in grado di guidare.

Attività di controllo

Per quanto concerne le attività di controllo, il Reparto è impegnato nell’attuazione dei seguenti Progetti:

- Valutazione esterna di qualità sull’analisi delle sostanze d’abuso in matrice cheratinica: HAIRVEQ. L’HAIRVEQ propone il modello del “miglioramento continuativo” attraverso un confronto diretto e costante con i Laboratori che aderiscono al Progetto, che si realizza attraverso iniziative quali: i) l’invio ai partecipanti di Procedure Analitiche Standard (o *standard operating procedure*, SOP), ii) l’invio di campioni di capelli a concentrazione nota (campioni open) per verificare l’accuratezza dei dati prodotti, iii) l’invito ai Laboratori stessi ad allineare i loro *cut-off* con quelli utilizzati, a livello internazionale, dalla SOHT (*Society of Hair Testing*).
- Valutazione esterna di qualità sull’analisi delle sostanze d’abuso in saliva: ORALVEQ. Seguendo i dettami della Qualità applicata ai Laboratori di Analisi Cliniche, l’ORALVEQ propone il modello del “miglioramento continuativo” attraverso un confronto diretto e costante con i Laboratori che aderiscono al Progetto, che si realizza ad esempio attraverso iniziative quali l’invio ai partecipanti di Procedure Analitiche Standard (o *standard operating procedure*, SOP) o l’invio di campioni di saliva a concentrazione nota (campioni open) per verificare l’accuratezza dei dati prodotti.
- Nuovi consumi giovanili: supplementi dietetici, *energy drink*, droghe non droghe e farmaci psicotropi per il miglioramento delle performance psicofisiche. Il Progetto di ricerca propone: i) di mettere a punto la validazione e la diffusione di questionari sull’uso e la diffusione di nuove bevande energetiche contenenti dosi elevate di caffeina (*Energy drink*), di *smart-drug* (le droghe-non droghe) e farmaci di natura anfetamino-simile quali il Ritalin (metilfenidato) o lo Sparlon (modafinil). I questionari saranno diffusi in *cluster* giovanili di alcune Regioni italiane e di diverse fasce di età (tra i 14 e i 35 anni); ii)

effettuare l'analisi quali-quantitativa e farmaco-tossicologica di queste nuove sostanze mediante cromatografia (liquida o gassosa) accoppiata alla spettrometria di massa.

- Analisi chimiche quali-quantitative e valutazioni farmacotossicologiche su nuove sostanze ad azione anabolizzante in collaborazione con i nuclei anti sofisticazioni dell'Arma dei carabinieri (NAS). Gli obiettivi principali della ricerca sono: i) analisi dei campioni sequestrati dai Nuclei Anti Sofisticazioni dell'Arma dei Carabinieri delle varie Province italiane e inviati all'ISS; ii) validazione (secondo le linee guida internazionali dell'FDA) di tecniche di separazione in cromatografia liquida e gas cromatografia accoppiate a tecniche di rivelazione in spettrometria di massa e spettrometria di massa tandem, per la quantificazione delle nuove sostanze presenti nei campioni sequestrati; iii) analisi dei campioni sottoposti a sequestro; iv) produzione di report per CVD, NAS e autorità sanitarie.

Attività di formazione/informazione

Sono in programma corsi sulle tematiche delle tossicodipendenze rivolti agli operatori del settore, siano essi del pubblico che del privato sociale, svolti secondo programmi modulati per le singole figure professionali ma calibrati in modo da consentire il dialogo e la collaborazione, al fine di rispondere in modo competente alle esigenze degli utenti. I corsi saranno organizzati sia con modalità di tipo residenziale per piccoli gruppi (al fine di permettere il confronto e l'integrazione tra le diverse figure professionali), sia secondo la modalità di Formazione a Distanza (FAD), al fine di poter raggiungere il più ampio numero di operatori possibile, su tutto il territorio nazionale. Il Reparto ha inoltre in programma: i) la creazione di una *Virtual Library* sulle dipendenze dedicata ai medici di Medicina Generale, per rispondere alle esigenze della Educazione Continua in Medicina; ii) la diffusione di CD ("Il problema delle dipendenze in Medicina generale") con risposte in merito agli interrogativi più comuni che il medico di Medicina Generale si pone di fronte ad una persona affetta da un problema di *addiction* e alla sua famiglia; iii) la diffusione di un DVD ("Sostanze e Dipendenze") contenente una raccolta di servizi giornalistici, testimonianze ed interviste, trasmessi negli ultimi anni dalle reti televisive nazionali.

Progettualità per il triennio 2009-2011 del Reparto di Farmacologia e terapia delle malattie da virus

Nel Reparto di Farmacologia e terapia delle malattie da virus l'attività di ricerca è volta ad ottimizzare le strategie preventive e terapeutiche dell'infezione da HIV nel nostro Paese e nei Paesi con risorse limitate. L'attività viene effettuata con la conduzione di studi clinici controllati e di coorte, studi immuno-virologici, di farmacoeconomia e di valutazione della qualità della vita.

Le attività per il triennio 2009-2011 si articoleranno nei seguenti ambiti:

- Studi clinici – Studi osservazionali
 - Progetto Nazionale Gravidanza
Il progetto, coordinato dall'ISS dal 2001, 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 che seguono donne HIV-positive in gravidanza e i loro neonati su tutto il territorio nazionale in oltre 35 centri clinici.
 - Progetto NIA (Nuovi Inibitori anti-HIV)
Lo studio prevede l'arruolamento di pazienti HIV già trattati con farmaci appartenenti alle tre classi principali (IP, NRTI, NNRTI), che iniziano una terapia con inibitori della fusione, inibitori dell'integrasi, antagonisti del co-recettore CCR5. Lo studio è

articolato su vari piani di ricerca che permetteranno una definizione multidimensionale del profilo complessivo dei nuovi inibitori (efficacia clinica, risposta immuno-virologica, tossicità limitante il trattamento e a lungo termine, emergenza di resistenze virali, farmacocinetica, qualità della vita e farmacoeconomia).

- Studio SMAC (*Safe Milk for African Children*)

Lo studio SMAC ha l'obiettivo di valutare la sicurezza e l'efficacia della somministrazione di una terapia HAART alle donne HIV-positivo nel corso della gravidanza e successivamente durante l'allattamento con l'obiettivo di prevenire la trasmissione postnatale dell'HIV. Lo studio si svolgerà in Malawi poiché la trasmissione attraverso l'allattamento materno rappresenta un importante problema di sanità pubblica unicamente nei paesi con risorse limitate. Lo studio prevede l'arruolamento di 200 donne che verranno seguite insieme ai loro bambini per due anni dopo il parto.

- Studi clinici controllati

Il Reparto collaborerà al coordinamento di due grandi studi clinici (NEAT 001 e NEAT 002) condotti all'interno del Progetto Europeo NEAT (*European AIDS Treatment Network*) e del trial EARNEST sponsorizzato dall'*European Developing Countries Trials Partnership* (EDCTP).

- NEAT 001 *An open-label randomised comparative two-year trial comparing two first-line regimens in HIV-infected antiretroviral naïve subjects*

Il NEAT 001 si propone di confrontare due regimi HAART innovativi in soggetti HIV+ mai trattati con antiretrovirali. I due regimi sono rappresentati da: darunavir + emtricitabina+ tenofovir e da darunavir+ raltegravir. Saranno studiati 800 pazienti (400 per braccio terapeutico), arruolati in diversi paesi europei. L'innovatività dello studio consiste: i) nell'inclusione di un braccio terapeutico che include due soli farmaci antiretrovirali (darunavir+raltegravir), estremamente potenti, ii) la durata dello studio, 96 settimane, che permetterà di osservare gli effetti a lungo termine dei due trattamenti; iii) l'*endpoint* primario dello studio, che include non solo la risposta virologica, ma anche alcuni parametri clinici; iv) l'inclusione, tra gli *endpoint* secondari, di parametri *patient-oriented* come la qualità della vita; v) l'inclusione di sottostudi mirati ad aspetti particolari, come i disturbi cognitivi, la farmacogenomica, la farmacoeconomia.

- NEAT 002 *A randomised controlled trial of immediate versus deferred treatment of acute hepatitis C virus (HCV) infection in patients with HIV co-infection*

Lo studio NEAT 002 è stato disegnato per fornire una risposta a un quesito ancora non risolto: la terapia ottimale dell'epatite acuta da HCV in soggetti HIV+. Verranno valutati: l'efficacia di una terapia precoce dell'infezione acuta da HCV (*endpoint* primario), la composizione del regime terapeutico (interferon da solo o interferon + ribavirina), la durata del trattamento (24 *versus* 48 settimane). La risposta alla terapia sarà valutata in termini di *sustained virologic response*, cioè *clearance* persistente dell'HCV RNA. Saranno arruolati circa 400 pazienti provenienti da diversi Paesi europei; l'arruolamento richiederà circa due anni.

- EARNEST *The Eastern and southern Africa Research Network for Evaluation of Second Line Therapy in HIV infection*

Il trial EARNEST 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. Verranno confrontati il regime che rappresenta lo *standard of care* (due NRTI + un inibitore della proteasi) con due regimi innovativi rappresentati dalla combinazione di un

inibitore della proteasi + un inibitore dell'integrasi e da un inibitore della proteasi in monoterapia. Lo studio prevede l'arruolamento di 1.000 pazienti che falliscono la prima linea di terapia in quattro Paesi dell'Africa sub-sahariana (Uganda, Malawi, Zimbabwe e Sudafrica).

- Studi immuno-virologici – Studi sulle forme episomali del virus HIV
 - Valutazione del potenziale immunogenico
Lo studio prevede la valutazione della capacità trascrizionale delle forme non integrate (episomali) di HIV 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. Per valutare in vivo l'immunogenicità delle proteine prodotte dalle forme episomali verranno utilizzati vettori lentivirali nonintegranti basati su HIV-1 che producono 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, potrà avere importanti implicazioni per la patogenesi dell'HIV/AIDS e per lo sviluppo di un vaccino.
 - Valutazione di efficacia di una terapia con inibitori dell'integrasi
In seguito all'infezione da HIV il DNA retrotrascritto viene trasportato all'interno del nucleo della cellula infetta dove può essere integrato mediante l'utilizzo della integrasi o rimanere in forma episomale. Nelle prime settimane di terapia con inibitori dell'integrasi è stato osservato un aumento del numero delle forme episomali nelle cellule infette. Inoltre, da studi effettuati *in vitro*, sembra che a causa del mancato funzionamento del processo di integrazione le forme non-integrate circolari presentino una proporzione di mutazioni superiori a quelle che appaiono nell'infezione da HIV non trattata con farmaci anti-integrasi. Si ipotizza quindi che il trattamento farmacologico con inibitori dell'integrasi, interferendo con la proteina integrasi, aumenti la proporzione di mutazioni osservate nei circoli e tale aumento possa essere utilizzato come marker di funzionalità farmacologica in corso di terapia.
 - Studio dell'immunità mucosale nell'infezione da HIV
L'immunoattivazione cronica indotta da HIV gioca un ruolo chiave nella patogenesi dell'HIV/AIDS. Questo studio ha l'obiettivo di descrivere le modificazioni dei livelli di attivazione delle cellule T mucosali e sistemiche nei pazienti HIV positivi in una fase precedente l'inizio della terapia antiretrovirale e successivamente in corso di trattamento. Inoltre fornirà dati importanti circa: la presenza di correlazioni tra i livelli di immunoattivazione sistemiche 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.
- *Patient-reported-outcome*
I *patient reported outcome* (PRO), o esiti riferiti dal paziente, permettono di descrivere, misurare e valutare lo stato di salute del paziente attraverso la sua stessa percezione della propria condizione di salute, fornendo una maggiore attendibilità alla valutazione complessiva dello stato di benessere. Si è recentemente costituito un gruppo di lavoro multidisciplinare, denominato PROMote (*Patient-Reported Outcomes MOVing Toward Evidence*), formato da diverse figure professionali esperte in PRO nei diversi settori della

sanità e coordinato da personale del Reparto. Il gruppo ha i seguenti obiettivi: i) fare formazione in materia di PRO; ii) promuovere un impiego appropriato di strumenti per la rilevazione dei PRO, sia nei trial clinici che nella pratica clinica; iii) promuovere ricerche sui PRO in ambito di studi nazionali e internazionali. Attualmente il personale del Reparto è coinvolto in due studi principali: lo studio NIA e lo studio NEAT 001 (menzionati precedentemente) nei quali sono previsti: i) misura dei cambiamenti della qualità della vita mediante somministrazione di questionari generici e specifici per la popolazione HIV+; ii) misura dell'associazione tra i cambiamenti osservati nella qualità della vita e altre variabili cliniche potenzialmente correlate ad essa iii) misura dell'associazione tra i cambiamenti osservati nella qualità della vita e i dati di efficacia (risposta immunologica e virologica) e sicurezza (eventi avversi).

– Farmacoeconomia

Le valutazioni farmacoeconomiche costituiscono un fondamentale ausilio per una adeguata programmazione sanitaria e l'importanza di queste valutazioni cresce con la disponibilità di terapie ad alto costo che determinano un incremento della spesa sanitaria. Nel Reparto vengono effettuate valutazioni farmacoeconomiche: i) nell'ambito dello studio NIA sui nuovi inibitori anti-HIV con l'obiettivo di stimare i costi diretti e i QALY (*quality-adjusted life-year*); e ii) nell'ambito dello studio LIPO (uno studio per la valutazione dell'efficacia di interventi chirurgici per la lipodistrofia) con l'obiettivo di stimare il rapporto incrementale costo/efficacia (ICER) che definisce il costo aggiuntivo per ottenere un incremento unitario di efficacia (in questo caso la riduzione del grado di lipodistrofia).

– Stesura di Linee Guida

I ricercatori del Reparto collaborano inoltre alla stesura di Linee Guida sia a livello nazionale per quanto riguarda il trattamento antiretrovirale in gravidanza sia a livello europeo partecipando alla stesura di Linee Guida rivolte a clinici e virologi per una corretta gestione delle resistenze ai farmaci anti-HIV.

Progettualità per il triennio 2009-2011 del Reparto Farmacopea e qualità dei medicinali

Si elencano qui di seguito le attività del Reparto concernenti controllo e ricerca. Tali attività proseguiranno nel futuro triennio e sono interconnesse tra loro in quanto il controllo di farmaci chirali è collegato alla messa a punto e sviluppo di metodiche HPLC determinanti per la loro caratterizzazione. Per quanto riguarda la ricerca, l'interesse sarà soprattutto focalizzato su farmaci con attività antitumorale e antivirale commercialmente disponibili e di nuova sintesi.

• Attività di controllo

- Esecuzione del programma di controllo annuale concordato con l'AIFA.
- Esecuzione di controlli inviati dall'AIFA o autorità costituite su corpi estranei e difetti nei prodotti medicinali.
- Esecuzione di *Proficiency Testing Study*, *Centrally Authorised Products* e *Collaborative Trial* in ambito europeo coordinate dall'EDQM e annualmente proposti all'ISS per la esecuzione dei relativi test.
- Elaborazione di pareri su Procedure Europee di Mutuo Riconoscimento, Variazioni e Procedure Decentrate e procedure nazionali .
- Elaborazione di pareri sull'accertamento dei requisiti dei prodotti di nuova istituzione (Comma C) per quanto riguarda la parte di Qualità prima dell'ammissione alla sperimentazione clinica.

- Collaborazione con il Reparto FOC al gruppo di lavoro per monitorare e valutare il fenomeno della contraffazione farmaceutica in Italia e studiare idonee azioni di contrasto; tale Gruppo di lavoro sui farmaci contraffatti ha avuto istituzione ufficiale nel 2007 e quindi sta ora attivamente operando su prodotti di sospetta contraffazione reperiti da segnalazioni o acquistati su Internet.
 - Attività di ispezione per la verifica dell'applicazione delle Norme di Buona Fabbricazione presso stabilimenti di produzione di sostanze farmacologicamente attive e medicinali in siti nazionali ed esteri, quest'ultima attività è svolta in collaborazione con organismi internazionali quali EDQM e WHO.
 - Partecipazione di esperti a Gruppi di lavoro della Farmacopea Europea.
 - Collaborazione alla valutazione di dossier farmaceutici nell'ambito del progetto di pre-qualificazione di farmaci della WHO.
- Attività di ricerca
- Gli enantiomeri di un farmaco chirale possono interagire selettivamente con il sistema biologico nel quale operano (anch'esso chirale) e presentare conseguentemente profili farmacodinamici, farmacocinetici e tossicologici differenti. L'introduzione di elementi di chiralità in molecole farmacologicamente attive ha il vantaggio di incrementare la selettività di azione e ridurre gli effetti indesiderati, oltre a permettere l'impiego di un prezioso elemento di indagine in campo farmacologico e biochimico. I problemi generati dalla stereochimica sono legati alla necessità di: i) isolare forme enantiomeriche con elevato grado di purezza enantiomerica; ii) impiegare sofisticati metodi analitici stereoselettivi nello studio dei profili farmacocinetici e farmacodinamici dei singoli enantiomeri di un farmaco chirale; iii) studiare la stabilità (o la labilità) configurazionale degli stereoisomeri, a causa di possibili fenomeni d'interconversione (*in vivo* o durante il periodo di conservazione del farmaco).
- La cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC) enantioselettiva rappresenta l'approccio ideale alla soluzione delle problematiche relative ai farmaci chirali sia a livello analitico (determinazione dell'eccesso enantiomerico, verifica della stabilità stereochimica sia *in vitro* che *in vivo*, studio di parametri farmacocinetici e farmacodinamici) che a livello preparativo, come metodo alternativo alla sintesi asimmetrica, specie nelle fasi iniziali di sviluppo di nuovi farmaci chirali. La risoluzione cromatografica su scala semipreparativa di composti racemici rappresenta uno stadio indispensabile per l'attività di ricerca di Laboratori interessati alla determinazione delle caratteristiche chimico-fisiche, strutturali e biologiche di forme enantiomeriche. L'analisi della stabilità configurazionale di composti chirali permette di valutare il tempo di dimezzamento del processo di racemizzazione e di selezionare le condizioni sperimentali più opportune per il controllo della purezza enantiomerica.
- Metodologia
Tecniche sperimentali adottate: HPLC su fasi stazionarie chirali (su scala analitica e semipreparativa), HPLC dinamica, polarimetria, dicroismo circolare, NMR, diffrazione di raggi X su cristallo singolo.
 - Obiettivi
 - Sviluppo di sistemi HPLC enantioselettivi utili alla risoluzione diretta di nuovi composti chirali di interesse biologico. Caratterizzazione chimico-fisica, strutturale e biologica di enantiomeri isolati su scala semipreparativa.
 - Sviluppo di sistemi HPLC enantioselettivi applicabili alla determinazione della purezza enantiomerica di farmaci chirali venduti come singoli enantiomeri e di sostanze correlate in concentrazioni inferiori all'1%.

- Studi in silico di interazioni tra ligandi chirali e bersagli biologici.
- Progettazione razionale di nuovi e selettivi farmaci.
- Studi di stabilità configurazionale di composti chirali con unità stereogeniche labili.
- Classi di composti chirali da studiare:
 - inibitori istone demetilasi (LSD1);
 - inibitori istone deacetilasi (HDACi);
 - agenti anti HIV-1;
 - inibitori selettivi delle forme A e B delle monoamminoossidasi (anti-MAO);
 - inibitori COX-2;
 - derivati DABOs con attività antiproliferativa e di citodifferenziazione su cellule di melanoma;
 - inibitori di pompa protonica.

**Progettualità per il triennio 2009-2011 del Gruppo di lavoro:
Sviluppo di metodologie chimiche e microbiologiche per la verifica della qualità e sicurezza dei prodotti cosmetici**

Scopo di questa linea di ricerca è quello di garantire la sicurezza e la qualità agli utilizzatori dei prodotti cosmetici, elaborando dei metodi microbiologici e chimico-analitici per la attuazione di quanto disposto dall'attuale normativa (Direttiva 76/768 CEE e conseguente recepimento mediante normativa nazionale Legge 11 ottobre 1986 n. 713) che, regolando la produzione e commercializzazione dei prodotti cosmetici, prevede che gli stessi siano fabbricati, manipolati e distribuiti in modo da non causare danni alla salute dei consumatori nelle normali condizioni d'uso. Per poter verificare la rispondenza della produzione cosmetica a tale principio, le strutture periferiche (Laboratori regionali; ARPA) preposte all'attività di vigilanza debbono potersi riferire a metodologie standardizzate e a requisiti di purezza validi su tutto il territorio nazionale. È da rammentare che l'ISS ha il compito, attribuitogli dalla summenzionata Legge 713/86, di effettuare le analisi di revisione nel settore e di svolgere funzioni di consulenza per la pubblica amministrazione proprio per consentire l'attuazione di programmi annuali di vigilanza da parte degli organismi preposti. Da un punto di vista chimico-analitico è bene sottolineare quanto segue: tra le oltre 2.000 sostanze di interesse sanitario contemplate dalla direttiva, ne sono state già studiate, presso il nostro Laboratorio, circa 450 suddivise tra coloranti, conservanti, filtri solari e sostanze funzionali, sia proibite che sottoposte a vincoli di campo d'impiego e quantitativi. Particolare attenzione verrà riposta nella messa a punto di metodi utili al riconoscimento di prodotti contraffatti tenendo in conto gli aspetti sanitari del problema. A scopo esemplificativo si evidenzia che durante la campagna di analisi svoltasi nell'estate 2007 sui dentifrici di marca Colgate, sono stati individuati, grazie ad analisi chimiche e microbiologiche combinate, tre campioni contraffatti su di un totale di 208 inviati a questo Istituto per accertamenti sanitari. Si rappresenta inoltre che con il recepimento dell'ultima direttiva (*Commission Directive 2008/88/EC of 23 September 2008*) sono state inserite oltre cento nuove sostanze proibite, in gran parte coloranti per capelli, per le quali è prioritario individuare nuovi metodi analitici per verificarne la loro assenza. È anche da ricordare che negli ultimi mesi siamo riusciti, mediante la collaborazione dell'APPA della Provincia autonoma di Bolzano, ad individuare cosmetici per bambini di provenienza cinese, pericolosi per la presenza di piombo (circa 500 mg/Kg) e a farne oggetto di RAPEX nazionale.

Descrizione degli obiettivi: Gli scopi della ricerca microbiologica possono essere così sintetizzati:

- Studio di procedure analitiche standardizzate per la rilevazione dei contaminanti microbici dei cosmetici;
- Determinazione del contenuto di alcune specie microbiche in vista di una loro utilizzazione come *marker* igienici, con particolare riferimento ai problemi della contraffazione;
- Determinazione del contenuto microbico dei prodotti cosmetici alla produzione e distribuzione;
- Studio di metodi per la rivelazione delle cellule microbiche chimicamente stressate;
- Valutazione comparata di metodi rapidi del commercio nell'analisi di determinate specie microbiche;
- Studio dell'effetto di alcuni sistemi conservanti sull'emergenza di cellule microbiche strutturalmente modificate.

Gli scopi della ricerca chimico-analitica possono essere così sintetizzati:

si ritiene di dover proseguire l'attività intrapresa nel precedente progetto triennale, anche sulla base delle recenti situazioni ad elevato rischio sanitario riscontrate nel mercato europeo, tenendo come obiettivo lo studio delle problematiche analitiche correlate con l'identificazione e dosaggio delle classi di sostanze proibite presenti nei formulati commerciali. Saranno presi in considerazione i coloranti diretti e di ossidazione per capelli (circa 60 riportati nell'Allegato III, parte seconda della Legge 713/86), gli oltre cento coloranti per capelli proibiti con il decreto 18/06/2008, gli ingredienti di profumazione, recentemente proibiti (circa 30 sostanze, riportate nell'Allegato II della summenzionata Legge), proseguiranno le ricerche su quei composti proibiti (ormoni, antibiotici, antistaminici, anestetici locali ecc.) con attività funzionale in campo dermatologico, per la loro probabile presenza in formulati di origine extracomunitaria, si ricercherà la para fenilendiammina utilizzata illegalmente per tatuaggi temporanei all'henné nero, responsabili della vertiginosa crescita di sensibilizzazione a questa sostanza utilizzabile solo per la colorazione dei capelli.

Risultati attesi nel triennio

Preparazione di metodi per sostanze non consentite aggiunte volontariamente a prodotti cosmetici: Sostanze ad attività antiistaminica, anestetico-locale, androgena, antiandrogena, estrogena e progestinica; glucocorticoide e antibiotica; coloranti, profumanti, preservanti, filtri solari e parafenilendiammina. Saranno anche portate a termine revisioni di metodi ufficiali obsoleti per coloranti, filtri solari e preservanti.

Gli scopi della ricerca microbiologica possono essere sintetizzati nella preparazione di procedure utili per la valutazione della carica batterica in formulati e materie prime ai fini di garantire la sicurezza di tale classe merceologica e valutare l'applicazione delle norme di GMP al fine di contrastare il fenomeno della contraffazione.

Progettualità per il triennio 2009-2011 del Reparto di Farmacologia del sistema nervoso centrale

– Mission

Sebbene la *mission* del nostro Reparto resterà sostanzialmente invariata rispetto al passato (Identificazione e sviluppo di nuove strategie terapeutiche per il trattamento delle malattie neurologiche e psichiatriche. Valutazione dell'efficacia e della sicurezza di farmaci neurologici e psichiatrici in sperimentazione clinica), nel prossimo triennio si prevede di introdurre alcune modifiche di tipo strategico. In particolare, prevediamo di orientare le nostre ricerche di base in un'ottica maggiormente "traslazionale" e di incrementare il coinvolgimento del nostro gruppo nella sperimentazione clinica di farmaci neurologici e psichiatrici. Inoltre, allo scopo di integrare la ricerca di base con altre discipline, il nostro

gruppo collaborerà con i colleghi epidemiologi dell'ISS per la conduzione di studi epidemiologici.

– Ricerca di base

- Importanza della ricerca preclinica nello studio delle malattie neurodegenerative

Il divario che si è venuto creando negli ultimi anni tra ricerca di base e ricerca clinica (“la valle della morte”, come è stato efficacemente definito in un recente Editoriale di *Nature*) fa sì che a ricerche sempre più sofisticate e sempre più costose non conseguono avanzamenti adeguati nella cura delle malattie. Ciò è particolarmente vero per il settore delle malattie neurodegenerative, in quanto, a fronte di dati preclinici apparentemente incoraggianti, la maggior parte dei *trial* clinici neuroprotettivi di fase III ha dato luogo a dei veri e propri fallimenti. Per tale ragione in questo momento si sta assistendo ad una forte rivalutazione del ruolo della ricerca di base (studio dei meccanismi patogenetici, *target validation*, ecc.) e degli studi preclinici (farmacologia previsionale, *target druggability*, ecc.) nel processo di sviluppo di nuove terapie. Un approccio traslazionale maggiormente coordinato ed efficace, nel quale la ricerca di base svolga un ruolo di primo piano, potrebbe rappresentare una vera e propria svolta nel trattamento delle malattie neurodegenerative. Un ulteriore supporto di tipo “culturale” a questo tipo di approccio è rappresentato dall’attività di valutazione dei dossier preclinici dei farmaci da sottoporre a sperimentazione clinica di fase I (attività che coinvolge diverse persone del nostro gruppo). In questo senso, la farmacologia preclinica può rappresentare un’importante interfaccia tra ricerca di base e attività di valutazione.

- Strategia 1: applicazione delle conoscenze acquisite in termini di *target validation* (stesse molecole, nuove patologie)

Il filone di ricerca “storico” del nostro Reparto, quello in cui ci viene riconosciuta una certa autorevolezza in ambito internazionale, riguarda il ruolo svolto dai recettori A2A dell’adenosina nelle malattie neurodegenerative dei gangli della base. Tali recettori svolgono un ruolo modulatore molto importante nell’SNC, e rappresentano pertanto un target potenzialmente interessante per lo sviluppo di nuove terapie. L’attività degli anni passati ha consentito una caratterizzazione abbastanza approfondita del ruolo di questi recettori nel morbo di Parkinson e nella corea di Huntington, le due principali patologie neurodegenerative dello striato. Nel tentativo di non disperdere le conoscenze che abbiamo acquisito nel corso degli anni in questo settore, concentreremo la ricerca del prossimo triennio su altre patologie del sistema nervoso per le quali esiste un solido e convincente background a favore di un possibile coinvolgimento dei recettori A2A. La prima di queste patologie è la sclerosi laterale amiotrofica (SLA), che potrebbe essere definita una patologia “tracciante” per lo sviluppo di un approccio traslazionale, in quanto: i) è molto rilevante dal punto di vista sanitario perché è grave, rapidamente fatale e incurabile; ii) è rara, per cui non attira sufficiente interesse da parte dell’industria farmaceutica; iii) ha un’eziologia sostanzialmente ignota, sebbene in una piccola percentuale di casi si presenti in forma familiare; iv) ha visto fallire tutti i *trial* neuroprotettivi di fase III finora condotti (con l’eccezione della modesta efficacia del riluzolo); v) è una malattia per la quale sono disponibili modelli sperimentali sia *in vivo* che *in vitro*. Numerose evidenze indicano che molti dei meccanismi patogenetici responsabili della SLA sono influenzati dai recettori A2A, per cui è sicuramente importante studiare se il blocco di tali recettori possa rivelarsi neuroprotettivo. Infine, la disponibilità di A2A antagonisti già usati nell’uomo (ad esempio l’istradefillina, che ha completato la sperimentazione clinica di fase III in pazienti con morbo di Parkinson), potrebbe facilitare ed accelerare la conduzione di

studi di fase I nel paziente. La seconda patologia, anch'essa rara e incurabile, è la malattia di Niemann Pick di tipo C. Si tratta di un disturbo ereditario del metabolismo del colesterolo che si manifesta anche con sintomi neurologici e che porta a morte in età infantile o giovanile. Alcune recentissime evidenze indicano un possibile coinvolgimento dei recettori A2A in questa malattia. Nel corso dei prossimi anni cercheremo di verificare l'ipotesi che farmaci attivi su tali recettori possano essere utilizzati per contrastare il processo neurogenerativo della malattia.

- Strategia 2: utilizzo delle conoscenze acquisite in termini di patogenesi e meccanismi molecolari (stesse patologie, nuovi possibili approcci).

Questo approccio consiste nell'utilizzare i modelli sperimentali di malattia che conosciamo meglio (morbo di Parkinson e corea di Huntington), per identificare e testare approcci terapeutici "non adenosinergici". Nel prossimo triennio, in particolare, si prevede di proseguire lo sviluppo di una nuova modalità di intervento sullo stress ossidativo basata sulla modulazione della proteina hMTH1. Tale approccio, che si avvale di nuovi modelli transgenici *in vivo* e cellulari e che stiamo portando avanti in collaborazione con il Dipartimento di AMPP, si è già rivelato promettente in modelli sperimentali di corea di Huntington. Inoltre, come nuovo approccio allo studio della neurodegenerazione striatale, si prevede di esplorare i meccanismi della neurogenesi adulta per verificare anche se interventi farmacologici in grado di stimolare la neurogenesi nell'adulto possano rappresentare strategie terapeutiche per il trattamento della corea di Huntington o del morbo di Parkinson.

- Aspetti pratici legati al nuovo orientamento della ricerca di base del gruppo
L'introduzione di un approccio traslazionale richiede la disponibilità di modelli sperimentali adeguati (per le malattie sopra menzionate sono disponibili dei modelli transgenici ben noti e validati) sui quali effettuare dei veri e propri trial preclinici. Ciò comporta la necessità di acquisire nuovo personale e nuovi spazi di stabulazione per stabilire ed espandere a sufficienza le colonie di topi transgenici.

– Sperimentazione clinica

Sebbene il nostro gruppo sia prevalentemente impegnato in attività di ricerca di base, una parte del personale è coinvolta anche in alcune attività legate alla sperimentazione clinica di farmaci neurologici e psichiatrici. Ad esempio il Reparto è attualmente impegnato nell'attività di monitoraggio della sicurezza (*Data Safety Monitoring Board*, DSMB) nell'ambito dello studio clinico AdCare (studio su efficacia e sicurezza degli antipsicotici tipici e atipici in pazienti affetti da demenza) coordinato dall'ISS.

Nel corso del prossimo triennio, oltre a proseguire tale attività, prevediamo di aumentare il coinvolgimento del gruppo nelle sperimentazioni cliniche di interesse neuropsichiatrico che abbiano rilevanza per la sanità pubblica. Un ottimo esempio in questo senso è rappresentato da una sperimentazione clinica di fase III, di prossimo avvio, sull'efficacia e la sicurezza dei sali di litio nella sclerosi laterale amiotrofica. Alcuni mesi fa infatti sono stati pubblicati i risultati di un trial clinico pilota nel quale il co-trattamento con sali di litio ha aumentato significativamente la sopravvivenza dei pazienti e rallentato la progressione della malattia rispetto al solo riluzolo.

Del tutto comprensibilmente, la pubblicazione dei dati dello studio pilota ha suscitato delle grandi aspettative presso i pazienti, spingendo molti di essi a chiedere di essere sottoposti al nuovo trattamento. I risultati pubblicati, tuttavia, non sono al momento sufficienti a supportare un uso sistematico dei sali di litio nei pazienti con SLA. Data la complessità della situazione che si è venuta a creare, e che investe il piano scientifico, etico e assistenziale della malattia, si è ritenuto importante avviare una sperimentazione

clinica multicentrica, coordinata dall'ISS, che consenta di definire la reale efficacia dei sali di litio in questi pazienti.

– Studi Epidemiologici

L'interesse principale del nostro Reparto, come già detto, riguarda lo studio delle malattie neurodegenerative e dei possibili approcci terapeutici. Da studi recenti di ricerca preclinica emerge in modo sempre più convincente un ruolo neuroprotettivo di farmaci antidepressivi e antipsicotici in modelli sia in vivo che in vitro di malattie neurodegenerative striatali. Visto che tali farmaci risultano ampiamente impiegati in clinica, abbiamo in progetto di realizzare, in collaborazione con il Reparto di Farmacoepidemiologia, uno studio epidemiologico per verificare se soggetti trattati cronicamente con farmaci antipsicotici o antidepressivi mostrino una diversa incidenza di malattie neurodegenerative.

Progettualità per il triennio 2009-2011 del Reparto di Ricerca clinica e farmacologia sperimentale

Il Reparto di Ricerca Clinica e Farmacologia Sperimentale del Dipartimento del Farmaco si caratterizza per svolgere attività di ricerca, istituzionali e di formazione.

• Attività Correnti

– Attività di Ricerca

- Il Registro italiano dell'ADHD

È uno studio di coorte che ha come obiettivo principale di valutare la sicurezza del metilfenidato e dell'atomoxetina e in prospettiva anche di altri psicofarmaci, da soli e in associazione ad altri interventi terapeutici (farmacologici e non farmacologici), a breve, medio e lungo termine, in soggetti affetti da Sindrome da Deficit di Attenzione e Iperattività (ADHD). Un sito web dedicato (<http://www.iss.it/adhd/>) fornisce informazioni dettagliate sulle attività del Registro ai cittadini. All'interno di questo sito c'è un'area di lavoro protetta, cui si accede con userid e password, dedicata ai centri di riferimento e agli operatori sanitari coinvolti nelle attività del Registro. Parallelamente al Registro italiano dell'ADHD è stata avviata una ricerca dal titolo "Studio sull'uso degli psicofarmaci in bambini affetti da ADHD". Tale ricerca in collaborazione con il Mario Negri – Laboratorio materno infantile e Centri di Riferimento di neuropsichiatria infantile – ha l'obiettivo principale di valutare il profilo di sicurezza dei farmaci per la cura dei bambini affetti da ADHD.

- Medicine alternative e complementari

Lo studio ha lo scopo di identificare il ruolo dell'ISS e dell'SSN rispetto all'uso delle medicine alternative e complementari in Italia.

- Impatto della terapia cronica con aspirina e statine nel tipo di presentazione dei pazienti con infarto miocardico acuto ed alterata funzione renale

È uno studio di coorte retrospettivo con l'obiettivo di valutare se l'associazione della terapia cronica con statine e aspirina abbia un effetto sinergico rispetto alla monoterapia nel tipo di presentazione dell'infarto miocardico acuto. Inoltre, la valutazione è stata condotta su subpopolazioni ad alto rischio, come quella costituita da pazienti con alterata funzione renale.

- Valutazione dell'espressione genica mediante la tecnologia dei *microarray* in farmacologia applicata

La linea di ricerca ha la finalità, attraverso studi *in vitro* e in modelli animali di valutare la possibile applicabilità di nuovi approcci farmacologici nell'ambito di

- patologie oncologiche. In particolare, questi studi sono basati su modelli innovativi di farmaco-genomica e di espressione di tratti di genoma codificante e non.
- ERANET PRIOMEDCHILD, WP3
Il progetto di ricerca rientra all'interno delle attività, finanziate dalla Commissione Europea, di coordinamento delle politiche scientifiche dei Paesi membri dell'Unione europea (ERA-NET). L'Olanda coordina il programma, l'Italia è responsabile del WP3. Obiettivo principale è la promozione della ricerca e sviluppo dei farmaci essenziali per la pediatria. Il WP3 condotto dall'Italia ha lo scopo di valutare gli aspetti regolatori, etici e sociali che costituiscono barriere e opportunità per la ricerca.
 - Attività istituzionali
 - EMEA: pediatria Esperto CHMP
 - Banca dati della terapia genica e cellulare somatica
 - Gestione dei contenuti del sito del Dipartimento, e dei siti tematici
 - Formazione
Il Reparto svolge annualmente una serie di Corsi/Convegni rivolti ad operatori sanitari. Le aree di maggiore interesse sono le seguenti: metodologia sulle sperimentazioni cliniche con particolare attenzione alla pediatria, appropriatezza d'uso dei farmaci nelle malattie e disturbi mentali, approcci multidisciplinari nell'assistenza al malato a prognosi severa, applicazione di metodiche innovative (*microarray*) negli studi clinici.
- Strategia e pianificazione attività triennio 2009-2011
Il Reparto di Ricerca clinica e farmacologia sperimentale nel triennio 2009-2011 svilupperà temi di ricerca e attività all'interno delle seguenti aree progettuali:
 - Area pediatrica – Attività correnti
 - Registro nazionale dell'ADHD
Il Registro è attivo dal 21 giugno 2007 e la sua attività era inizialmente prevista della durata di due anni per garantire la farmacovigilanza attiva richiesta dalle normative di legge per tutti i farmaci di nuova autorizzazione. L'AIFA ha recentemente approvato la richiesta di estensione di un anno dell'attività del Registro, fino a giugno 2010. Nei successivi sei mesi, quindi entro il 31 dicembre 2010, verrà fatta l'analisi del database e pubblicati i risultati. Nell'autunno 2010 sarà organizzato presso l'ISS un convegno internazionale sull'ADHD.
 - ERANET PRIOMEDCHILD
Il progetto si concluderà entro il 31 dicembre 2009. È in corso la valutazione da parte dei Paesi partecipanti di lanciare un *joint call* e, a tal fine, si stanno esplorando le disponibilità dei vari stati a finanziarlo. Attualmente c'è la disponibilità di alcuni Paesi partecipanti ad impegnarsi per circa sei milioni di euro complessivi.
 - Registro nazionale del GH (*Growth hormone*) e nota AIFA 39
Continuerà la partecipazione alle attività del comitato scientifico del Registro.
 - Comitato di bioetica dell'ISS
Partecipazione alle attività del comitato con particolare riguardo alla valutazione degli studi prevalentemente o esclusivamente pediatrici.
 - EMEA
Supporto alle attività di valutazione del profilo beneficio/rischio dei farmaci (psicostimolanti, SSRI).
 - EURO sociAL

Continuerà la cooperazione con i Paesi dell'America Latina interessati dal progetto europeo. Inoltre, continuerà la partecipazione al workshop annuale organizzato dall'università di Derby (UK) e dal Ministero della Sanità di Cuba.

Il team che si occupa dell'area pediatrica ha maturato nel corso degli ultimi quattro anni una notevole *expertise* nella conduzione di studi di fase IV e nella valutazione del profilo beneficio\rischio dei trattamenti farmacologici. L'acquisizione di queste competenze è stata possibile grazie alla gestione del Registro nazionale dell'ADHD e allo studio di farmacovigilanza collegato ad esso. Grazie a questa *expertise* abbiamo collaborato con l'EMA nella valutazione del profilo beneficio\rischio degli SSRI e di alcuni psicostimolanti utilizzati nel trattamento dell'ADHD.

Contemporaneamente, sono state acquisite notevoli conoscenze e competenze nella metodologia della ricerca clinica, settore in cui sono stati condotti alcuni corsi di formazione sulla sperimentazione clinica e sulla sperimentazione clinica in pediatria.

Altro elemento di eccellenza è rappresentato dalla capacità di definizione di protocolli diagnostico-terapeutici integrati che permettono di trasferire le evidenze scientifiche alla pratica clinica su grandi popolazioni.

Abbiamo individuato, in base a quanto riportato nel paragrafo precedente, tre linee di ricerca prioritarie su cui concentrare attività e risorse:

- Oncologia pediatrica
Condurre studi di fase I-III sui tumori solidi individuati in precedenza in collaborazione con l'IRCCS "G. Gaslini" di Genova. In particolare, traslare i risultati ottenuti *in vitro* e/o su modello animale da alcuni gruppi di ricercatori dell'ISS: studi *in vitro* sull'uso di sostanze naturali estratte da piante sembrano promettenti ed è ragionevole intraprendere studi clinici. Questi ultimi possono essere disegnati con metodi nuovi che permettano di ridurre il numero di bambini coinvolti e il loro tempo di esposizione ai farmaci in studio.
- Psicofarmacologia
Indagare i meccanismi di azione degli psicofarmaci sotto il profilo di efficacia e di sicurezza: condurre studi di genetica su sottopopolazioni selezionate per caratteristiche peculiari (*non responders*, ADR). Definire in modo ottimale il profilo beneficio\rischio nella popolazione pediatrica delle principali categorie di psicofarmaci: SSRI, antipsicotici, psicostimolanti.
- Terapia del dolore
Studiare farmacocinetica e farmacodinamica nel bambino dei principali farmaci antalgici: oppioidi naturali e di sintesi, FANS. In base ai dati ottenuti sarà possibile sviluppare protocolli operativi razionali da applicare nella pratica clinica per favorire la diffusione della terapia del dolore, anche lieve e medio, nel bambino.
- Area farmacogenomica della schizofrenia
Nuovi approcci metodologici per la comprensione dell'eterogeneità genetica nelle malattie mentali con particolare attenzione alla schizofrenia. La comprensione dei meccanismi molecolari, che sono alla base delle malattie multi-geniche e multi-fattoriali, non può prescindere dallo studio del genoma in tutta la sua complessità: geni e sequenze ripetute. L'eterogeneità genetica presente nella schizofrenia non è sufficiente a spiegare l'estrema variabilità del fenotipo clinico. In questo studio cercheremo di valutare le interazioni geni/ambiente anche alla luce dell'importanza dell'*environment* genomico: l'espressione di un gene può essere regolata anche in funzione della sua vicinanza e/o dell'interazione con sequenze ripetute. Per poter disegnare una terapia che si adatti il meglio possibile al genotipo di un paziente bisogna considerare non solo il suo DNA ma la sua espressione, la sua traduzione e la

sua regolazione epigenetica. Solo tenendo conto della reale complessità dell'individuo sarà possibile identificare nuovi target molecolari per terapie innovative della schizofrenia.

- Area progetti comunitari
In relazione ai progetti della Comunità Europea (EURO-NET), il Reparto svilupperà un maggiore impegno nella conduzione di sistemi di valutazione internazionale, attraverso la costituzione di Registri atti alla raccolta di dati specifici su patologie ad alto impatto sanitario (HIV/AIDS, TBC). Tali attività rientreranno nell'area progettuale europea.
- Area malattie cardiovascolari
Nell'ambito delle malattie cardiovascolari saranno svolti studi per l'identificazione di indicatori di esito, in popolazioni ad alto rischio e in trattamento con farmaci ipocolesterolizzanti e antiaggreganti. Gli studi di ricerca si baseranno sulla costituzione di coorti prospettiche di pazienti con patologie cardiache acute. Inoltre, in pazienti con disturbi di sovrappeso e obesità si condurrà uno studio di coorte (Progetto Dai Peso al Peso) al fine di valutare lo stato di salute di una ampia popolazione italiana, circa 10.000 soggetti, per potere definire nuovi indicatori dello stato di sovrappeso/obesità, in correlazione anche di interventi sanitari prescritti, quali psicosociali e farmacologici. Il progetto si baserà sulla realizzazione di un web-server con funzionalità di data-management e analisi dati, in gran parte già fruibili e utilizzate nel data-management dei vari progetti di Reparto. Inoltre, verrà realizzato un sito web che permetta ad utenti autorizzati di navigare tra vari menu (e help) e utilizzare le funzionalità del web-server.

Progettualità per il triennio 2009-2011 del Reparto Farmaci anti-tumorali

Le attività del Reparto sono fondamentalmente basate su progetti di ricerca traslazionale focalizzati sulla ricerca di nuovi approcci di terapia anti-tumorale e sulla identificazione di nuovi *marker* di malignità tumorale. Nel loro complesso le attività di ricerca si possono riassumere in quattro filoni: i) Uso di inibitori di pompa protonica come nuovi farmaci antitumorali; ii) Determinazione, caratterizzazione e quantificazione di esosomi nel plasma dei pazienti con tumore come nuovo presidio diagnostico/prognostico; iii) Identificazione di nuove proteine associate ai tumori metastatici come nuovi target di terapia; iv) Caratterizzazione della importanza dell'ezrina nel processo di meta statizzazione tumorale.

- Uso di inibitori di pompa protonica (PPI) come nuovi farmaci antitumorali
Questo è un progetto che copre l'intero processo traslazionale. Infatti, mentre vi sono due studi clinici di fase 2 in Italia sull'uso chemosensibilizzante dei PPI in pazienti con melanoma (INT Milano) e osteosarcoma (*Italian Sarcoma Group*), e uno sta per partire in Cina in pazienti con carcinoma mammario (*Shanghai Cancer Hospital*), vi sono contemporaneamente studi sulla caratterizzazione molecolare delle pompe protoniche espresse dai tumori umani. È un processo molto costoso e impegnativo per il quale si sta pensando di creare una *Spin-off company*, che abbia lo scopo primario di creare nuovi inibitori di pompa e farmaci ibridi/combinati, che contengano un PPI associato ad un altro farmaco.
- Determinazione, caratterizzazione e quantificazione di esosomi nel plasma dei pazienti con tumore come nuovo presidio diagnostico/prognostico
Anche questo è un progetto traslazionale in cui è stato ideato un test ELISA per la quantificazione degli esosomi ed è stato brevettato presso una SME in Estonia. Il test è stato prima provato in preparazioni di esosomi presenti in sovrantanti di colture di

cellule tumorali e successivamente nel plasma di topi xenochimerici (SCID trapiantati con melanoma umano). Una volta messo a punto il metodo il test è stato sperimentato su 100 plasma di pazienti con melanoma confrontati a 60 plasma da donatori sani. I risultati hanno mostrato la presenza di livelli di esosomi 3-4 volte superiori nel plasma dei pazienti con melanoma con una sensibilità del 96% e una specificità del 70%, entrambi superiori all'unico test plasmatico attualmente utilizzato nel follow-up dei pazienti con melanoma (i.e. LDH). Il lavoro è in pubblicazione su *PloSONE*.

- Identificazione di nuove proteine associate ai tumori metastatici come nuovi target di terapia

Sulla base di studi precedenti che avevano dimostrato l'importanza del cannibalismo tumorale nel processo metastatico, è stato identificato un nuovo gene e una nuova oncoproteina, che le cellule metastatiche hanno in comune con alcuni microorganismi (e.g. amebe). Il *knock down* del gene abroga l'attività cannibalica delle cellule metastatiche e ne riduce l'invasività. La proteina è stata chiamata *Tumor Cannibalism Associated Protein-1* (TUCAP-1) e sono stati creati anticorpi che specificamente riconoscono questa proteina nei tessuti tumorali. La proteina è esclusivamente espressa da cellule tumorali maligne ed interamente assente in tutti i tessuti umani normali fino ad oggi testati (leucociti, pelle, intestino, pancreas). Anche questa scoperta è diventata materia di brevetto.

- Caratterizzazione della importanza dell'ezrina nel processo di metastatizzazione tumorale
Un nostro studio recente ha evidenziato l'importanza chiave dell'ezrina nei processi metastatici. Infatti, mutazioni indotte nel gene per l'ezrina hanno abrogato la capacità sia invasiva che metastatica dei melanomi umani trapiantati nello SCID. Questo studio ha inoltre dimostrato che l'ezrina ha un ruolo importante non solo nei processi di adesione e motilità cellulare, ma anche nella capacità fagocitica delle cellule tumorali, necessaria per far fronte alla scarsa presenza di nutrienti tipica del microambiente tumorale.

Progettualità per il triennio 2009-2011 del Reparto Farmacologia dei processi degenerativi e dell'invecchiamento

Nell'ambito delle ricerche in corso già da lungo tempo nel Reparto, i vari gruppi che lo compongono hanno programmato una serie di attività che, nei prossimi tre anni, saranno focalizzate a studi e programmi che coprono i diversi campi di indagine affrontati dal Reparto. Le ricerche saranno svolte in un ampio quadro di collaborazioni con Università, Istituti di ricerca, IRCCS e Ospedali nonché con Istituti di Ricerca europei e statunitensi, saranno indirizzate in un ambito specifico di sanità pubblica e saranno finalizzate ad uno sviluppo dei parametri diagnostici, prognostici e terapeutici all'interno di tutte le più importanti patologie associate all'invecchiamento. Queste attività saranno prevedibilmente inserite nel contesto di progetti e programmi di ricerca finanziati da enti pubblici e privati.

- Malattie del sistema nervoso
Proseguirà lo studio di patologie neurodegenerative. Le ricerche si focalizzeranno sia sui meccanismi patogenetici che sull'individuazione di nuovi approcci farmacologici. Tali ricerche proseguiranno sia nell'ambito delle malattie genetiche, come per esempio la malattia di Huntington, includendo le malattie rare, come la Niemann-Pick e la sindrome di Rett, che nell'ambito dell'invecchiamento neuronale e dei suoi meccanismi.
- Malattie immunomediate
Verrà ulteriormente sviluppato lo studio delle patologie associate alla disfunzione del sistema immunitario, incluse le immunodeficienze e l'autoimmunità, con particolare riferimento all'individuazione di marcatori di suscettibilità *gender*-associati per lo

sviluppo di tali malattie. Verranno proseguiti gli studi di immunofarmacologia sulle differenti sottopopolazioni linfocitarie.

- Malattia neoplastica
Verrà studiata sia in termini patogenetici che in termini di approcci terapeutici innovativi. In particolare, verranno analizzati il possibile ruolo di fattori di virulenza nell'insorgenza di neoplasie del tratto gastroenterico e il ruolo della resistenza intrinseca ad agenti chemioterapici e la modulazione della malattia metastatica, principalmente melanoma.
- Malattie cardiovascolari
Verrà proseguito lo studio patogenetico sui meccanismi di danno vascolare e le analisi per l'individuazione di *marker* diagnostici e prognostici genere-associati. Verranno sviluppati modelli *in vitro* di interesse nel campo cardiovascolare, inclusi cardiomiociti e staminali cardiache.
- Malattie infettive
Verrà proseguita l'attività svolta negli ultimi anni nel campo dell'AIDS, in particolare gli studi sul ruolo della proteina Nef nell'immunopatogenesi dell'AIDS. Verranno, inoltre, sviluppati studi farmacologici su altre malattie virali (influenza).
- Attività istituzionali e di servizio
Verranno svolte dal personale del Reparto attività specifiche che hanno già impegnato il personale negli ultimi anni. In particolare, verrà proseguita l'attività istituzionale in ambito regolatorio che consiste essenzialmente nelle valutazioni di Autorizzazioni in deroga, nella formulazione di pareri per AIFA e per la segreteria di comma C. Il personale partecipa alle attività della commissione per la terapia genica e cellulare somatica. Il personale è Membro di Commissioni e Liste ufficiali degli esperti nazionali.

Progettualità per il triennio 2009-2011 del Reparto Qualità dei farmaci di origine chimica

- Missione
 - svolgere attività di valutazione, controllo e ricerca sulla qualità dei farmaci di origine chimica per uso umano;
 - partecipare al programma annuale di farmacosorveglianza nazionale;
 - monitorare e valutare il fenomeno della contraffazione farmaceutica in Italia e studiare idonee azioni di contrasto;
 - partecipare al network degli OMCL europei.
- Attività di ricerca
 - studio della qualità dei farmaci di sintesi chimica;
 - sviluppo e convalida di metodi di screening per l'analisi di farmaci potenzialmente contraffatti e loro applicazione all'analisi di campioni sospetti provenienti, in particolare, dall'e-commerce e da Paesi in via di sviluppo;
 - studio di problematiche complesse relative alla similarità ed eventualmente alla bioequivalenza di farmaci generici/equivalenti attraverso la realizzazione di strategie analitiche, lo sviluppo e la convalida di metodi atti a discriminare fra formulazioni uguali o simili (in particolare saggi di dissoluzione *in vitro*);
 - caratterizzazione degli stadi di oligomerizzazione e aggregazione della calcitonina, farmaco peptidico impiegato in patologie geriatriche, e del loro effetto sulla efficacia e sicurezza d'uso del farmaco;
 - studio delle proprietà di stato solido dei farmaci di uso consolidato;
 - studi di modellistica molecolare sull'interazione tra molecole di sintesi e modelli recettoriali;

- calcolo di descrittori molecolari per lo studio della correlazione struttura-tossicità;
 - messa a punto e applicazione di tecniche di risonanza magnetica nucleare in ambito bio-farmacologico;
 - studio sulle problematiche di qualità dei farmaci per uso umano che si riscontrano nella valutazione dei dossier regolativi delle Procedure Europee;
 - revisione critica delle linee guida e della letteratura inerenti la stima dell'incertezza di misura, accompagnata da studi pratici volti a determinare la trasferibilità delle metodiche esistenti all'attività istituzionale di controllo del Dipartimento del Farmaco.
- Attività di valutazione e di controllo
- coordinamento delle attività di controllo connesse alla Rete Europea dei Laboratori Ufficiali di Controllo dei Medicinali relativamente ai farmaci chimici per uso umano (OMCL-EDQM);
 - attività di valutazione e di controllo della composizione dei medicinali nell'ambito del programma annuale di farmacovigilanza;
 - attività di valutazione e di controllo connessa alla difettosità dei medicinali e alle reazioni avverse;
 - attività di valutazione e di controllo connessa a richieste della Magistratura;
 - attività di valutazione e di controllo connessa alla contraffazione farmaceutica;
 - attività di valutazione dei dossier regolativi di Procedure Europee Centralizzate e stesura dell'*Assessment Report* per l'immissione in commercio di un farmaco;
 - attività di valutazione dei dossier regolativi di Procedure Europee per l'immissione in commercio di un farmaco (Procedure Decentrate e di Mutuo Riconoscimento) e delle richieste di variazione di Tipo II dei dossier regolativi;
 - coordinamento delle attività connesse alla registrazione dei presidi medico-chirurgici (disinfettanti) e valutazione della parte chimica dei dossier;
 - partecipazione ai lavori di organismi internazionali e nazionali: OMCL network; Commissione Consultiva del Farmaco Veterinario; Gruppo tecnico di lavoro ai sensi dell'art. 7 DM 15 luglio 2004; Commissione Consultiva Biocidi; IMPACT Italia, gruppo di lavoro *ad hoc* istituito per sviluppare attività atte a contrastare il fenomeno della contraffazione farmaceutica in Italia e collaborare con organismi internazionali (WHO, CoE, EDQM).
- Gruppi di lavoro
- Unità Disinfettanti Attività specifica di controllo
Coordinamento delle attività relative alla registrazione dei Presidi Medico Chirurgici disinfettanti chimici per uso umano, veterinario e ambientale e valutazione del dossier regolativo relativamente alla parte chimica.
 - Unità di Spettroscopia e Termoanalisi
Attività di controllo: caratterizzazione chimico-fisica di principi attivi farmaceutici attraverso metodi spettroscopici e calorimetrici.
Attività di ricerca: studio delle proprietà chimico-fisiche e delle caratteristiche strutturali di principi attivi farmaceutici e dei loro aggregati molecolari attraverso metodi spettroscopici, calorimetrici e computazionali.
 - Unità di Tecniche separative
Attività di controllo: verifica della composizione dei principi attivi e delle preparazioni medicinali attraverso metodi cromatografici.
Attività di ricerca: sviluppo di metodi analitici per la valutazione della qualità dei farmaci chimici e per l'individuazione di farmaci contraffatti.
 - Unità di Tecnologia farmaceutica

Attività di controllo: valutazione della qualità delle preparazioni medicinali mediante saggi e procedimenti tecnologici.

Attività di ricerca: studi *in vitro* relativi all'influenza delle caratteristiche tecnologiche delle preparazioni farmaceutiche sulla biodisponibilità del principio attivo *in vivo*.

Strategie e attività future

- Prosecuzione di tutte le attività di controllo e di ricerca attualmente in corso.
- Ampliamento delle attività connesse alla problematica della contraffazione farmaceutica attraverso: i) incremento della partecipazione alle attività di IMPACT Italia; ii) rafforzamento delle collaborazioni con le istituzioni coinvolte nella problematica (AIFA, Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, Carabinieri NAS, Ministero dell'Interno, Agenzia delle dogane, Ministero dello Sviluppo Economico); iii) rafforzamento delle collaborazioni inter-Reparto (UIDF, Reparto Farmacopea e qualità dei medicinali, Reparto Medicine complementari, naturali e tradizionali. Sicurezza dei prodotti cosmetici); iv) potenziamento della *analytical capability* dei Gruppi di lavoro.

Progettualità per il triennio 2009-2011 del Reparto Farmacogenetica, farmacoresistenza e terapie sperimentali

L'attività del Reparto si articola sulle due direttrici che caratterizzano le finalità istituzionali del Dipartimento del Farmaco e che includono: i) ricerca e sviluppo di farmaci biotecnologici innovativi per la diagnosi e terapia di malattie infettive e neoplastiche mediante l'utilizzo di una nuova generazione di anticorpi monoclonali umani in forma di *single chain fragment variable* (scFv), ii) controllo e verifica dei requisiti di qualità ed immunotossicologici di anticorpi monoclonali di cui è stata richiesta da parte di istituzioni sia pubbliche che private l'autorizzazione per la sperimentazione clinica di fase I. Gli obiettivi che il Reparto si è posto come sviluppo della propria attività triennale emergono da una sintesi fra le esigenze di una ricerca ad elevato impatto sociale e le competenze estremamente innovative acquisite da parte dei ricercatori in campo biotecnologico e in particolare nel disegno e costruzione di anticorpi monoclonali umani ricombinanti. Le tematiche che caratterizzeranno l'attività di ricerca includono:

– Immunoterapia dei tumori

L'attività di ricerca del gruppo di lavoro che è caratterizzata dallo studio *in vitro* di farmaci di origine chimica e biologica (anticorpi monoclonali) capaci di esercitare un'azione inibitoria nei confronti della proliferazione di cellule tumorali esprimenti un fenotipo a resistenza multipla ai farmaci (MDR) si articolerà intorno allo sviluppo di nuovi e più efficaci sistemi di cura delle AML prendendo in esame: i) farmaci ad attività pro-apoptotica come l'NHBDEX in varianti MDR non più responsive ai trattamenti convenzionali, ii) una combinazione chemio-immunoterapica consistente nel disegno e sviluppo di anticorpi monoclonali anti CD33 in forma di scFv legati covalentemente all'NHBDEX, iii) la verifica di un eventuale sinergismo di farmaci e anticorpi monoclonali anti CD44 nella eradicazione di AML a fenotipo MDR. L'interesse per lo studio di terapie innovative di questa particolare classe di tumori si basa su una serie di osservazioni che dimostrano come il fenotipo MDR presente nelle AML all'esordio o in seguito al trattamento chemioterapico sia specificamente legato all'aumentata espressione della MDR1-P-glicoproteina e/o della MRP1. In particolare abbiamo verificato come una delle immunochimioterapie correntemente utilizzate per la cura delle AML risulti inefficace (Mylotarg) a causa della abilità della MDR1-P-glicoproteina di espellere la caliceamicina direzionata mediante il mAb anti CD33 verso leucemie di origine mieloide. Le ricerche si articoleranno intorno alle direttrici sopra illustrate e prevedono di

esaminare l'efficacia del Mylotarg in presenza di farmaci substrato della MDR1-P-glicoproteina inclusi gli inibitori delle integrasi e delle proteasi (Saquinavir, Ritonavir). L'obiettivo è quello di verificare se e come questi composti inducano nelle AML una sensibilizzazione *de novo* al Mylotarg e in particolare alla calicheamicina. In parallelo verrà sviluppato un nuovo composto formato dall'anticorpo anti CD33 e NHBDEX che esercita la sua attività pro-apoptotica indipendentemente dalla presenza o meno di ABC trasportatori quali l'MDR1-P-glicoproteina e l'MRP1. Inoltre verificheremo se la combinazione del mAb anti CD44 con NHBDEX o farmaci (doxorubicina, idarubicina) correntemente utilizzati per il trattamento delle AML eserciti un effetto sinergico sulla eradicazione di tumori di origine mieloide.

– Sviluppo di biosimilari

L'obiettivo principale di questo studio consiste nello sviluppo di anticorpi monoclonali di nuova generazione costituiti da frammenti immunoglobulinici umani in forma di scFv sviluppati rigorosamente *in vitro* e in grado di sostituire, migliorandone di aspetti di sicurezza ed efficacia quegli anticorpi di largo impiego clinico le cui protezioni brevettuali sono in scadenza nei prossimi anni. La strategia immunoterapica che ci siamo prefissi di sviluppare è completata dal direzionamento di proteine effettrici già sperimentate e registrate per il trattamento di varie patologie. La messa a punto di questi sofisticati sistemi di immunoterapia per lo sviluppo di biosimilari sta suscitando un notevole interesse da parte delle istituzioni per il rilevante impatto economico che il servizio sanitario si troverà ad affrontare nei prossimi anni e che necessita di un valido contributo da parte degli enti di ricerca nazionali.

– Immunoprofilassi di malattie infettive emergenti

L'estesa caratterizzazione del genoma di patogeni di origine virale (i.e. Co-SARS, H5N1, HIV-1) e batterica (i.e. *Staphylococcus aureus*) ha consentito l'espressione, produzione e sintesi di proteine ricombinanti o di polipeptidi mimanti specifici epitopi ad attività funzionale che possono essere utilizzati per isolare *in vitro* e in condizioni di sicurezza, una larga varietà di anticorpi monoclonali umani in forma di scFv. La disponibilità di questo materiale antigenico permette inoltre la immunizzazione di animali e/o la restimolazione di linfociti umani per l'amplificazione della risposta umorale *in vitro*. Per ottenere anticorpi monoclonali umani da utilizzare per la immunoterapia di malattie infettive incluse quelle associate a patogeni emergenti verranno utilizzate distinte procedure biotecnologiche. La prima è basata sulla selezione *in vitro* di scFvs specifici mediante *biopanning* di una libreria anticorpale sintetica sull'antigene di interesse. La particolare struttura molecolare di questi frammenti anticorpali permettendo un facile isolamento dei geni codificanti per le VH e VL rende agevole procedure di ingegneria genetica quali la mutagenesi mirata/random per l'aumento dell'affinità di legame e lo sviluppo di immunoglobuline intere (IgG) mediante utilizzo di sistemi espressivi eucariotici. Questo nuovo tipo di immunoreagenti posseggono tutte le qualità di potenziali composti anti-infettivi: sono di origine umana quindi poco o nulla immunogenici e si legano usualmente con buona affinità verso l'antigene virale; inoltre, la loro ridotta massa molecolare consente una efficiente penetrazione tissutale e una rapida *clearance* ematica. Il secondo approccio metodologico che intendiamo mettere in atto per la produzione di anticorpi monoclonali umani per la immunoprofilassi di malattie infettive ripercorre in parte tecniche di genetica cellulare somatica utilizzate per la selezione di ibridomi. In particolare, i linfociti di pazienti in fase di remissione verranno ristimolati *in vitro* in presenza di antigeni specifici rappresentati da polipeptidi o proteine ricombinanti mentre l'amplificazione delle cellule immunocompetenti sarà sostenuta da linfocine e oligo CpG. Questi sistemi hanno già dimostrato la loro validità di eccellenti

adiuvanti della risposta immune e hanno come scopo l'arricchimento della popolazione linfocitaria che dovrà essere sottoposta ad immortalizzazione per l'ottenimento di linee cellulari secernenti anticorpi monoclonali di pre-determinata specificità. I linfociti immortalizzati mediante EBV clonati e testati per la produzione di immunoglobuline specifiche potranno essere utilizzati come donatori di materiale genetico per la costruzione di librerie anticorpali "immuni" dalle quali selezionare scFv specifici ma anche come partner di fusione cellulare somatica con eteromieliomi per la selezione di ibridomi chimerici. Opportune manipolazioni di biologia cellulare consistenti nell'utilizzo di marcatori di selezione per il mantenimento preferenziale dei cromosomi umani recanti i geni delle immunoglobuline combinato al continuo clonaggio degli ibridomi chimerici avranno come obiettivo l'isolamento di linee cellulari secernenti in modo stabile e continuo gli anticorpi monoclonali di interesse.

– *Immunotargeting*

Esiste una grandissima esigenza di nuovi schemi di trattamento per alcuni tipi di neoplasie estremamente aggressive che associno ad una più elevata probabilità di guarigione anche effetti di tossicità collaterale a lungo termine ridotti rispetto a quelli delle terapie antitumorali usate correntemente. Al fine di raggiungere questo scopo, si possono prendere in considerazione diversi approcci terapeutici innovativi tra cui l'utilizzazione di anticorpi monoclonali (e dei suoi derivati biotecnologici) che sta assumendo in questi ultimi anni un ruolo di primo piano nel trattamento di tumori solidi precedentemente considerati incurabili. Ciò è dovuto ad una serie di fattori che includono elevata efficacia e buona tollerabilità della immunoterapia, se comparata con analoghi trattamenti antitumorali. Inoltre, dai dati presenti in letteratura e derivanti da numerose sperimentazioni cliniche, risulta evidente che la buona risposta al trattamento basato sulla sola somministrazione dell'anticorpo monoclonale in pazienti affetti da tumori solidi metastatici (per esempio, Herceptin-Genentech, per il carcinoma mammario metastatico HER-2/neu+; Herbitux-ImClone ed Avastin-Genentech, per il carcinoma metastatico coloretale) diventa eccellente se combinata con immuno-direzionamento di IL-2 o TNFa. Alla luce di queste osservazioni e considerando la natura estremamente aggressiva del carcinoma intestinale, osteosarcoma e melanoma emerge la necessità di verificare se una immunoterapia combinata con la somministrazione di chemioterapici o linfocine specifiche sia una strategia di cura efficace e sufficientemente sicura. Pertanto, nel corso del futuro triennio intendiamo valutare l'efficacia pre-clinica del sistema ADEPT esaminando se e come la somministrazione combinata della proteina di fusione scFvCEA:yCD e di 5-FC agisca nella eradicazione di tumori solidi CEACAM1 -positivi come il carcinoma gastrico direzionando in modo selettivo la formazione di 5-FU in sede loco-regionale. Parallelamente a questo studio svilupperemo altri modelli biotecnologici per la immunoterapia dei tumori non responsivi al trattamento farmacologico. In particolare verrà prodotta una proteina di fusione composta dall'anticorpo scFvCEA e IL-2 in considerazione della espressione del CEACAM1 sui melanomi e della loro provata suscettibilità alla linfocina. Inoltre è nostro intento sviluppare anticorpi monoclonali umani in forma scFv e chimerici ricombinando le immunoglobuline di un ibridoma anti CD99 con Fc umane per sviluppare specifiche proteine di fusione da utilizzare nel sistema ADEPT o in combinazioni con composti citotossici per la cura degli osteosarcomi ed EW.

– Attività istituzionali e regolatorie

Armonizzazione in ambito EU dei requisiti di qualità degli anticorpi monoclonali per la sperimentazione clinica di fase I. Valutazione dei requisiti di qualità e immunotossicologici degli anticorpi monoclonali per la sperimentazione clinica (comma c).

Sviluppo di sistemi biotecnologici (modelli cellulari -non animali) per studi tossicologici di farmaci di nuova sperimentazione. *Scientific advice* per ditte nazionali ed estere per lo sviluppo di anticorpi monoclonali per usi diagnostici e clinici.

Progettualità per il triennio 2009-2011 del Reparto Farmacologia Molecolare e Cellulare

- Attività scientifica – Obiettivi generali

L'obiettivo comune dei progetti di ricerca svolti nel Reparto è quello di acquisire nuove conoscenze sulla chimica funzionale che regola le interazioni tra farmaci e i recettori di membrana che operano la trasduzione di segnali biologici attraverso le G proteine. Tali recettori, che mediano gli effetti della maggioranza di ormoni e neurotrasmettitori endogeni, sono il sito di azione di una gran parte dei farmaci attualmente in uso e costituiscono il target principale su cui è indirizzata la ricerca di nuove molecole terapeuticamente attive da parte dell'industria. Utilizzando tecniche di sintesi organica per la progettazione di nuovi analoghi strutturali dei ligandi naturali, e di ingegneria genetica per apportare modifiche nella struttura dei recettori, i nostri progetti mirano a raggiungere due principali traguardi: i) identificare il repertorio di interazioni molecolari che determinano l'attività agonistica o antagonistica di molecole farmacologicamente attive; ii) accertare il tipo di architettura sovramolecolare che controlla la propagazione e la terminazione dei segnali recettoriali e quale ruolo svolga nel determinare l'efficacia dei farmaci. Fine ultimo di tali studi è trovare nuove strategie per la sintesi di farmaci terapeuticamente attivi attraverso il disegno razionale di molecole mirate ad influenzare selettivamente solo gli aspetti terapeuticamente vantaggiosi delle proprietà funzionali dei recettori.

Progetti di Ricerca

- Nuove molecole per lo studio della omo- ed etero-oligomerizzazione del recettore Oppioide della Nocicettina

Scopo dello studio: Generare nuove molecole con attività antidolorifica che sfruttano la tendenza dei recettori oppioidi della nocicettina a formare complessi dimerici.

Fasi dello studio:

- Progettazione, sintesi e caratterizzazione strutturale di molecole costituite da due farmacofori collegati da *linker* a lunghezza variabile ("ligandi bivalenti").
 - Studio delle proprietà farmacologiche delle nuove molecole. Affinità, efficacia e selettività.
 - Studio mediante tecniche basate *transfer* di energia di risonanza indotto da luminescenza dell'effetto di tali molecole sullo stato di dimerizzazione del recettore della nocicettina.
 - Studio dell'interazione ligando-recettore con tecniche di Risonanza Magnetica Nucleare mono e bidimensionali in soluzione e allo stato solido per mettere in evidenza le variazioni e preferenze conformazionali dei ligandi in interazione con la proteina e fornire utili indicazioni per la progettazione di nuove strutture molecolari attive.
 - Controllo farmacologico del bilancio tra internalizzazione e attivazione dei recettori
- Scopo dello studio: A differenza dei ligandi naturali che attivano e desensibilizzano i recettori con identica efficacia, alcuni farmaci di sintesi dimostrano un effetto selettivo su queste due funzioni recettoriali. Lo scopo del progetto è identificare i requisiti strutturali che dirottano l'efficacia dei farmaci verso l'una o l'altra attività funzionale.

Fasi dello studio:

- Costruzione mediante ingegneria genetica di recettori oppioidi della nocicettina, e dopaminergici D1, D2 e D3 fusi al gene della luciferasi. Tali costrutti espressi in cellule in cultura che contengono subunità beta della G proteina o arrestina fuse al gene della GFP, permettono di misurare indipendentemente l'interazione recettore-G proteina (attivazione) e l'interazione recettore-arrestina (desensitizzazione) attraverso l'analisi del *transfer* di energia di risonanza indotto da luminescenza (BRET).
- Generazione di linee cellulari transfettate con coppie recettori luminescenti e partner d'interazione fluorescenti. Loro impiego per lo studio della efficacia differenziale di farmaci oppioidi nociceptinici e dopaminergici nell'attivare o internalizzare i rispettivi recettori.
- Generazione di mutazioni nella regioni citosoliche dei recettori per valutare quali domini strutturali regolano differenzialmente l'interazione con G proteina o con arrestina.
- Identificazione di strutture *lead* che dimostrano la maggiore divergenza tra efficacia nell'internalizzare e nell'attivare il recettore. Sintesi di analoghi strutturali allo scopo di massimizzare tali divergenze.

- Attività istituzionali e di controllo

L'attività istituzionale e di controllo continuerà nell'ambito della convenzione con l'AIFA con la valutazione del modulo III (Qualità) del *Common Technical Document* (CTD) e stesura del relativo *Assessment Report* di prodotti medicinali in fase di registrazione secondo le procedure europee Decentrate e Centralizzate con l'Italia come Paese di riferimento (RMS) o come *(Co)Rapporteur* e con la valutazione della stessa parte in procedure di Mutuo Riconoscimento e Decentrate in cui l'Italia è un *Concerned Member State* (CMS). Il gruppo parteciperà inoltre alla stesura dei rapporti di valutazione dei dossier di medicinali da utilizzare nella sperimentazione clinica di fase I e alle ispezioni di Buona Pratica di Fabbricazione (GMP) di radio farmaci in accordo al DL.vo 219/2006 art. 53. comma 12. Proseguirà inoltre l'intensa collaborazione con l'AIFA nell'ambito delle attività del *Quality Working Party* dell'EMEA.

Progettualità per il triennio 2009-2011 delle attività legate all'autorizzazione delle sperimentazioni cliniche di fase I – Riflessioni e linee di indirizzo per il futuro

La sperimentazione clinica di fase I rappresenta tipicamente il passaggio dalla sperimentazione preclinica (*in vitro* e/o sull'animale) alla prima somministrazione di un farmaco nell'uomo. Tale passaggio, quindi, costituisce un momento particolarmente importante nello sviluppo di un nuovo farmaco. I DL.vi 211/2003, 200/2007 e DPR 430/2001 hanno indicato l'ISS come l'Autorità Competente per l'autorizzazione di tutte le sperimentazioni cliniche di fase I da condursi sul territorio nazionale.

- Importanza della sperimentazione di fase I

La possibilità di sperimentare i nuovi farmaci nelle fasi precoci di sviluppo rappresenta un'importante occasione di crescita e innovazione per il Paese. Nel settore dello sviluppo farmaceutico, tuttavia, l'Italia occupa una posizione marginale rispetto all'Europa e a molte altre nazioni del mondo; in particolare il nostro Paese presenta una notevole carenza nella capacità di ricerca clinica *early phase*. Per questa ragione l'ISS ha avviato una serie di iniziative volte a facilitare/promuovere la sperimentazione di fase I in Italia. Tali iniziative hanno consentito di ridurre notevolmente i tempi di valutazione delle richieste, che ormai sono del tutto in linea con quelli degli altri Paesi europei. È importante sottolineare che la riduzione dei tempi di istruttoria è stata ottenuta attraverso un potenziamento della segreteria tecnica e un miglioramento del processo organizzativo,

mentre la qualità e il grado di approfondimento dei pareri hanno mantenuto lo stesso livello del passato.

In seguito alla riduzione dei tempi di istruttoria, e grazie all'atteggiamento di piena collaborazione adottato sia dalla segreteria che dalla Commissione, gli utenti hanno cominciato a percepire l'Istituto come un interlocutore più aperto e affidabile, rispondendo con un netto aumento del numero di richieste presentate. Nonostante questo risultato, il numero di richieste di sperimentazione di fase I resta ancora lontano dalla media degli altri Paesi. Questo dipende probabilmente dal fatto che il processo complessivo di avvio della sperimentazione risulta tuttora complicato, e dai tempi spesso imprevedibili. La fase autorizzativa della sperimentazione rappresenta infatti solo il primo passo di un processo che comprende altri attori e implica una serie di aspetti etici, organizzativi e tecnici indipendenti dall'ISS. Perché il processo di promozione della sperimentazione di fase I sia coronato da un reale successo, nel prossimo futuro occorrerà mettere in atto una serie di nuove iniziative che consentano una gestione complessiva e armonizzata del processo. Idealmente, questo dovrebbe comportare una presa in carico globale della fase I da parte dell'ISS. Una possibile proposta di implementazione comporterebbe la creazione di una struttura dedicata, nuove procedure di reclutamento e formazione dei valutatori, e la creazione di uno sportello informativo informatico sul territorio nazionale. Ciascuno di questi punti viene descritto brevemente di seguito.

- Creazione di una struttura dedicata per la fase I
Il processo di promozione della sperimentazione di fase I richiederà un notevolissimo carico di lavoro e di risorse, nonché una formazione continua e una partecipazione sistematica ai vari tavoli e gruppi di lavoro coinvolti (ad esempio presso l'AIFA e l'EMA). Per fare fronte efficacemente a tutte queste attività è indispensabile identificare e/o creare delle professionalità specifiche. Si suggerisce pertanto di creare una struttura dedicata per la fase I (struttura "autorità competente per la fase I": FASEI-AC) che si dedichi completamente alla realizzazione di questo progetto. A fronte di costi minimi, la creazione di questa nuova struttura potrebbe consentire il raggiungimento di obiettivi molto importanti per l'ISS e per tutto il Paese. La tipologia di struttura andrà valutata in una fase successiva, ma è opportuno che rimanga all'interno del Dipartimento, che sia caratterizzata da un organigramma adeguato e processi istituzionali trasparenti. FASEI-AC potrà essere realmente una risorsa solo se sarà in grado di dotarsi di strumenti operativi di veloce interazione con le altre strutture di riferimento (AIFA, CE, Siti Clinici, la rete degli IRCCS, Ministero della Salute), in una logica di facilitazione e potenziamento globale della fase autorizzativa.
- Reclutamento e formazione degli esperti
La valutazione dei dati di qualità e dei risultati degli studi preclinici richiede delle competenze altamente specialistiche. Sebbene tali competenze siano rappresentate presso l'ISS, il numero e la professionalità degli esperti dedicati all'attività di valutazione devono essere assolutamente incrementati. La complessità del processo di valutazione, infatti è andata aumentando in modo direttamente proporzionale alla mole di dati necessari per autorizzare una sperimentazione di fase I, e alle norme e linee guida che la regolano. È perciò necessario che la struttura FASEI-AC sia in grado di gestire il continuo processo di qualificazione professionale di coloro che hanno la responsabilità delle valutazioni dei dossier dei prodotti in investigazione (IMPD), identificati appunto con il termine valutatori, in analogia a quanto accade a livello europeo (*EMA Quality, Non Clinical and Clinical Assessor*). Questo è ancor più vero oggi, in quanto il contributo crescente delle terapie avanzate (cellulare, genica tessuti ingegnerizzati) richiede la disponibilità di valutatori esperti di biologia molecolare e con formazione sempre più

specifica. Il processo di ampliamento della lista di valutatori non può prescindere da alcuni aspetti fondamentali. Innanzitutto la motivazione a dedicarsi (parzialmente o esclusivamente) all'attività di valutazione; aspetto che richiede come condizione essenziale il riconoscimento formale e formalizzato di tale attività ai fini della progressione di carriera. In secondo luogo deve essere previsto un programma sistematico di formazione e aggiornamento degli esperti valutatori per garantire il mantenimento di uno standard qualitativo qualificato e omogeneo [Vedi anche proposta di Programma Nazionale Formazione Valutatori (PNFV) da parte del Reparto di Farmacologia biochimica e unità di coordinamento dell'attività di consulenza tecnico scientifica]. Deve inoltre essere presa in considerazione la possibilità di avere, in maniera formalizzata, retribuita, trasparente (conflitto di interessi), una lista di esperti clinici esterni all'ISS, la cui consulenza assume ad esempio particolare rilevanza per le problematiche collegate alle sperimentazioni che implicano l'uso di popolazioni pediatriche.

– Consulenza e comunicazione – Sportello informatico

Le normative sui prodotti medicinali subiscono spesso aggiornamenti e modifiche, in genere nel senso di ampliamento delle richieste pre-autorizzazione, e influenzano anche le sperimentazioni cliniche di fase I. L'impatto regolatorio è certamente più pesante per le sperimentazioni di provenienza non industriale che vengono proposte da IRCSS, ospedali, Centri di medicina nucleare, ecc. Questo ha creato un incremento esponenziale di richieste di chiarimenti da parte di ricercatori *non-profit*. La creazione di uno sportello informatico interattivo appare uno strumento funzionale al fine di fornire un servizio di informazione e consulenza riguardo il contesto normativo, le modalità di preparazione e presentazione dei dossier dei prodotti in investigazione, il corretto inserimento nelle varie banche dati (Osservatorio delle sperimentazioni cliniche, come da DM dicembre 2007) [Vedi anche proposta di Sportello www.Info-Reg.gov.it da parte del Reparto di Farmacologia biochimica e unità di coordinamento dell'attività di consulenza tecnico scientifica].

Progettualità per il triennio 2009-2011, del gruppo di lavoro Medicine complementari, naturali e tradizionali

Il gruppo di Medicine complementari, naturali e tradizionali del Dipartimento del Farmaco ha come missione principale quella di ottenere dalle piante usate nella medicina tradizionale e naturale, sia dei Paesi in via di sviluppo che industrializzati, costituenti attivi da usare come modelli molecolari per lo sviluppo di nuovi farmaci o come nuovi rimedi terapeutici e trovare una rispondenza tra l'attività riscontrata e il "tradizionale uso medicinale". Il team è impegnato anche nella caratterizzazione di piante usate come materie prime in preparati erboristici. L'apertura delle frontiere ad un mercato ormai mondiale rende, infatti, necessario un maggiore controllo della qualità e della sicurezza di tali prodotti in commercio.

– Attività di ricerca

- Studi fitochimici di piante usate nella Medicina tradizionale naturale al fine di evidenziarne l'attività farmacologica.
- Studi quali-quantitativi di sostanze naturali vegetali: identificazione e controllo di qualità delle droghe vegetali e loro preparati monocomponente.
- Isolamento e identificazione di principi attivi e/o fitocomplessi da piante con evidente interesse terapeutico al fine di sottoporli alle successive valutazioni biofarmacologiche nell'ambito del TISNa (Terapie Innovative Sostanze Naturali) a cui il gruppo appartiene.

– Attività di controllo

- Attività di consulenza richieste da AIFA, EFSA, Autorità Giudiziaria in merito a sostanze naturali in preparazioni erboristiche, medicinali e integratori alimentari;
- Pareri connessi con le procedure di registrazione centralizzata e di Mutuo Riconoscimento in ambito UE.

Revisione di monografie di Farmacopea europea inerenti farmaci chirali

La maggior parte dei farmaci di origine non naturale prima degli anni '80-'90 veniva commercializzata prevalentemente sotto forma di miscele racemiche, ovvero miscele 50:50 dei due enantiomeri. Negli ultimi 20 anni le innovazioni tecnologiche hanno reso più praticabile la sintesi di singoli enantiomeri; le attività regolatorie hanno via via richiesto che, quando i farmaci in via di sviluppo sono costituiti da una miscela racemica, l'industria produttrice valuti l'efficacia dei singoli enantiomeri e scelga quale dei due commercializzare. Quindi nel prossimo futuro la commercializzazione di nuovi farmaci costituiti da miscele racemiche tenderà a ridursi progressivamente. Fra i nuovi farmaci commercializzati sin dall'inizio come singoli enantiomeri, vi sono: paroxetina, pravastatina, valsartan. In alcuni casi gli enantiomeri immessi sul commercio sono l'enantiomero attivo (*chiral switch*) di miscele racemiche di provata efficacia clinica. L'esempio più importante di *chiral switch* è fornito dall'omeprazolo, commercializzato per la prima volta nel 1988 dalla ditta AstraZeneca e poi introdotto sul mercato dalla stessa società farmaceutica come (S)-omeprazolo col nome commerciale Nexium.

La richiesta sempre più pressante di farmaci enantiomericamente puri ha determinato un rapido sviluppo di metodologie analitiche inerenti alla ricognizione molecolare. La cromatografia liquida ad elevate prestazioni basata sull'impiego di fasi stazionarie chirali (FSC), rappresenta il metodo di scelta per la determinazione diretta ed accurata della purezza enantiomerica.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto di ricerca che presentiamo ha come obiettivo lo sviluppo di nuove metodiche analitiche in monografie di farmaci chirali venduti come singoli enantiomeri, adeguatamente convalidate inerenti principalmente la determinazione quantitativa dell'impurezza enantiomerica. Infatti quando un farmaco viene commercializzato nella forma enantiopura, l'enantiomero meno attivo (o tossico) viene considerato come impurezza. Saranno messi a punto a riguardo metodi cromatografici ad elevate prestazioni basati sull'impiego fasi stazionarie chirali polisaccaridiche di ultima generazione per la risoluzione di sostanze di interesse farmaceutico, quali la terazosina, un antiipertensivo lieve, l'amlodipina, ipotensivo e indicato nel trattamento dell'angina pectoris, l'omeprazolo, un potente inibitore della protonica (PPI). I metodi analitici enantioslettivi saranno applicati per valutare impurezze chirali inferiori all'1% di enantiomeri commercialmente disponibili.

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni.

Riprogrammare l'efficacia dei farmaci alterando il bilancio tra attivazione e disattivazione del recettore

I recettori di membrana associati a G proteine (GPCR) sono il sito d'azione di una gran parte di farmaci attualmente in uso e costituiscono il bersaglio più appetibile nella ricerca di nuovi farmaci. Quando un recettore è occupato dal ligando naturale si verificano due principali eventi biologici: i) il recettore interagisce con un trasduttore (la G-proteina) che innesca i meccanismi di trasduzione del segnale da cui origina la risposta biologica, ii) ma simultaneamente richiama verso la membrana una proteina nota come arrestina che internalizza il recettore terminando la

risposta biologica. Ogni ormone o neurotrasmettitore noto è in grado di attivare e inattivare il recettore con identica efficienza.

Tuttavia, evidenze recenti dimostrano che molti farmaci di sintesi, a differenza degli agonisti naturali, non hanno la stessa efficacia nell'attivare e nel desensibilizzare il recettore. Lo scopo di questo progetto è comprendere i meccanismi molecolari che sono alla base di questa dissociazione di efficacia e utilizzare tale conoscenza per la progettazione di nuove molecole con attività farmacologica selettiva verso l'una o l'altra delle due interazioni.

Il lavoro mira a raggiungere tre obiettivi: i) perfezionare metodologie ottiche che permettono di misurare in cellule viventi le interazioni del recettore con arrestina e G proteina e utilizzarle per valutare le relative efficacie di farmaci su tali interazioni in svariati recettori; ii) analizzare il rapporto tra struttura molecolare ed efficacia per le due interazioni; iii) sintetizzare nuovi analoghi con efficacia ristretta verso l'attivazione o la disattivazione.

Risultati attesi nel triennio

Nel triennio scorso abbiamo ottimizzato una tecnica basata sul *transfer* di energia di risonanza indotto da luminescenza (BRET) che consente di visualizzare individualmente le interazioni del recettore con arrestina e del recettore con la subunità beta della G proteina. Applicando tale metodologia ai recettori oppioidi e beta adrenergici abbiamo individuato sia molecole che hanno una totale assenza efficacia nella internalizzazione pur mantenendo invariata la capacità di attivare il signaling del recettore, sia strutture che al contrario mostrano una leggera prevalenza di efficacia nei confronti dell'arrestina rispetto alla G proteina.

Nel corso del prossimo triennio contiamo di estendere questi studi seguendo tre principali linee di ricerca:

- Mettere a punto nuove tecniche basate sulla tecnologia BRET per illuminare altre interazioni che contribuiscono al processo di desensibilizzazione, quali quella tra recettore e kinasi GRK o recettore e *adaptor protein* AP2
- Estendere l'analisi ad altri recettori di interesse terapeutico quali i recettori dopaminici D1 e D3 (coinvolti nella patogenesi del morbo di Parkinson), i recettori dell'angiotensina (coinvolti in varie sindromi ipertensive), e i recettori delle chemokine.
- Utilizzando come *lead* le strutture individuate negli studi precedenti sintetizzare e analizzare (in collaborazione con il gruppo del Prof. Salvadori dell'Università di Ferrara) nuovi analoghi basati sul farmacoforo oppioide 2',6'-dimetiltirosina-Tic (Tic=acido 1,2,3,4-tetraisochinilina-3-carbossilico) per eventualmente trovare un agonista capace di internalizzare il recettore senza attivarlo.

Trasferibilità dei risultati

Questo progetto si propone di ottenere informazioni fondamentali sulla chimica funzionale dei recettori GPCR che siano globalmente applicabili a tale famiglia di proteine. In particolare mira a delucidare attraverso quali alterazioni molecolari della struttura del farmaco sia possibile controllare se la molecola una volta occupato il recettore ne aumenti selettivamente la propensione ad emettere segnali o piuttosto a scomparire dalla membrana attraverso endocitosi.

Tali informazioni avrebbero un importante impatto sulle attuali strategie di progettazioni e sintesi di farmaci innovativi. È ovvio immaginare quali importanti applicazioni terapeutiche possano derivare da una strategia basata sul controllo del bilancio tra attivazione e internalizzazione. Farmaci capaci indurre il recettore ad emettere segnali senza internalizzarlo costituirebbero un vantaggio in tutti quei casi in cui l'efficacia della terapia farmacologica è limitata o abbreviata da fenomeni di rapida tolleranza. Al contrario, farmaci capaci di internalizzare il recettore senza attivarlo costituirebbero una nuova classe di antagonisti con effetti estremamente benefici in quelle malattie dove l'eccessivo stimolo recettoriale contribuisce alla patogenesi (es ipertensione, scompenso cardiaco, tossicodipendenze) oppure in forme

infettive dove un recettore è opportunisticamente utilizzato come porta d'ingresso del virus nella cellula (vedi HIV e recettori chemochinici).

Ruolo dei recettori A2A dell'adenosina nella modulazione delle funzioni del BDNF in condizioni normali e patologiche

Il BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) è la neurotrofina con la più ampia distribuzione nell'SNC dove, oltre a regolare la proliferazione, il differenziamento e la sopravvivenza cellulare, modula la plasticità sinaptica e fenomeni correlati con l'apprendimento e la memoria. Il BDNF è colocalizzato con la proteina huntingtina nei neuroni corticali che proiettano allo striato e la maggior parte del BDNF striatale è prodotto nella corteccia cerebrale e trasportato in vescicole lungo la via afferente corticostriatale.

La Corea di Huntington è una malattia neurodegenerativa ereditaria trasmessa con carattere autosomico dominante, caratterizzata da disturbi motori e cognitivi e per la quale sono disponibili solo trattamenti sintomatici. L'anomalia genetica consiste in un'abnorme espansione della tripletta CAG sul gene IT15 che codifica per la proteina huntingtina. Stretti legami funzionali sono stati dimostrati tra huntingtina e BDNF. È stato dimostrato che l'huntingtina normale interviene nella trascrizione genica del BDNF (attivando il promotore della trascrizione) e ne facilita il trasporto vescicolare dalla corteccia allo striato. La dimostrazione che l'huntingtina mutata perde queste funzioni e che nello striato il BDNF è particolarmente importante per la sopravvivenza dei neuroni striatali e l'attività delle sinapsi corticostriatali ha fatto ipotizzare possibili strategie terapeutiche che prevedano la somministrazione di BDNF. Purtroppo però l'impiego terapeutico nell'uomo è limitato da difficoltà nella somministrazione e insufficiente liberazione nei siti di interesse delle neurotrofine. La recente scoperta che i recettori delle neurotrofine possono essere transattivati da altri neurotrasmettitori accoppiati alle proteine G (in particolare, dai recettori A2A dell'adenosina) ha aperto una nuova prospettiva. In particolare è stato dimostrato in colture di neuroni ippocampali che l'agonista del recettore A2A dell'adenosina (CGS 21680) era in grado di attivare indirettamente i recettori del BDNF facilitandone gli effetti sulla sopravvivenza cellulare.

Lo scopo di questo progetto sarà quello di approfondire il ruolo dei recettori A2A dell'adenosina nella modulazione degli effetti funzionali del BDNF in due diversi modelli transgenici caratterizzati da delezione genica (topi A2A KO) o da overespressione (ratti overesprimenti il recettore) del recettore A2A. Inoltre in modelli animali di CH (topi R6/2) sarà valutata l'influenza che trattamenti acuti e cronici con agonisti e antagonisti del recettore A2A a diversi stadi della evoluzione della malattia possono avere sulla modulazione della trasmissione sinaptica BDNF-dipendente, sui livelli del BDNF ed eventualmente su altri parametri cognitivi e comportamentali di progressione della malattia.

Risultati attesi nel triennio

Caratterizzazione dell'interazione A2A/BDNF sulla trasmissione sinaptica tramite esperimenti di elettrofisiologia su fettine cerebrali (ippocampali o corticostriatali) da topi A2A KO, ratti A2A overesprimenti o da topi R6/2.

Valutazione degli effetti del trattamento con agonisti e antagonisti del recettore A2A sulla modulazione della trasmissione sinaptica BDNF-dipendente in ratti overesprimenti A2A e nei topi transgenici per CH.

Trasferibilità dei risultati

Questo è un progetto di ricerca di base, che avrà essenzialmente ricadute di carattere conoscitivo. I risultati saranno comunicati tramite i canali propri della ricerca scientifica (comunicazioni a congresso, pubblicazioni su riviste internazionali).

Ruolo del recettore mitocondriale delle benzodiazepine nelle patologie del sistema cardiovascolare e del sistema nervoso centrale

Un recettore delle benzodiazepine (BDZ) è presente nel *permeability transition pore* (PTP) delle membrane dei mitocondri (RMB o recettore mitocondriale delle BDZ). La sua attivazione rappresenta una tappa limitante nell'avvio della steroidogenesi. Il suo legando endogeno è un polipeptide (ODN), frammento del legando endogeno del recettore neuronale delle BDZ (DBI) che agisce anche come trasportatore di membrana per l'acil-CoA.

Una delle vie nella genesi dell'apoptosi passa attraverso la liberazione citoplasmatica di citocromo c, una proteina mitocondriale intermembranaria, che attiva le caspasi, la cui liberazione sarebbe legata a cambiamenti nella permeabilità della membrana mitocondriale mediata dal PTP.

L'RMB è coinvolto in patologie (ansia, convulsioni, insonnia) che rispondono alle benzodiazepine, nella tolleranza al loro effetto sedativo, nella steroidogenesi, nel controllo del broncospasmo, e nel contrastare l'apoptosi da TNF, fattore coinvolto nell'ipertrofia cardiaca e nella depressione della contrattilità cardiaca. L'apoptosi contribuisce alla perdita di cardiomiociti nello stadio terminale dell'insufficienza cardiaca nell'uomo, e durante la fase di transizione dall'ipertrofia compensatoria all'insufficienza cardiaca nell'animale da esperimento.

L'impiego di due legandi selettivi dell'RMB, Ro 5-4864 e PK 11195, ha aperto alcuni interrogativi, in quanto essi mostrano: i) proprietà differenti a livello centrale (rispettivamente agonista e antagonista) e analoghe a livello periferico (stessa azione broncocostrittiva e antiapoptotica), e ii) una densità dei siti di legame per il PK 11195 doppia rispetto al Ro 5-4864 nel cervello.

Questo progetto intende esplorare il possibile coinvolgimento, diretto o attraverso la produzione di steroidi, dell'RMB: i) nella progressione verso lo scompenso cardiaco in condizioni di sovraccarico emodinamico, ii) nella capacità di farmaci neuropsicotropi di impiego consolidato in clinica di influenzare proliferazione, differenziamento e apoptosi delle cellule neuronali.

A questo scopo saranno studiate le risposte di legandi dell'RMB in modelli sperimentali validati, in confronto con farmaci di impiego clinico consolidato, quali: i) l'ipertrofia patologica e insufficienza cardiaca nel topo, e ii) colture cellulari di cardiomiociti e iii) le colture neuronali da embrioni di ratto di 17 giorni.

Risultati attesi nel triennio

- Sistema cardiovascolare
 - Identificare i geni coinvolti nel rimodellamento parietale patologico (ipertrofia eccentrica dominata da dilatazione e fibrosi ventricolare) mediante analisi dei profili genomici del modello murino di insufficienza cardiaca da sovraccarico emodinamico assoluto e relativo (ipertrofia cardiaca e infarto del miocardio).
 - Contrastare lo sviluppo dell'ipertrofia cardiaca da sovraccarico pressorio con ligandi dell'RMB e dei recettori beta-adrenergici (propranololo e metoprololo) e caratterizzazione dei cardiomiociti in coltura in risposta ad agenti farmacologici in grado di attivare la via di segnalazione intracellulare Gq-dipendente.
 - Identificazione di ligandi del recettore beta-adrenergico con attività anti-ipertrofica e delle vie di segnalazione che si oppongono allo sviluppo dell'ipertrofia cardiaca.
 - Soppressione di geni coinvolti nel processo di ipertrofia patologica mediante targeting con siRNA e valutazione del loro potenziale terapeutico.
- Sistema nervoso centrale
 - Si procederà alla caratterizzazione del modello di neurotossicità da fluoxetina (>2,5 µM) nelle colture embrionali di cervello di ratto. Il danno consiste nella progressiva riduzione

fino a scomparsa dei neuriti e dell'attività mitocondriale (metodo MTT). Tale effetto non appare riferibile alla proprietà inibitoria del prodotto sulla ricaptazione della serotonina poiché, a differenza di quest'ultimo, è stereoselettivo e richiede una lunga latenza (superiore alle 13 h). Caratteristiche, queste ultime, presenti nell'effetto steroidogenico della fluoxetina. Sarà così esaminato l'eventuale coinvolgimento degli steroidi.

Questo rappresenta il modello principale sul quale saranno eseguiti approfondimenti mirati, prima di estendere gli studi agli altri composti che a concentrazioni >20 µM hanno dato effetti analoghi alla fluoxetina (PK11195, Ro 5-4864, desipramina e mifepristone), o hanno provocato variazioni contenute dell'attività mitocondriale senza evidenti modifiche istologiche (buspirone, benzodiazepine con differenti profili di legame fra recettore neuronale e mitocondriale).

Si cercherà di capire se l'azione neurotossica riguarda i meccanismi di proliferazione (come sembrano indicare alcuni dati della letteratura) [incorporazione di 3H-timidina, bromouridina] e/o di sopravvivenza cellulare. Saranno valutati anche l'espressione del trasportatore della serotonina e l'effetto della fluoxetina sui processi di maturazione dei precursori neuronali, assai numerosi nelle fasi precoci di coltura della preparazione impiegata, ricorrendo al metodo dell'immunofluorescenza con appropriati *marker* [GFAP, MAP-2, NeuN, nestina, PSA-NCAM, betaIII-tubulina]. Laddove ritenuto opportuno, saranno impiegate preparazioni di co-cultura neuroni e glia, al fine di evidenziare il ruolo di quest'ultima nei meccanismi di neurotossicità/neuroprotezione in questo modello sperimentale

Trasferibilità dei risultati

Aumento delle conoscenze scientifiche sui meccanismi di neurotossicità/neuro protezione.
Validazione del modello ai fini di farmacologia previsionale.

Ruolo della glia e dei fattori neurotrofici nella neuroprotezione indotta dal litio in modelli sperimentali di neurodegenerazione

Il litio viene utilizzato con successo da anni nel trattamento del disturbo bipolare. Negli ultimi anni l'interesse verso l'uso di questo farmaco è cresciuto enormemente in seguito alle numerose evidenze sperimentali che supportano il potenziale neuroprotettivo del litio in diverse patologie neurodegenerative.

Sebbene l'azione neuroprotettiva del litio sia ben documentata, ben poco si conosce dei meccanismi cellulari e molecolari alla base di questi effetti terapeutici.

I fattori neurotrofici sono proteine importanti sia durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale che nei processi di sopravvivenza neuronale, con un ruolo fondamentale in quei fenomeni di plasticità sinaptica che sono alla base di una trasmissione centrale normalmente funzionante. Negli ultimi tempi, l'attenzione si è rivolta in particolare al *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), una neurotrofina particolarmente espressa nell'ippocampo e nella corteccia frontale, che, oltre a svolgere un ruolo importante nei processi di apprendimento e memoria, riveste un compito fondamentale nella crescita, differenziazione, mantenimento e sopravvivenza neuronale.

In modelli sperimentali *in vitro* il trattamento con litio induce un aumento tempo-dipendente di BDNF e attiva il recettore TrkB ad esso associato. La neuroprotezione mediata dal litio è totalmente bloccata in animali *knockout* per il gene che codifica per il BDNF, suggerendo un ruolo cruciale del sistema BDNF/TrkB negli effetti terapeutici del litio.

Scopo del presente progetto sarà quello di chiarire i meccanismi responsabili degli effetti neurotrofici e neuroprotettivi del litio con particolare riferimento al ruolo della glia e del sistema

BDNF/TrkB. A tale scopo saranno utilizzati diversi modelli sperimentali (sia patogenetici che genetici) di neurodegenerazione

Risultati attesi nel triennio

Valutazione degli effetti neuroprotettivi *in vitro* del litio in presenza e in assenza di glia.

Analisi degli effetti del litio in una linea cellulare (STHdhQ111) che esprime stabilmente nella forma mutata l'huntingtina, la proteina che causa la Corea di Huntington.

Trasferibilità dei risultati

Questo è un progetto di ricerca di base, che avrà essenzialmente ricadute di carattere conoscitivo. I risultati saranno comunicati tramite i canali propri della ricerca scientifica (comunicazioni a congresso, pubblicazioni su riviste internazionali).

Ruolo della leptina nei disordini metabolici associati alle malattie cardiovascolari: differenze di genere

La leptina è una molecola pleiotropica strutturalmente correlata alla famiglia delle citochine, coinvolta nel mantenimento dell'omeostasi di diversi sistemi fisiologici tra cui il sistema immunitario. La sindrome metabolica che comprende obesità e iperinsulinemia associata ad insulino resistenza, rappresenta un fattore di rischio nello sviluppo di malattie cardiovascolari. I singoli fattori che concorrono alla sindrome metabolica si influenzano l'un l'altro e tra questi la leptina, un ormone/citochina correlato sia al metabolismo del grasso che all'insulino resistenza, 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 nelle donne. 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 da citochine infiammatorie, svolgono un ruolo critico nelle risposte infiammatorie associate alle malattie cardiovascolari. Il nostro gruppo ha dimostrato che la leptina induce la produzione di citochine infiammatorie quali IL-1beta ed IL-6, coinvolte nello sviluppo delle risposte 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.

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.

Sistemi cannabinergico e nocicettinergico: nuove prospettive terapeutiche nel trattamento del dolore, dell'ansia e dell'epilessia

Il controllo del dolore, delle convulsioni o dei disturbi dell'umore costituisce l'obiettivo della terapia con analgesici, antiepilettici, e ansiolitici. È stato suggerito che disfunzioni del metabolismo energetico mitocondriale siano correlate alla fibromialgia e al dolore neuropatico, sindromi algiche resistenti alle terapie convenzionali con oppioidi e antinfiammatori, rispondenti al trattamento con antiepilettici o antidepressivi. L'evidenza che gli oppioidi, gli antiepilettici o gli ansiolitici inducono tolleranza e dipendenza, incoraggia la ricerca pre-clinica all'individuazione di nuovi composti con attività farmacologica intrinseca, privi di effetti indesiderati. Recenti lavori hanno evidenziato le proprietà analgesiche, antinfiammatorie e antiepilettiche di agonisti dei recettori CB1/CB2 dei cannabinoidi e di ligandi del recettore NOP della nocicettina suggerendo che i sistemi cannabinergico e nocicettinergico giuochino un ruolo nel controllo del dolore dell'ansia e dell'epilessia. Gli obiettivi del nostro lavoro saranno pertanto: i) studiare gli effetti antinocicettivi, antiepilettici, ansiolitici di nuovi ligandi dei recettori CB1/CB2 e NOP in modelli sperimentali di dolore, ansia ed epilessia valutando la possibilità dei composti di indurre tolleranza; ii) verificare con metodi di *imaging* funzionale in tessuto nervoso gli effetti dei composti sulle eventuali disfunzioni mitocondriali implicate nella percezione del dolore, dell'epilessia e della tolleranza.

Risultati attesi nel triennio

In precedenti lavori condotti in collaborazione con l'Università di Ferrara, 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

Lo studio del metabolismo energetico mitocondriale quale responsabile dei fenomeni di dolore e tolleranza e la caratterizzazione di nuovi agonisti o antagonisti dei recettori dei cannabinoidi o della nocicettina con proprietà analgesiche, ansiolitiche e antiepilettiche, privi di effetti collaterali potrebbe contribuire allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche finalizzate al trattamento delle sindromi dolorose croniche, o delle sindromi epilettiformi non rispondenti alle terapie convenzionali.

Studi farmacologici sui processi di rimodellamento mitocondriale in condizioni fisiologiche e patologiche per lo sviluppo di una medicina mitocondriale

I mitocondri vanno incontro a continui processi di rimodellamento attraverso eventi di fissione e fusione. L'alterazione del bilancio tra fissione e fusione può contribuire in varia misura ai processi di degenerazione cellulare e apoptosi.

Alterazioni a livello mitocondriale sono responsabili, o si accompagnano, a numerosi eventi patologici: contribuiscono ad esempio sia alla trasformazione neoplastica, che alla resistenza intrinseca all'apoptosi mostrata da cellule tumorali metastatiche. È stato anche dimostrato che l'aggressività di cellule tumorali correla con la bassa attività respiratoria e che il ripristino della normale fosforilazione ossidativa può ridurre la crescita tumorale.

La funzione mitocondriale e l'apoptosi sono altresì alterate in numerose patologie infettive e degenerative, incluse patologie su base genetica e metabolica. Gli studi di metabolomica hanno infatti assunto crescente importanza negli ultimi anni affiancandosi agli studi di proteomica e genomica mitocondriale.

La caratterizzazione delle alterazioni mitocondriali riveste quindi particolare importanza sia nello studio dei meccanismi patogenetici di malattie umane di diversa eziologia che nella farmacologia mitocondriale.

Risultati attesi nel triennio

I nostri studi verteranno principalmente sui meccanismi molecolari alla base dei processi di rimodellamento mitocondriale sia in condizioni fisiologiche che patologiche, con particolare riferimento a condizioni neurodegenerative come quelle associate alla corea di Huntington. Si analizzerà inoltre la possibilità di intervento su tali processi attraverso l'impiego di farmaci o composti biologici "mitocondriotropici" allo scopo di modulare il metabolismo e il destino cellulare con una specifica farmacologia che ha il mitocondrio come *target* preferenziale.

Trasferibilità dei risultati

L'individuazione di sostanze mitocondriotropiche potrebbe consentire lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche in patologie con importante coinvolgimento mitocondriale come le malattie autoimmuni e degenerative.

Studi fitochimici di piante usate nella Medicina tradizionale naturale al fine di evidenziarne l'attività farmacologica

L'intento del progetto è di approfondire gli aspetti fitochimici e bio-farmacologici di piante usate nella medicina tradizionale e nella medicina naturale.

Il crescente interesse per la medicina naturale e il continuo sviluppo di metodologie per la scoperta di nuovi principi attivi hanno dato una forte spinta allo studio delle sostanze naturali con innumerevoli vantaggi nella farmacologia e nella terapia. Attualmente è molto sentita l'esigenza di ottenere dalle fonti naturali fitocomplessi o principi attivi da avviare ad una valutazione biologica il più ampia possibile.

La medicina tradizionale rappresenta un utile pre-screening per la selezione di piante da cui estrarre e identificare principi naturali che potrebbero risultare attivi, infatti le piante studiate sono selezionate sulla base di informazioni di etnomedicina grazie alla collaborazione con etnofarmacologi locali e di relazioni chemotassonomiche con altre specie vegetali già analizzate.

Gli estratti delle piante sono progressivamente separati in frazioni e se possibile fino all'isolamento delle sostanze pure che sono poi caratterizzate dal punto di vista strutturale con metodi chimici e spettroscopici. I fitocomplessi e le sostanze così isolate e identificate chimicamente sono avviati a una valutazione biologica *in vitro* e *in vivo* per l'attività antimalarica, antifungina, antitumorale, anti-HIV e cardiovascolare.

Le piante interessate in tale progetto sono: *Heliconia psittacorum*, *Eleutherine bulbosa*, *Dicraeopetalum capuronianum*, *Tabernaemontana kamassi*, *Capuronianthus mahafalensis*, *Vepris madagascariensis*, *Byttneria biloba*.

Risultati attesi nel triennio

Obiettivo primario del progetto è di studiare le piante dal punto fitochimico e biofarmacologico per confermare quell'attività già evidenziata nell'uso popolare.

Su due di queste piante già sono stati eseguiti alcuni studi fitochimici e i costituenti ottenuti sono stati avviati ai test biologici.

Le suddette piante sono:

- L'*Heliconia psittacorum*, spontanea in tutte le zone tropicali e subtropicali, in Africa rappresenta la terapia di elezione per i pazienti affetti da varie malattie e in particolare dall'AIDS.
- L'*Eleutherine bulbosa*, originaria del Centro America, in Congo è utilizzata come antidiarroico e per il trattamento di disturbi coronarici. Un suo primo studio fitochimico ha portato all'isolamento e identificazione chimica di undici polichetidi triciclici, di due nuovi naftopirani e un nuovo gentiobioside della diidroeuleuterina. Con il lavoro futuro si cercherà di attribuire l'attività antitumorale, antimicrobica e cardiovascolare ai vari componenti isolati.

Riguardo le rimanenti piante, oggetto del nostro prossimo studio, contenenti alcaloidi, tra le molecole naturali le più farmacologicamente attive, abbiamo informazioni di etnofarmacologi del Madagascar sul loro uso locale contro malattie endemiche del Paese come malaria, bilarziosi, schistosomiasi e altre gravi affezioni.

Anche per queste dopo la fase estrattiva, di frazionamento e isolamento dei componenti si ricercheranno le varie attività farmacologiche sottoponendoli a test biologici.

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, tendono alla valorizzazione di questo tipo di rimedio specialmente nei Paesi dove rappresenta il più importante e fondamentale sistema di cura a basso costo delle malattie delle popolazioni più povere. Da un'altra parte 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. EMA/HMPC/3626/2009.

Collaborazioni interne ISS: Gruppo TISNa

Collaborazioni esterne: Marcello Nicoletti, Sapienza Università di Roma

Philippe Rasoanaivo, *Institut Malgache de Recherches Appliquées* (IMRA), Antananarivo, Madagascar

Roberto Miccinilli, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo

Silvio Rossi, Erborista, Torino

Studi quali-quantitativi di sostanze naturali vegetali: identificazione e controllo di qualità delle droghe vegetali e loro preparati monocomponente

La qualità di un prodotto di origine vegetale ovvero di un prodotto a base di piante o loro derivati, 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 secondo specifiche riportate nella monografia n. 1433 della Farmacopea Europea su *Herbal drug* e nelle Linee Guida emanate dal Ministero della Salute sulla “Documentazione utile a supporto degli integratori alimentari con ingredienti erboristici” del 27 marzo 2006. L’identificazione scientifica e univoca della matrice organica vegetale costituisce il passo iniziale di qualsiasi utilizzazione e validazione delle “sostanze attive vegetali” ovvero le droghe vegetali ed è il primo passaggio che assicura l’assenza di sofisticazioni o adulterazioni. In particolare l’individuazione di quei metaboliti secondari della pianta biologicamente attivi, sia in senso terapeutico sia in senso salutistico, o di quei componenti chimici caratteristici della droga vegetale contribuisce ad una caratterizzazione completa della stessa perché è quella che permette di seguire il destino della materia prima vegetale nel prodotto finito e anche nel corso del tempo o delle condizioni di conservazione.

Scopo del progetto è quello di caratterizzare alcune droghe vegetali tramite studi cromatografici dei componenti chimici noti e non noti della pianta per trovare una sorta di impronta digitale o *fingerprint* identificativa della specie botanica allo studio.

L’autenticazione della specie botanica si avvarrà anche dei metodi di analisi della biologia molecolare per il suo riconoscimento genetico.

Collaboratori esterni: Paola Del Serrone, Ricercatore, Centro per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura (CRA), Monterotondo (RM).

Risultati attesi nel triennio

L’analisi cromatografica qualitativa e anche quantitativa come *fingerprint* viene effettuata con diverse metodiche cromatografiche tramite due procedure analitiche classiche: la cromatografia ad alta pressione, HPLC-DAD e/o HPLC-MS, che può dare una maggiore informazione sulla natura chimica dei componenti, e la cromatografia su strato sottile ad alta prestazione, HPTLC, con lettura densitometrica del cromatogramma sviluppato per la determinazione dei rapporti quantitativi dei componenti chimici individuati.

Lo studio dei profili cromatografici dei componenti chimici di una droga vegetale consente di individuare le caratteristiche chimiche del fitocomplesso derivato dalla pianta cui può essere attribuito l’effetto biologico sia terapeutico che salutistico.

La caratterizzazione del fitocomplesso così ottenuta permette l’individuazione di eventuali sofisticazioni o adulterazioni della droga vegetale in prodotti commerciali monocomponente anche se non sono noti i costituenti attivi o i markers della stessa.

Il *fingerprint* cromatografico può essere utile anche per seguire il destino della materia prima vegetale nel prodotto finito e/o nel corso del tempo o delle condizioni di conservazione.

L’identificazione molecolare della specie botanica allo studio si avvarrà all’occorrenza dell’applicazione delle tecniche di PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Trasferibilità dei risultati

Il progetto ha lo scopo di elaborare metodi di analisi rapidi e univoci per l’identificazione di una pianta come materia prima di prodotti commerciali monocomponente e l’individuazione di possibili sofisticazioni con altre piante o con sostanze chimiche aggiunte.

Un altro risultato trasferibile può venire dalla messa a punto di metodi di identificazione molecolare tramite PCR-RFLP, grazie alla collaborazione scientifica concordata recentemente con il Centro per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura di Monterotondo (*Molecular identification of Panax ginseng C.A.Meyer in ginseng commercial products, Natural Products Communications* 2006;1(12):1137-40).

Il progetto è in linea con le *WHO guidelines on safety monitoring of Herbal medicines in pharmacovigilance systems*, 2004, e le linee guida EMEA del 2008, *Guideline on quality of combination herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products* (EMA/HMPC/CHMP/CVMP/214869/2006) e *Reflection paper on markers used for quantitative and qualitative analysis of herbal medicinal products and traditional herbal*

medicinal products (EMA/HMPC/253629/2007) per il controllo della qualità dei prodotti a base di erbe.

Studi sperimentali e clinici sull'origine della cefalea: nuove strategie di diagnosi e di terapia

L'emicrania colpisce in Italia circa sei milioni di persone con maggiore incidenza nelle donne (rapporto F/M 3:1). È una complessa patologia neurologica caratterizzata da forte cefalea ricorrente con sintomi a carico del sistema vegetativo e sensoriale. Il dolore emicranico (intrattabile nel 25% dei casi) comporta ingenti costi sanitari, assieme all'insorgenza di psicopatologie (isolamento sociale, ansia, insonnia). L'emicrania ha origine eterogenea e multifattoriale e si sviluppa con meccanismi fisiopatologici ancora poco chiari. La cefalea propria insorge per attivazione di fibre sensoriali trigeminali che trasducono stimoli generati da molecole liberate dal tessuto meningeo in segnali algogeni inviati al cervello. Il dolore emicranico è tipicamente associato a grande ipersensibilità a vari stimoli sensoriali da cui viene esacerbato. Come in molti altri casi di dolore cronico, si instaura un processo di sensibilizzazione delle fibre sensoriali, la cui soglia di attivazione viene abbassata, come dimostrato da diversi studi, per cambiamenti molecolari nelle proteine di membrana neuronali ligandi di agenti algogeni. In questo processo meccanismi infiammatori sembrano giocare un ruolo rilevante, come dimostrato da analisi di metaboliti plasmatici specifiche effettuate all'inizio dell'attacco emicranico. La tipica ciclicità degli attacchi pone peraltro il quesito se esista una persistente modifica tissutale meningeale che faciliti l'insorgenza della cefalea.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto propone di studiare: i) i processi molecolari della sensibilizzazione neuronale prodotta da metaboliti infiammatori rilasciati durante l'emicrania; ii) individuare possibili strategie terapeutiche per normalizzare l'iperattività sensoriale. Per comprendere le cause della sensibilizzazione neuronale, sarà necessario rivelare le molecole implicate, i loro diversi effetti e tempi di azione sui neuroni trigeminali. A tale fine *biomarker* plasmatici identificati in pazienti cefalalgici saranno studiati per la loro attività sulla sensibilizzazione trigeminale in modelli animali *in vivo* e *in vitro*. Quale modello sperimentale saranno usati neuroni trigeminali di topo impiegando moderne tecnologie elettrofisiologiche e molecolari per analizzare le conseguenze di stimoli chimici tipici del dolore cronico/infiammatorio e per testare l'azione di farmaci mirati a bloccarne l'azione. L'uso di modelli comportamentali animali permetterà di validare i dati ottenuti *in vitro* e permetterà di valutare nuove entità chimiche potenzialmente utili a prevenire, bloccare o revertire la sensibilizzazione trigeminale.

Trasferibilità dei risultati

Dato il grande impatto sociale ed economico dell'emicrania, la migliore comprensione dei meccanismi del dolore emicranico può offrire immediata trasferibilità all'SSN fornendo nuovi dati per un più efficace management dei pazienti ed esitando in un notevole risparmio economico. Il progetto parte da un nuovo approccio multidisciplinare alla patogenesi della malattia e intende sviluppare un'innovativa diagnostica e terapia. Infatti, l'identificazione di *biomarker* clinici tipici di coorti di pazienti permetterà di implementare una medicina stratificata con standard diagnostici oggettivi e terapie mirate finora precluse a causa dell'eziopatologia multifattoriale dell'emicrania. L'impiego di modelli sperimentali permetterà di progettare e saggiare nuove entità chimiche potenzialmente attive nei confronti di specifici *target* coinvolti nella sensibilizzazione neuronale.

Studio degli effetti di una dieta arricchita con amminoacidi a catena ramificata (ACR) in un modello murino di sclerosi laterale amiotrofica (SLA): valutazione di parametri comportamentali, della funzionalità della trasmissione glutammatergica e dell'espressione genica

Questo progetto si propone di verificare l'ipotesi che l'assunzione di una dieta ricca in ACR possa influenzare il decorso clinico della SLA. Il principale obiettivo sarà quello di approfondire i risultati ottenuti nell'ambito di un precedente progetto, che hanno evidenziato una particolare suscettibilità dei topi G93A (modello murino di SLA familiare) alla dieta ACR. Anche gli altri parametri studiati nel precedente progetto (compromissione della trasmissione sinaptica corticale, ridotta espressione del trasportatore del glutammato GLT-1 e del recettore glutammatergico mGlu5) sono stati influenzati significativamente dalla dieta arricchita, e questo si verificava specificamente nei topi G93A. Infine, risultati ottenuti nei modelli cellulari hanno dimostrato un'alterazione significativa dei livelli di trascrizione di alcuni geni coinvolti nell'eziopatologia della SLA e più in generale nei processi neurodegenerativi in seguito al trattamento con ACR. Gli obiettivi specifici dell'unità operativa saranno quindi i seguenti: i) allestire una colonia di topi G93A presso l'ISS; ii) valutare gli eventuali effetti della dieta ACR sul tempo di comparsa del fenotipo e sulla sopravvivenza degli animali; iii) esaminare parametri metabolici (metabolismo glucidico) per valutare gli effetti di attivazione motoria riscontrati nella dieta; iv) verificare la funzionalità della trasmissione glutammatergica (elettrofisiologia, espressione del trasportatore e del recettore mGlu5) ad età più precoci, ovvero nella fase presintomatica, cercando di evidenziare alterazioni sottili della risposta alla eccitotossicità; v) valutare l'espressione quantitativa dei geni modulati dalla dieta, mediante l'uso di *array* specifici per lo studio dei geni coinvolti nei processi metabolici che regolano l'attività ossido/riduttiva delle cellule. Tale analisi permetterà di verificare se, anche nel modello animale, la somministrazione di ACR può alterare la normale espressione genica in modo coerente con un possibile effetto pro-degenerativo; vi) ampliare la batteria di test per la valutazione comportamentale al fine di chiarire se il peggioramento della coordinazione motoria e gli aspetti di iperattività riscontrati nei topi G93A trattati con dieta ACR siano da attribuire ad ipercinesia e ipermotilità o se essi corrispondano ad una più generale disinibizione del comportamento associata per esempio alle alterazioni della trasmissione glutammatergica.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto consentirà di stabilire se una dieta ricca in ACR influenza la comparsa del fenotipo e la sopravvivenza in un modello transgenico murino di SLA. Inoltre la valutazione dell'espressione dei geni modulati dalla dieta permetterà di verificare se, anche nel modello animale, la somministrazione di ACR può alterare la normale espressione genica in modo coerente con un possibile effetto pro-degenerativo.

Trasferibilità dei risultati

Questo progetto potrebbe contribuire al chiarimento dei fattori di rischio "ambientali" che sono responsabili dell'aumentata incidenza della SLA nel mondo del calcio.

Studio del ruolo neuroprotettivo della timosina beta4 in modelli sperimentali in vivo e in vitro di eccitotossicità, ischemia e Alzheimer's Disease

La timosina beta4 è una proteina in grado di legare e sequestrare i monomeri di actina ed è espressa in un vasto numero di tessuti dei vertebrati, tra cui il sistema nervoso durante lo sviluppo e dopo la maturazione. Si pensa che mediante la sua azione di legame all'actina monomeric, la timosina beta4 svolga un ruolo importante nello sviluppo e nella estensione del cono di crescita dei neuriti. Nel cervello di ratto, in condizioni fisiologiche, il gene della timosina beta4 è espresso in cellule gliali, nelle cellule piramidali delle regioni CA1-CA2

dell'ippocampo, nella neocorteccia e nell'amigdala. È anche ampiamente espressa nel cervelletto sia durante lo sviluppo che dopo la maturazione. Alcune evidenze sperimentali suggeriscono che la timosina $\beta 4$ potrebbe possedere una franca attività neuroprotettiva in particolari condizioni neuropatologiche. È noto infatti che, in seguito ad ischemia focale, la timosina $\beta 4$ è sovraespressa nell'area cerebrale infartuata, suggerendo un possibile coinvolgimento della proteina nel recupero dei circuiti neuronali dopo il danno indotto da ischemia. Inoltre, dati ottenuti dal nostro gruppo indicano che la timosina $\beta 4$ è in grado di indurre neuroprotezione nei confronti della tossicità indotta da glutammato in cellule nervose.

Obiettivo del presente progetto di ricerca è quello di verificare l'azione neuroprotettiva della timosina $\beta 4$ in diversi modelli sperimentali in vitro di eccitotossicità, ischemia e *Alzheimer's Disease* (AD).

Risultati attesi nel triennio

Verifica dell'azione neuroprotettiva della timosina in diversi modelli sperimentali di neurodegenerazione.

Messa a punto di modelli caratterizzati da sovraespressione del peptide nel sistema nervoso di roditore.

Trasferibilità dei risultati

Ciascuna delle metodologie utilizzate è ampiamente validata dalla letteratura scientifica internazionale, e nell'ambito del gruppo proponente sono rappresentate tutte le competenze e sono presenti tutte le principali attrezzature necessarie allo svolgimento del progetto. Sulla base di tali elementi, si ritiene che lo studio abbia ottime possibilità di fornire un apporto conoscitivo rilevante sul ruolo della timosina $\beta 4$ nella modulazione dei fenomeni neurodegenerativi. Qualora si dimostrasse un chiaro effetto della timosina nei diversi modelli sperimentali, i risultati del progetto potrebbero costituire la base di partenza per lo sviluppo di strategie terapeutiche neuroprotettive. Considerando la sostanziale sovrapposibilità dei meccanismi patogenetici coinvolti nelle diverse patologie neurodegenerative, tali strategie potrebbero essere applicabili ad un vasto numero di malattie. L'innovatività dell'approccio, basato sullo "sfruttamento" di un peptide endogeno, e non sull'inibizione diretta della trasmissione glutammatergica (strategia gravata da una ben nota serie di effetti indesiderati) accresce ulteriormente le potenzialità dello studio.

Studio dell'espressione e delle funzioni dei recettori A2A dell'adenosina in un modello murino di distonia

La distonia è una sindrome neurologica rara. Le distonie primarie dell'adulto riconoscono una base genetica legata alla mutazione del gene DYT1 che codifica per la proteina TorsinA; la mutazione di tale proteina è responsabile della maggior parte dei casi di distonia generalizzata ad esordio infanto-giovanile. La trasmissione è autosomica, dominante e si presenta a penetranza incompleta (30-40%).

Fenotipicamente la distonia primaria DYT 1 è caratterizzata dalla presenza di movimenti anomali, protratti o rallentati, che si manifestano nell'infanzia in un arto per poi estendersi rapidamente, (in meno di cinque anni), alle altre parti del corpo e arrivare ad una distonia generalizzata. Da un punto di vista fisiopatologico, la distonia rientra nei disturbi del movimento legati all'alterazione funzionale dei circuiti cortico-striato-talamo-corticali. In considerazione del ruolo centrale che lo striato gioca all'interno dei gangli della base nella regolazione dell'attività motoria, è ipotizzabile che alterazioni a carico di tale struttura possano essere coinvolte nella patogenesi della distonia.

Nel modello murino della patologia gli animali esprimono la proteina umana mutata (hMT). Nonostante tali animali non presentino evidenti comportamenti distonici, mostrano tuttavia

alterazioni motorie riscontrabili con l'utilizzo di specifici test comportamentali. In particolare sono state riscontrate iperattività, movimenti rotatori ripetuti, deficit della coordinazione e dell'apprendimento motorio. Nel sistema nigrostriatale dei topi transgenici DYT1 i livelli dei metaboliti della dopamina risultano ridotti, confermando che nella distonia esiste un'alterazione del neurotrasmissione dopaminergica, generalmente associata ai disturbi del movimento.

Poichè a livello striatale il *signaling* dopaminergico è modulato dall'adenosina, scopo principale di questa linea di ricerca sarà quello di valutare se un alterato rapporto fra il sistema dopaminergico e quello dell'adenosina possa essere coinvolto nella patogenesi delle distonie primarie.

Risultati attesi nel triennio

Saranno eseguiti esperimenti di *binding* recettoriale allo scopo di verificare se l'affinità di legame e il numero dei recettori della dopamina D2 e A2a dell'adenosina, un sottotipo recettoriale coinvolto nella modulazione della funzione dopaminergica striatale e che co-localizza con il recettore D2 nei neuroni striatopallidali, siano modificato nello striato di topi DYT1.

In questo modello animale di distonia, a differenti stadi della malattia, sarà poi analizzato il comportamento motorio in seguito a blocco o stimolazione farmacologica del recettore A2a dell'adenosina.

Trasferibilità dei risultati

I risultati della ricerca in oggetto potranno avere sia una trasferibilità dal punto di vista conoscitivo che una diretta ricaduta clinica delle informazioni ottenute attraverso l'identificazione di nuovi *target* terapeutici, in considerazione del fatto che antagonisti dei recettori A2a sono già utilizzati nell'uomo in studi clinici di fase II.

Studio dell'immunità mucosale nell'infezione da HIV

L'obiettivo di questo studio è valutare l'ipotesi che negli eventi che portano al 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 patogena nell'uomo da quella non patogena 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 sistemiche 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 dell'impatto farmaco-tossicologico degli effetti anticolinesterasici indotti dall'esposizione a xenobiotici naturali e di sintesi (pesticidi, micotossine, prodotti medicinali di sintesi e di origine vegetale)

Nel contesto della caratterizzazione degli effetti anticolinesterasici di xeno biotici, sia essi naturali sia essi di sintesi, si intende approfondire alcuni degli aspetti peculiari di impatto farmaco-terapeutico e tossicologico strettamente legati all'inibizione dell'enzima chiave del catabolismo dell'acetilcolina. In particolare, in riferimento alle modalità di studio dell'interazione con le isoforme molecolari specifiche dell'enzima è possibile al momento distinguere più selettivamente fra gli inibitori dell'attività dell'Acetilcolinesterasi (particolarmente quella cerebrale) quelli di ricaduta puramente tossicologica da quelli sfruttabili dal punto di vista terapeutico.

Più specificatamente la diversa distribuzione delle suddette forme molecolari con una variazione del loro rapporto, è stata osservata in alcune condizioni fisiologiche (legate alla crescita dell'individuo) e patologiche (nel liquido amniotico di feti con difetti del tubo neuronale e in pazienti affetti da Alzheimer e Parkinson). L'analisi dei parametri cinetici e del meccanismo d'inibizione enzimatica rappresenta un approccio metodologico fondamentale dello studio che verrà sostanzialmente effettuato durante tutte le varie fasi dello sviluppo, al fine d'individuare molecole ed analoghi strutturali con potenziale terapeutico o responsabili di eventi avversi di natura colinergica sia a breve sia a lungo termine.

Risultati attesi nel triennio

- Studio degli aspetti farmaco/tossicologici in relazione all'effetto di xenobiotici sull'attività delle differenti forme molecolari dell'acetilcolinesterasi.
- Studio *in vitro* e *in vivo* degli effetti anticolinesterasici nelle varie fasi dello sviluppo.
- Analisi delle cinetiche di inibizione enzimatica e dei meccanismi d'azione.
- Individuazione di sostanze di sintesi (farmaci e pesticidi) e naturali (metaboliti secondari estratti da piante e micotossine) a potenziale attività anticolinesterasica.

In particolare le strategie e i modelli sperimentali, in parte acquisiti in studi già effettuati (Cometa, *et al. Toxicology* 2005;206:125-35; Ricceri, *et al. Toxicological Sciences* 2006;93:105-13; Cometa, *et al. Toxicology* 2007;234:90-102), saranno applicati:

- allo studio degli alcaloidi bis-benzilisoquinolinici isolati dalla specie sudamericana *Abuta grandifolia* le cui evidenze, di ordine etnobotanico, mettono in luce la possibilità di trovare un razionale scientifico all'impiego tradizionale di tale pianta anche nelle patologie associabili ad un'evidente carenza delle funzionalità colinergiche;
- all'approfondimento degli aspetti relativi alla tossicità colinergica in seguito all'esposizione a micotossine (Aflatossina B1) e pesticidi (Clorpirifos), xenobiotici di cui si è già evidenziato l'effetto anticolinesterasico su specifiche isoforme molecolari dell'enzima (G1 e G4) e la cui inibizione differenziata nel piccolo riveste un ruolo critico per il corretto sviluppo della funzionalità dell'AChE in relazione sia agli aspetti colinergici e non colinergici.

Trasferibilità dei risultati

Le informazioni ottenute dagli studi relativi all'inibizione dell'attività di specifiche isoforme molecolari dell'ACHé potranno fornire un utile supporto alla caratterizzazione del profilo farmaco-tossicologico degli xenobiotici testati. In particolare dagli studi di cinetica enzimatica sarà possibile dedurre informazioni su nuove classi molecolari.

Considerando la grande potenzialità derivante dallo studio di nuove molecole ad attività anticolinesterasica, il rinnovato interesse per lo studio di sostanze naturali di derivazione vegetale, la grande varietà ed ubiquitarità degli xenobiotici in esame e il loro impatto sulla tossicologia dello sviluppo, i risultati attesi contribuiranno a chiarire importanti dubbi relativi a problemi di salute pubblica conseguenti all'esposizione volontaria a scopo terapeutico (prodotti medicinali sia di sintesi sia naturali) o involontaria (pesticidi e micotossine).

Studio delle caratteristiche biofarmaceutiche e tecnologiche del principio attivo e del prodotto finito nella definizione della qualità e dell'effettiva similarità del medicinale equivalente rispetto all'originatore

Scopo del progetto è lo studio delle caratteristiche biofarmaceutiche e tecnologiche del principio attivo e del prodotto finito che determinano la qualità e la similarità dei medicinali equivalenti rispetto agli originatori.

Il medicinale equivalente, secondo la normativa vigente, ha medesima composizione qualitativa di principio attivo ed equivalente forma farmaceutica del prodotto originatore di riferimento e deve essere ad esso bioequivalente, secondo criteri definiti.

La valutazione della bioequivalenza tra un generico e il prodotto innovatore di riferimento è indispensabile ai fini dell'equivalenza terapeutica. Tuttavia la conoscenza delle caratteristiche del principio attivo che possono avere un impatto sulla qualità e l'equivalenza farmaceutica sono fondamentali nella valutazione delle diverse formulazioni. Infatti le proprietà di stato solido del principio attivo possono influenzare la stabilità, la solubilità, la velocità di dissoluzione, e quindi, la biodisponibilità del prodotto finito. Il loro studio riveste particolare importanza per quei principi attivi di largo e consolidato uso terapeutico utilizzati in forme farmaceutiche solide. Inoltre non è trascurabile il ruolo di alcuni eccipienti nel promuovere transizioni di fase e nell'influenzare la stabilità fisica del principio attivo durante il processo di produzione e di conservazione del prodotto finito.

Alcuni metodi *in vitro*, e in particolare il test di dissoluzione, sono considerati potenziali modelli per predire il comportamento *in vivo* di un medicinale. Il principio attivo in una forma farmaceutica deve essere rilasciato e successivamente dissolversi nei fluidi biologici per divenire disponibile nel sito d'azione. Di conseguenza, la velocità di dissoluzione è uno dei fattori che possono evidenziare le differenze tra medicinali contenenti lo stesso principio attivo, somministrati nella stessa forma farmaceutica e allo stesso dosaggio.

Collaboratori esterni: F. Alhaique (Professore Ordinario) Sapienza Università di Roma.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si propone la realizzazione di strategie analitiche, in particolare sviluppare metodi di dissoluzione atti a discriminare fra formulazioni uguali o simili.

In una prima fase di attuazione del progetto si effettueranno studi di dissoluzione *in vitro* su medicinali a base di principi attivi per i quali la dissoluzione rappresenti il fattore limitante o una non equivalenza terapeutica rispetto all'innovatore potrebbe presentare maggiori rischi per la salute, sulla base delle caratteristiche chimico-fisiche del principio attivo e della forma farmaceutica. L'attenzione sarà rivolta a studi di dissoluzione su compresse a rilascio modificato a base di farmaci di largo uso o che siano appena stati introdotti sul mercato attraverso una procedura di mutuo riconoscimento o decentrata, allo scopo di evidenziare

possibili differenze di velocità di rilascio in vitro tra le varie formulazioni reperibili sul mercato nazionale.

In una seconda fase l'esperienza acquisita verrà utilizzata per studiare casi più complessi, medicinali che contengono principi attivi a basso indice terapeutico e sono commercializzati in forme farmaceutiche non convenzionali (es. farmaci cardioattivi in forme farmaceutiche a rilascio modificato). Eventuali differenze potrebbero riflettersi in una diversa biodisponibilità *in vivo* e quindi una diversa sicurezza ed efficacia.

Nel caso in cui si riscontrassero tali differenze si procederà alla verifica della effettiva similarità generico/innovatore.

Si procederà inoltre alla raccolta sistematica di dati sperimentali relativi a eccipienti di diversa provenienza comunemente utilizzati in forme farmaceutiche solide orali.

I risultati ottenuti saranno oggetto di pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali e rapporti tecnici.

Trasferibilità dei risultati

Dai dati Osmed 2008 il mercato dei medicinali equivalenti in Italia è in espansione ed essi attualmente rappresentano oltre il 30% delle prescrizioni (farmaci *branded*).

Le tematiche relative alla qualità, sicurezza ed efficacia dei farmaci equivalenti sono un problema emergente di salute pubblica.

A livello nazionale il progetto si propone di migliorare la qualità dei controlli effettuati sui farmaci equivalenti attraverso lo sviluppo di metodi innovativi e la creazione di una banca dati sugli eccipienti utilizzati nelle forme farmaceutiche solide orali. Inoltre intende favorire il contenimento reale della spesa sanitaria, aumentando la fiducia del cittadino nel medicinale generico/equivalente.

A livello europeo il progetto si propone di contribuire con il *know how* acquisito al dibattito internazionale sia in ambito scientifico che regolatorio su potenzialità e limiti del test di dissoluzione come strumento predittivo dell'equivalenza di medicinali, anche nella fase di sviluppo di nuovi farmaci (diverse formulazioni, diversa tecnologia di produzione, diversa strumentazione). In tale ambito il gruppo di ricerca parteciperà attivamente in collaborazione con l'Autorità Regolatoria alla revisione delle attuali linee guida inerenti l'argomento.

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 le terapie vengono assegnate secondo indicazione del medico clinico curante in un ambito di pratica clinica corrente. La coorte è aperta all'arruolamento per un minimo di tre anni. Sono arruolabili pazienti HIV già trattati con farmaci appartenenti alle tre classi principali (IP, NRTI, NNRTI), che iniziano una terapia con inibitori della fusione, inibitori dell'integrasi, antagonisti del co-recettore CCR5. La tempistica seguita è la stessa dei normali controlli clinici previsti nella pratica corrente. La raccolta dei dati prevede l'inserimento da parte dei centri clinici via web dei comuni dati clinici e di laboratorio e la compilazione durante le normali visite di controllo di questionari per la valutazione della qualità della vita (ISSQoL, EUROQoL, ABCD) che hanno lo scopo di ottenere informazioni sulla malattia e sui trattamenti centrate sulla valutazione del paziente. Le principali misure di esito sono sopravvivenza; progressione clinica della malattia; risposta immunologica (CD4) e virologica (HIV-RNA); tossicità limitante il trattamento; tossicità a lungo termine; qualità della vita; costi diretti; anni di vita aggiustati per la qualità della vita (QALY). Sono previste analisi di farmacocinetica e virologia.

Risultati attesi nel triennio

- 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 farmacoeconomiche 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 sarà caratterizzata da pazienti in condizioni più avanzate, con maggiore frequenza di terapie concomitanti multiple e condizioni cliniche importanti. Saranno 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, farmacoeconomia). 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 fase II/*proof of concept* sequenziale dose-risposta per valutare l’efficacia e la tossicità di un alcaloide vegetale in associazione a topotecan e doxorubicina nei gliomi e nel neuroblastoma refrattari metastatici pediatrici

Studio di fase I-II su tumori solidi (gliomi, neuroblastoma) per traslare i risultati ottenuti da alcuni gruppi di ricercatori dell’ISS: studi *in vitro* sull’uso di sostanze naturali estratte da piante sono promettenti ed è ragionevole intraprendere studi clinici. Per ridurre il numero di bambini da arruolare e il loro tempo di esposizione ai farmaci in studio sarà condotto un *trial* di tipo sequenziale per valutare la risposta di tumori recidivanti alla terapia con topotecan e doxorubicina. Nei casi in cui insorga farmaco resistenza, presenza di p glicoproteina sulla membrana cellulare, si somministrerà un alcaloide vegetale in grado, *in vitro*, di inattivare la p glicoproteina. L’outcome primario sarà il tasso di risposta completa o parziale dopo 2-4 cicli di Alcaloide + Topotecan + Doxorubicina vs. placebo + Topotecan + Doxorubicina in bambini con

neoplasia recidivante o in fase espansiva per mancata risposta alla chemioterapia di prima linea. L'end point primario sarà rappresentato dal tasso di sopravvivenza. Si valuterà il profilo di tossicità e il tasso di risposta dose-effetto dopo 2-4 cicli di alcaloide + Topotecan + Doxorubicina.

Partecipanti:

Reparto di ricerca clinica e farmacologia sperimentale, Dipartimento del Farmaco.

Metodi ultrastrutturali per terapie innovative antitumorali, ISS.

Divisione di oncologia pediatrica, IRCCS G. Gaslini, Genova: O. Della Casa Alberighi, A. Garaventa.

Risultati attesi nel triennio

Identificazione di un nuovo principio attivo, di origine vegetale, in grado di bloccare il meccanismo di farmacoresistenza delle cellule tumorali. Migliore conoscenza del meccanismo con cui la cellula neoplastica è in grado di neutralizzare l'azione dei farmaci oncologici. Questo permetterà di continuare ad usare con successo i farmaci attualmente utilizzati in oncologia clinica pediatrica.

Trasferibilità dei risultati

I risultati dello studio, se positivi, potranno essere utilizzati per condurre studi di fase III utilizzabili per la registrazione di nuovi principi attivi. L'ISS, proprietario dei dati, potrebbe brevettare il principio attivo. Inoltre, sulla base dei dati ottenuti sarà possibile elaborare nuovi protocolli terapeutici. I risultati ottenuti con questo studio pediatrico potranno essere estesi anche alla popolazione adulta come previsto dalla normativa EMEA e da quella della FDA.

STUDIO SMAC (Safe Milk for African Children). Uno studio clinico per la valutazione della sicurezza e della farmacocinetica di una terapia HAART somministrata alle donne HIV-positive nel corso dell'allattamento in Malawi

La trasmissione del virus HIV dalla madre al bambino attraverso l'allattamento materno rappresenta un importante problema di sanità pubblica nei paesi con risorse limitate. Una delle strategie preventive in corso di valutazione è rappresentata dalla somministrazione di una terapia antiretrovirale potente (HAART) durante la gravidanza e successivamente nel corso dell'allattamento con l'obiettivo di ridurre la carica virale nel latte materno. È importante valutare sia l'efficacia della strategia in termini di tassi di trasmissione sia la sua sicurezza a lungo termine nelle madri e nei bambini.

Lo studio SMAC prevede l'arruolamento di 200 donne HIV-positive in gravidanza seguite in due centri clinici in Malawi nell'ambito del programma DREAM della Comunità di S. Egidio. Le donne arruolate riceveranno dalla 25^o settimana di età gestazionale una combinazione antiretrovirale con zidovudina, lamivudina e nevirapina fino al parto. Dopo il parto tutte le donne continueranno la terapia HAART per la durata dell'allattamento fino a sei mesi. Le donne che incontrano i criteri per il trattamento secondo le Linee guida della WHO continueranno la terapia dopo l'allattamento fino alla fine dello studio. Le coppie madri/bambini verranno seguite per due anni dopo il parto.

Risultati attesi nel triennio

- Determinare le concentrazioni degli antiretrovirali nel plasma e nel latte delle donne trattate e nel plasma dei bambini allattati ai diversi tempi di follow-up.
- Determinare i livelli di HIV-RNA e HIV-DNA nel latte delle donne trattate ai diversi tempi del follow-up e correlarli con le concentrazioni degli antiretrovirali.
- Determinare la sicurezza di questo approccio nelle donne e nei bambini fino a due anni dopo il parto.
- Misurare i tassi di trasmissione in utero, *intrapartum* e *postpartum*.

- Determinare la possibile emergenza di virus resistenti nel plasma e nel latte delle donne trattate e in quelle che sospendono la terapia sei mesi dopo il parto.
- Valutare la presenza di co-infezioni con virus epatitici nelle donne arruolate e il ruolo della co-infezione sulla tossicità epatica in corso di trattamento.
- Mettere a punto delle metodiche semplificate che permettano la diagnosi di HIV nel bambino e il monitoraggio virologico nelle madri utilizzando i *dried blood spot*.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questo studio potranno contribuire a ridefinire le linee guida per l'allattamento delle donne HIV-positive nei Paesi con risorse limitate.

Le attuali linee guida della WHO (2006) raccomandano l'allattamento artificiale solo quando viene considerato fattibile, sostenibile, sicuro e accettabile, condizioni che si verificano solo in una percentuale molto limitata di donne in quei contesti.

Se lo studio dimostrerà che la somministrazione di una terapia HAART durante l'allattamento è sicura ed è associata a ridotti tassi di trasmissione questa strategia potrà rappresentare una possibile alternativa per le donne nei Paesi con risorse limitate. In questa ottica la diminuita morbilità e mortalità associata all'allattamento materno in quei contesti sarà un elemento fondamentale di supporto all'implementazione.

Sviluppo di metodologie chimiche e microbiologiche per la verifica della qualità e sicurezza dei prodotti cosmetici

Gli scopi della ricerca possono essere così sintetizzati:

- Studio di procedure chimico-analitiche standardizzate per la rilevazione di contaminanti chimici e sostanze proibite o limitate.
- Determinazione del contenuto di alcune specie microbiche in vista di una loro utilizzazione come *marker* igienici.
- Determinazione del contenuto microbico dei prodotti cosmetici alla produzione e distribuzione.

Per quanto concerne l'aspetto chimico-analitico, si ritiene di dover proseguire l'attività intrapresa nel precedente progetto triennale, anche sulla base delle recenti situazioni ad elevato rischio sanitario riscontrate nel mercato europeo. La normativa attuale (Direttiva 76/768CEE e il relativo recepimento nazionale, Legge 713/86) implementata mediante l'approvazione delle recenti modifiche della Commissione CE, prevedono per l'ISS, unitamente al Ministero della Salute, (art. 6, comma 1 della Legge 713/86) un ruolo centrale e fondamentale nell'elaborazione di metodi analitici per il controllo della conformità chimica e microbiologica dei prodotti cosmetici. Appare chiaro quindi che uno dei compiti istituzionali sia quello di studiare tecniche analitiche idonee alla verifica dei disposti normativi che, mediante una serie di Allegati tecnici, individuano sostanze proibite (Allegato II con circa 1.400 voci) e quelle sottoposte a vincoli formulativi e/o quantitativi (Allegati III, IV e V, circa 700 sostanze, articolate tra conservanti, filtri solari, coloranti, fragranze e coloranti di ossidazione).

Si rammenta l'importanza dello studio delle sostanze dell'Allegato II che, pur non essendo tra quelle per le quali è prevista la preparazione di metodi ufficiali, in quanto non comprese tra gli ingredienti utilizzabili da parte dell'industria cosmetica, presentano un fattore di rischio legato al loro potenziale impiego.

Risultati attesi nel triennio

Gli scopi della ricerca chimico-analitica si possono riassumere nella preparazione di metodi analitici quali-quantitativi per le sostanze coloranti, antisolari e preservanti, riportate nelle recenti modifiche della Direttiva 76/768CEE. Saranno anche portate a termine revisioni di metodi ufficiali obsoleti per coloranti, filtri solari e preservanti.

Gli scopi della ricerca microbiologica possono essere sintetizzati nella preparazione di procedure utili per la valutazione della carica batterica in formulati e materie prime ai fini di garantire la sicurezza di tale classe merceologica.

Trasferibilità dei risultati

La trasferibilità dei risultati prodotti si estrinsecherà nella preparazione dei metodi analitici ufficiali della Commissione Europea e nelle loro relative trasposizioni nazionali, nonché nella pubblicazione di lavori scientifici su riviste internazionali e di Guide all'analisi necessarie per i Laboratori Regionali periferici.

Sviluppo di un nuovo saggio fenotipico per la valutazione delle resistenze agli inibitori dell'integrasi di HIV-1

L'insorgere di resistenze virali, come causa di fallimento terapeutico, è essenziale nel monitoraggio clinico della terapia antiretrovirale. Ad oggi, non esistono saggi fenotipici che misurano le resistenze agli inibitori dell'integrasi. Lo scopo di questo progetto è quindi quello di utilizzare un saggio sviluppato dal nostro gruppo per la valutazione fenotipica delle mutazioni presenti nel gene integrasi di HIV-1 dei pazienti sottoposti a terapia con i farmaci anti-integrasi. Il test viene effettuato utilizzando oligonucleotidi appositamente disegnati e specifici per l'amplificazione di tutta la sequenza del gene integrasi che viene sequenziata e clonata in vettori lentivirali basati su HIV-1. In questo modo è possibile individuare sia le eventuali mutazioni delle sequenze che il loro impatto su IC50 e IC90 del farmaco. Il saggio fenotipico utilizza cellule di linea 293 infettate con i vettori lentivirali basati su HIV-1 ed esprimenti il *gene reporter* luciferasi. I vettori vengono costruiti utilizzando tre tipi di IN: i) la integrasi *wild-type*, ii) la integrasi difettiva contenente una mutazione (D116N) che ne abolisce completamente la funzione e che viene utilizzata come virus di riferimento per il *background* di produzione di luciferasi in completa assenza di integrazione e iii) le integrasi mutate derivate dai cloni molecolari dei pazienti su cui si vuole effettuare l'analisi.

Risultati attesi nel triennio

Il saggio descritto in precedenza ci consentirà di valutare, utilizzando cellule di coltura primarie, l'efficacia di farmaci anti-integrasi nei confronti delle integrasi derivate dai pazienti sotto trattamento farmacologico. Abbiamo scelto come bersaglio i macrofagi umani perché sono cellule normalmente infettate dall'HIV-1, e quindi un serbatoio di continua produzione virale, e perché ancora si conosce poco sugli effetti di questa nuova classe di farmaci su questo tipo cellulare. L'esperimento in questione verrà effettuato in triplicato su diversi donatori e ci consentirà di verificare la riproducibilità della metodologia e l'efficacia farmacologica in presenza di integrasi mutate derivate dai pazienti infetti. Inoltre sarà possibile verificare la funzionalità di nuovi farmaci anti-integrasi attivi sulle integrasi mutate dei pazienti.

Trasferibilità dei risultati

- L'utilizzo di vettori basati su HIV-1 prescinde dall'utilizzo di virus infettante. Il rischio biologico è quindi estremamente ridotto.
- L'impiego di un formato a micropiastra e della luciferasi come *gene reporter* permette una valutazione rapida, sensibile e quantitativa della suscettibilità agli antivirali.
- L'uso di una comune linea cellulare (293) permette una alta riproducibilità e standardizzazione.
- Dato che questi vettori mimano il ciclo vitale di HIV-1, inclusa la formazione del DNA non integrato circolare, l'utilizzo di vettori con integrasi mutata permetterà di valutare la resistenza fenotipica al farmaco in uso.

- Questi dati permetteranno di valutare l'impatto dell'insorgenza di mutazioni sulla patogenesi del virus fornendo un valido mezzo di predizione dell'efficacia di questi farmaci nel futuro uso clinico.

The Eastern and southern Africa Research Network for Evaluation of Second Line Therapy in HIV infection: The EARNEST trial

Il *trial* EARNEST 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. In quei contesti il mancato accesso al monitoraggio virologico fa sì che i pazienti vengano mantenuti in terapia di prima linea fino al fallimento clinico/immunologico piuttosto che ricevere un nuovo regime terapeutico al momento del fallimento virologico. La modifica terapeutica viene quindi effettuata relativamente tardi e quando è probabile che il virus sia diventato resistente alle classi di farmaci utilizzate in prima linea (inibitori nucleosidici e non-nucleosidici della trascrittasi inversa). Lo studio è un *trial* randomizzato con tre bracci che arruolerà 1.000 pazienti che falliscono (in base a criteri clinici e immunologici) la prima linea di terapia. I pazienti saranno arruolati nel periodo di un anno e randomizzati a:

- due inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa + un inibitore della proteasi (*Standard of care*);
- un inibitore della proteasi + un inibitore dell'integrasi (raltegravir);
- un inibitore della proteasi in ionoterapia.

I pazienti saranno seguiti per un minimo di 144 settimane. L'*endpoint* principale sarà rappresentato dalla proporzione dei pazienti nei vari bracci dello studio con risposta clinica e immunologica (definita dalla sopravvivenza senza eventi WHO stadio 4 nuovi o ricorrenti dal momento del cambio di terapia e con una conta di linfociti CD4 > 250 /mm³ a 144 settimane). Lo studio ha anche l'obiettivo di creare un network per la conduzione dei *trial* clinici tra i siti partecipanti (otto siti in quattro Paesi: Uganda, Malawi, Zimbabwe e Sudafrica).

Risultati attesi nel triennio

- Stabilire se la combinazione di un inibitore della proteasi + il raltegravir sia associata ad un outcome clinico e immunologico a lungo termine superiore rispetto allo *standard of care*.
- Stabilire se una monoterapia con un inibitore della proteasi sia associata ad un outcome clinico e immunologico a lungo termine paragonabile allo *standard of care*.
- Far sì che l'evidenza ottenuta con il *trial* sia largamente disseminata e determini (in relazione ai risultati) una modifica delle politiche sanitarie.
- Aumentare la capacità di condurre i *trial* clinici in nuovi centri clinici e istruire nuove generazioni di giovani ricercatori che possano in futuro condurre i *trial* clinici.
- Costruire un gruppo di siti di ricerca ben funzionante che diventi riconoscibile a livello internazionale come un network di eccellenza per valutare la terapia di seconda linea.
- Estendere il network oltre le collaborazioni stabilite a nuovi istituti e centri clinici.

Trasferibilità dei risultati

La conduzione di studi strategici sulla seconda linea di terapia con un approccio di sanità pubblica è una grande priorità della ricerca nei Paesi in via di sviluppo. Studi che valutino un approccio semplificato sono particolarmente rilevanti e al momento non c'è una grossa mole di dati sulla strategia di trattamento ottimale per la seconda linea per i pazienti nei Paesi con risorse limitate.

Le attuali linee guida della WHO raccomandano un regime basato su un inibitore della proteasi ma la validità di aggiungere un inibitore della trascrittasi inversa è più controversa e

non ci sono studi che abbiano comparato questa strategia con l'uso di una nuova classe di farmaci, gli inibitori dell'integrasi.

La disponibilità di dati da studi randomizzati come il *trial* EARNEST potrà inoltre indurre le industrie farmaceutiche a produrre co-formulazioni o combinazioni di dosi fisse di farmaci che semplifichino i regimi di seconda linea e permettano l'accesso al trattamento a un numero maggiore di persone.

Tossine batteriche ricombinanti come farmaci innovativi mirati alla terapia di patologie neurodegenerative

Difetti in processi cellulari Rho GTPasi-dipendenti sono alla base di diverse patologie umane, incluse alcune a carico del sistema nervoso.

Abbiamo mostrato che la proteina CNF1 di *E. coli*, che attiva le Rho GTPasi, induce un arricchimento dell'albero dendritico nei neuroni, accompagnato da un significativo aumento delle capacità cognitive in animali da esperimento (*PNAS*, USA 2007). Su tali premesse, abbiamo avviato i seguenti progetti:

- meccanismi molecolari e plasticità sinaptica indotta dal CNF1 in colture primarie di ratto (collaboratori: Dipartimento BCN, ISS);
- nuove terapie in modelli sperimentali della sindrome di Rett (collaboratori: Dipartimento BCN, ISS; Università dell'Insubria, VA);
- nuove terapie in modelli sperimentali di Alzheimer (collaboratori: Lab. Psicobiologia, Fondazione "Santa Lucia", Roma);
- analgesia del dolore pro-infiammatorio (collaboratori: CNR, Roma);
- sviluppo di nuove terapie in modelli sperimentali della sindrome di X-fragile (collaboratori: CNRS, Nizza);
- recupero della plasticità nella corteccia visiva adulta in modelli sperimentali (collaboratori: CNR, Pisa).

Nostro obiettivo sarà anche la realizzazione di "farmaci innovativi", tossine batteriche ricombinanti comprendenti la sola porzione enzimatica della tossina unita a dei *carrier* (ad esempio, nano-vettori) che ne permettano l'ingresso nella cellula eucariotica.

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,
- sul processo di apoptosi e i meccanismi che lo sottointendono,
- sulla formazione di sinapsi e sul *signalling* intracellulare.

Dagli studi condotti su animali da esperimento ci attendiamo i seguenti risultati:

- possibilità di impiegare il CNF1, già da noi descritto come agente capace di modulare il differenziamento cellulare (*Cell Death Diff* 2005), per recuperare la plasticità nella corteccia visiva di animali da esperimento adulti;
- possibilità di modulare l'espressione di recettori legati alla percezione del dolore, la cui funzionalità ed espressione è legata al citoscheletro e alle Rho GTPasi;
- possibile valutazione preclinica dell'efficacia del CNF1 nel contrastare almeno alcuni dei deficit dello spettro sindromico della sindrome di Rett. Data la estrema complessità del quadro clinico, anche un risultato parziale sarebbe estremamente importante. La sindrome di Rett è considerata paradigmatica per altri disordini del neurosviluppo, quindi l'evidenza di possibili effetti terapeutici basati sulla modulazione delle Rho GTPasi potrebbe essere estesa ad altre sindromi di ritardo mentale (es. sindrome dell'X-fragile).

Trasferibilità dei risultati

I risultati prodotti da questi studi potrebbero rivelarsi utili per proporre il CNF1 come farmaco “innovativo” data la sua specificità d’azione e la sua capacità di modulare le Rho GTPasi cerebrali.

Qualora la valutazione preclinica dell'efficacia del CNF1 nel contrastare almeno alcuni dei deficit comportamentali dovuti ad un alterazione del *pathway* delle Rho GTPasi desse risultati positivi, verranno generati frammenti attivi del CNF1 che siano possibilmente in grado di raggiungere il cervello in seguito a somministrazione periferica. Questo al fine di migliorare le possibilità terapeutiche del CNF1 e rendere possibile l’avvio del processo di esportazione all’uomo dei risultati raggiunti.

Utilizzo dei patient reported outcome come parametri di valutazione della salute e degli esiti di interventi sanitari nella ricerca e nella pratica clinica

I *patient reported outcome* (PRO), o esiti riferiti dal paziente, permettono di descrivere, misurare e valutare lo stato di salute del paziente attraverso la sua stessa percezione della propria condizione di salute, fornendo una maggiore attendibilità alla valutazione complessiva dello stato di benessere. La partecipazione attiva del paziente alle decisioni relative alla propria salute assume un ruolo sempre più significativo all’interno di un concetto molto più ampio di salute, fondato non solo su risultati clinici ma anche su valutazioni paziente-centrate, ponendo al centro della discussione il miglioramento della “qualità della cura della persona”. I PRO sono oggetto di discussione da decine di anni, durante i quali iniziative individuali o di piccoli gruppi, per quanto necessarie e significative, sono risultate in pratica poco incisive. È opinione condivisa che soltanto una rete di esperti in grado di unire esperienze, competenze e professionalità possa avere forza e credibilità sufficiente ad inserirsi nel dibattito della comunità scientifica e fornire un sostanziale contributo all’SSN. Tali considerazioni hanno condotto alla costituzione di un gruppo di lavoro multidisciplinare, denominato “PROmote” (*Patient-Reported Outcomes MOving Toward Evidence*), formato da diverse figure professionali esperte in PRO nei diversi settori della sanità.

Collaboratori esterni: figure professionali esperte in PRO nei diversi settori della sanità.

Risultati attesi nel triennio

Attraverso l’attività del gruppo di lavoro PROmote sarà possibile ottenere i seguenti risultati:

- formazione in materia di PRO attraverso Corsi di formazione;
- promozione di un impiego diffuso e appropriato di strumenti per la rilevazione PRO, sia nei *trial* clinici che nella pratica clinica;
- promozione di ricerche sui PRO e collaborazione a studi in ambito nazionale e internazionale.

Trasferibilità dei risultati

L’attività di ricerca e gli interventi di formazione sui PRO potranno fornire supporto alla rapida e continua evoluzione che, nel campo medico-sanitario, sta segnando il passaggio da una concezione unilaterale e limitativa della salute (basata esclusivamente sulla prospettiva del medico e su valutazioni strumentali) ad una medicina che tenga conto anche del punto di vista del paziente, delle sue aspettative e dei suoi reali bisogni. A tale proposito, appare prioritaria la necessità di promuovere e diffondere l’utilizzo abituale di strumenti di valutazione paziente-centrati. Il gruppo Promote si inserisce all’interno di un dibattito scientifico, ancora aperto, finalizzato a definire l’ambito di utilizzo degli strumenti PRO e le modalità per una loro corretta applicazione sia in campo sperimentale che nella pratica clinica.

Valutazione della qualità e sicurezza dei medicinali

Valutare qualità e sicurezza dei medicinali è uno degli obiettivi programmatici del Reparto e coinvolge tutti i ricercatori che vi afferiscono, che operano già da molti anni a supporto delle attività di autorizzazione alle sperimentazioni di fase I e di registrazione europea dei prodotti medicinali. Nell'ultimo decennio, l'accelerazione dei processi di sviluppo dei medicinali e la simultanea necessità di operare su mercati sempre più globali, hanno spinto il mondo farmaceutico verso un percorso di standardizzazione di alcune sue pratiche fondamentali, per cui lo sviluppo dei medicinali richiede attualmente l'applicazione di una metodologia internazionalmente codificata, aderente a norme e linee guida internazionali. Presupposto per poter formulare un rapporto di valutazione di standard internazionale è perciò la conoscenza di queste norme e linee guida, e non ultimo delle procedure di buona pratica (GMP, GLP, GCP) che ne regolano la produzione e la sperimentazione non clinica. La sempre maggiore integrazione europea anche nel campo dei medicinali e, d'altro lato, la tendenza da parte delle Regioni italiane ad assumere forti poteri decisionali in campo di assistenza farmaceutica sta creando una forte esigenza di personale qualificato che sia in grado di valutare le informazioni precliniche e cliniche sui farmaci, dai punti di vista più diversi.

La valutazione scientifica dei dati (*Scientific Based Drug Assessment*; SBDA) costituisce lo strumento per proteggere la salute pubblica sia durante la fase autorizzativa dello sviluppo di un prodotto medicinale, che per la sua registrazione.

Al momento non esiste una Struttura Valutativa Nazionale, che operi fornendo non solo valutazioni di standard europeo, ma anche formazione di valutatori e procedure di buona prassi in ambito valutativo.

Risultati attesi nel triennio

- Analisi degli Atti normativi mediante i quali formalizzare la creazione di un Programma Nazionale Formazione Valutatori (PNFV), attraverso una struttura che operi stabilmente all'interno del Dipartimento del Farmaco. Il PNFV dovrà fornire una formazione agli esperti interni all'ISS che intendono acquisire la professionalità come valutatori, e inoltre avere la possibilità di interagire direttamente con AIFA, Comitati Etici e con i Servizi Sanitari Regionali.
- Il DPR 439/2001 e i DL.vi 211/2003, 200/2007 hanno indicato l'ISS come l'Autorità Competente per l'autorizzazione di tutte le sperimentazione cliniche di fase I, da condursi sul territorio nazionale. Si rende di conseguenza necessario promuovere lo sviluppo di uno sportello informatico sul territorio nazionale (www.Info-Reg.gov.it), in collaborazione con il servizio informatico del Dipartimento. Tale sportello più interattivo dell'attuale sito web della fase I, sarà mirato a fornire supporto in relazione al contesto normativo, alle linee guida disponibili e alle procedure di preparazione dei dossier dei prodotti in investigazione (IMPD con sezioni dedicate per tipo di farmaco sia esso chimico, biologico, terapia avanzata, radiofarmaco ecc.) e alla loro presentazione e inserimento nelle banche dati specifiche (Osservatorio delle sperimentazioni cliniche) come da DM del 21 dicembre 2007.

Trasferibilità dei risultati

L'immissione di un farmaco sul mercato è un processo integrato in cui le tre componenti, qualità, sicurezza ed efficacia svolgono un ruolo complementare e indispensabile l'uno all'altra. L'analisi dei dossier di autorizzazione all'immissione in commercio per i farmaci per uso umano, rappresenta quindi un capitolo fondamentale per la loro registrazione e commercializzazione. Le valutazioni condotte sono volte a garantire attendibilità e, soprattutto, sistematicità di analisi per il rispetto della qualità e sicurezza del farmaco.

Gli strumenti operativi del presente progetto consentiranno di mantenere elevata e accrescere la capacità di SBDA dei singoli ricercatori permettendo loro di formulare rapporti valutativi di elevato standard internazionale.

Valutazione del potenziale immunogenico 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 (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 i 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 CTL antigene-specifici e utilizzate come cellule bersaglio. La capacità da parte delle proteina 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.

Valutazione dell'esposizione prenatale ad alcol, tabacco e sostanze d'abuso mediante l'analisi di biomarcatori in meconio neonatale

La più recente letteratura internazionale riferisce che molte difficoltà caratteriali e psicopatologie giovanili come ad esempio la sindrome di ipereccitabilità e deficit dell'attenzione (ADHD), potrebbero avere una base eziologica nell'esposizione prenatale a tabacco, alcol e droghe ed alla mancata diagnosi di questa esposizione durante l'infanzia.

In Italia non esistono informazioni certe sulla prevalenza di consumo di alcol, tabacco e sostanze d'abuso in gravidanza. Diversamente, la stima accurata dell'esposizione cronica fetale a sostanze tossiche, può fornire le basi per un appropriato trattamento e follow-up di neonati esposti ed evitare conseguenze psicocomportamentali nell'età giovanile.

Vari gruppi di ricerca, tra cui il nostro, hanno messo a punto metodi per l'analisi di droghe d'abuso nel meconio.

Il meconio accumula la maggior parte delle sostanze assorbite, metabolizzate ed escrete dal feto negli utili due trimestri di gestazione. In particolare con l'analisi del meconio, materiale di scarto la cui raccolta è totalmente non invasiva e non lesiva per il neonato e facile per il personale sanitario, lo studio si propone di individuare:

- la prevalenza dell'esposizione cronica fetale, conseguente al consumo materno in gravidanza, all'alcol, tabacco e a sostanze d'abuso;
- mettere a punto e validare nuove metodologie d'analisi specifiche e sensibili utili per la monitoraggio routinario ospedaliero dell'esposizione neonatale;
- correlare i risultati ottenuti con le variabili sociodemografiche materne e antropometriche e somatometriche del neonato e con osservazioni cliniche su quest'ultimo.

Risultati attesi nel triennio

L'applicazione delle metodiche messe a punto e validate nello studio pilota in una popolazione di coppie madri-neonato che sia rappresentativa di tutto il territorio nazionale (proveniente dalle diverse Regioni) permetterà di acquisire conoscenze sulla prevalenza del fenomeno del consumo materno di sostanze d'abuso durante la gravidanza e conseguente esposizione fetale a sostanze lecite (sigarette e alcol) e illecite (sostanze d'abuso). L'impiego di biomarcatori dell'esposizione fetale ad alcol, tabacco e sostanze d'abuso, opportunamente caratterizzati e validati, è un potente strumento per acquisire informazioni obiettive sull'entità di tale esposizione in Italia e prevenire, laddove possibile, i rischi di una mancata diagnosi precoce di tale esposizione.

Una diagnosi precoce delle sindromi da astinenza neonatale o del rischio di disturbi giovanili correlati all'esposizione prenatale a sostanze psicoattive permetterà la tempestiva scelta di cure appropriate verso i neonati e poi bambini potenzialmente a rischio; il follow-up durante tutta l'infanzia consentirà di valutare gli effetti a medio e lungo termine sulla salute giovanile e sullo sviluppo neurologico seguente.

Trasferibilità dei risultati

I risultati dello studio saranno oggetto di pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali, in modo da renderli accessibili alla comunità scientifica. Inoltre, dati del progetto, laddove particolarmente interessanti, potranno essere presentati a convegni nazionali e internazionali specifici.

A fronte delle informazioni ottenute dagli studi tossicologici e sperimentali l'obiettivo generale del progetto è quello di contribuire a nuove strategie di prevenzione promuovendo l'interazione fra ricerca e intervento sanitario.

Valutazione esterna di qualità sull'analisi delle sostanze d'abuso in matrice cheratinica: HAIRVEQ

Dall'anno 2002 il Reparto Farmacodipendenza, tossicodipendenza e doping del Dipartimento del Farmaco dell'ISS organizza e coordina una valutazione esterna di qualità sull'analisi delle sostanze d'abuso in matrice cheratinica (HAIRVEQ). La partecipazione ai programmi di HAIRVEQ è gratuita, volontaria e confidenziale.

Seguendo i dettami della Qualità applicata ai Laboratori di analisi cliniche, l'HAIRVEQ propone il modello del "miglioramento continuativo" attraverso un confronto diretto e costante con i Laboratori che aderiscono al Progetto, che si realizza attraverso iniziative quali: i) l'invio ai partecipanti di Procedure Analitiche Standard (o *Standard Operating Procedures*, SOP), ii) l'invio di campioni di capelli a concentrazione nota (campioni *open*) per verificare l'accuratezza dei dati prodotti, iii) l'invito ai Laboratori stessi ad allineare i loro *cut-off* con quelli utilizzati, a livello internazionale, dalla SOHT (*Society of Hair Testing*).

Il programma prevede due invii annuali, ciascuno di due campioni di capelli su cui identificare l'eventuale presenza di sostanze d'abuso e quantificare la concentrazione delle singole sostanze. Ad ogni laboratorio partecipante verrà poi inviato un *report* con l'elaborazione statistica dei risultati ottenuti da tutti i laboratori partecipanti. È stata inoltre prevista la stesura di una brochure informativa sull'attività dell'HAIRVEQ, con lo scopo di illustrare il programma di controllo di qualità, e l'invio della brochure a tutti i Laboratori pubblici o privati che effettuino analisi sulle sostanze d'abuso in qualunque matrice biologica.

Risultati attesi nel triennio

La stesura della brochure informativa sull'attività dell'HAIRVEQ e l'invio della brochure a tutti i Laboratori pubblici o privati che effettuino analisi sulle sostanze d'abuso, lascia sperare in un allargamento consistente dei partecipanti all'HAIRVEQ in modo tale che i risultati analitici ottenuti da tali Laboratori migliorino in sensibilità e accuratezza garantendo una sempre crescente affidabilità e omogeneità su tutto il territorio nazionale.

L'obiettivo più ambizioso che il progetto si prefigge di raggiungere al termine del triennio di applicazione, è che tutti i partecipanti al controllo di qualità uniformino metodiche e risultati relativi all'analisi delle sostanze d'abuso nei capelli al fine di armonizzare i risultati ottenuti.

Trasferibilità dei risultati

I risultati dello studio saranno oggetto di pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali, in modo da renderli accessibili alla comunità scientifica.

La fase attuativa del progetto prevede riunioni tra i partecipanti per discutere i risultati delle performance dei vari Laboratori, proporre la diffusione di linee guida comuni e condivise ecc. Inoltre, dati del progetto potranno essere presentati a convegni nazionali e internazionali specifici. Poiché l'esperienza dell'HAIRVEQ compiuta negli anni precedenti ha messo in evidenza le molte difficoltà analitiche e interpretative di questo esame (tra le varie problematiche c'è quella di una generale mancanza di omogeneità nella valutazione del risultato analitico), i *report* dei diversi controlli di qualità potranno essere utilizzati dai partecipanti per migliorare i propri risultati analitici durante lo svolgimento dei loro compiti istituzionali.

Valutazione esterna di qualità sull'analisi delle sostanze d'abuso in saliva: ORALVEQ

Dall'anno 2007 il Reparto Farmacodipendenza, tossicodipendenza e doping del Dipartimento del Farmaco dell'ISS organizza e coordina una valutazione esterna di qualità sull'analisi delle sostanze d'abuso in matrice salivare (ORALVEQ). La partecipazione ai programmi di ORALVEQ è gratuita, volontaria e confidenziale.

L'analisi delle sostanze d'abuso nella saliva è un'analisi complessa e delicata, che richiede un'esperienza tecnica e interpretativa e una professionalità accertata da parte di chi esegue queste analisi.

Seguendo i dettami della Qualità applicata ai Laboratori di analisi cliniche, l'ORALVEQ propone il modello del "miglioramento continuativo" attraverso un confronto diretto e costante con i Laboratori che aderiscono al Progetto, che si realizza ad esempio attraverso iniziative quali l'invio ai partecipanti di Procedure Analitiche Standard (o *Standard Operating Procedure*, SOP) o l'invio di campioni di saliva a concentrazione nota (campioni *open*) per verificare l'accuratezza dei dati prodotti.

Il programma prevede due invii annuali, ciascuno di due campioni di saliva su cui identificare l'eventuale presenza di sostanze d'abuso e quantificare la concentrazione delle singole sostanze. Ad ogni laboratorio verrà inviato un *report* con l'elaborazione statistica dei risultati ottenuti da tutti i laboratori partecipanti.

È stata inoltre prevista la stesura di una brochure informativa sull'attività dell'ORALVEQ, con lo scopo di illustrare il programma di controllo di qualità, e l'invio della brochure a tutti i Laboratori pubblici o privati che effettuino analisi sulle sostanze d'abuso in qualunque matrice biologica.

Risultati attesi nel triennio

La stesura di una brochure informativa sull'attività dell'ORALVEQ e l'invio della brochure a tutti i Laboratori pubblici o privati che effettuino analisi sulle sostanze d'abuso in qualunque matrice biologica, lascia sperare in un allargamento consistente dei partecipanti all'ORALVEQ in modo tale che i risultati analitici ottenuti da tali Laboratori migliorino in sensibilità e accuratezza garantendo una sempre crescente affidabilità e omogeneità su tutto il territorio nazionale. L'obiettivo più ambizioso che il progetto si prefigge di raggiungere al termine del triennio di applicazione, è che tutti i partecipanti al controllo di qualità uniformino metodiche e risultati relativi all'analisi delle sostanze d'abuso nei capelli al fine di armonizzare i risultati ottenuti.

Trasferibilità dei risultati

I risultati dello studio saranno oggetto di pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali, in modo da renderli accessibili alla comunità scientifica.

La fase attuativa del progetto prevede riunioni tra i partecipanti per discutere i risultati delle performance dei vari Laboratori, proporre la diffusione di linee guida comuni e condivise ecc. Inoltre, dati del progetto potranno essere presentati a convegni nazionali e internazionali specifici. Poiché l'esperienza dell'ORALVEQ compiuta negli anni precedenti ha messo in evidenza le molte difficoltà analitiche ed interpretative di questo esame (tra le varie problematiche c'è quella di una generale mancanza di omogeneità nella valutazione del risultato analitico), i *report* dei diversi controlli di qualità potranno essere utilizzati dai partecipanti per migliorare i propri risultati analitici durante lo svolgimento dei loro compiti istituzionali.

**Dipartimento
Farmaco**

Attività di controllo, valutazione, parere

Accertamenti ispettivi relativi a BPL e GMP (sostanze farmacologicamente attive e medicinali finiti)

Ispezioni volte alla verifica della conformità ai principi della Buona Pratica di Laboratorio (BPL), in accordo al DL.vo n. 50 del 2 marzo 2007. 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'OCSE. (Numero di ispezioni medie-annue: dieci).

In relazione all'attività GMP, quattro esperti del Dipartimento sono inseriti nella lista di ispettori nazionali e svolgono in media dieci ispezioni annue ciascuno, 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). Alcuni esperti partecipano inoltre alle ispezioni congiunte AIFA/ISS su siti produttivi di radio farmaci.

Piano triennale

Si prevede il proseguimento di queste attività con un impegno non variato rispetto a quanto descritto.

Aggiornamento tabelle stupefacenti ai sensi del DPR 309/90. Pareri per il Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, 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 Dipartimento del Farmaco. 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 dieci pratiche.

Piano triennale

Si prevede di mantenere invariato il numero di pratiche fino ad ora evaso.

Attività come Laboratorio Ufficiale di Controllo per la qualità dei Medicinali (OMCL-EDQM)

La regolamentazione dell'Unione Europea 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 (Laboratori Ufficiali di Controllo dei Medicinali), coordinato dall'EDQM, con lo scopo di creare un pool di risorse che fornisca 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 Dipartimento del Farmaco 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).

Inoltre, 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.

Il Dipartimento partecipa ai meeting annuali degli OMCL europei e trasmette annualmente all'EDQM un *report* delle attività.

Piano triennale

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.

Attività e consulenza per l'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA)

Il Dipartimento del Farmaco svolge una continua attività di collaborazione con l'AIFA e garantisce, grazie a requisiti di esperienza, professionalità e capacità tecnologica, il contributo per la realizzazione di attività ispettive, la valutazione di studi clinici e non clinici, la valutazione della qualità dei farmaci, compresi quelli di origine vegetale, eventualmente anche con accertamenti strumentali-analitici, studi di farmacovigilanza attiva e gestione di Registri nazionali.

Nell'ambito della valutazione di dossier regolativi, sia per AIC nazionali, che per procedure europee centralizzate e di mutuo riconoscimento, fornisce analisi relative alla qualità, sicurezza d'uso ed efficacia dei medicinali. Esperti del Dipartimento, unitamente a funzionari-tecnici dell'AIFA, seguono i lavori dei *Working Group* dell'EMEA.

Il Direttore del Dipartimento, su delega del Presidente dell'ISS, partecipa alle riunioni della Commissione Tecnico-Scientifica dell'AIFA (CTS) contribuendo alla finalizzazione dei lavori della stessa; e altri esperti del Dipartimento, collaborano nelle Sottocommissioni della CTS relative alla Farmacovigilanza e alle Procedure europee.

Piano triennale

La consulenza tecnico-scientifica per l'AIFA, è uno dei compiti istituzionali del Dipartimento e non è quindi programmabile un piano per un'attività che viene svolta continuamente. Tutte le analisi, i pareri, le valutazioni svolte in questo ambito, sono rendicontate annualmente e il loro numero totale si aggira intorno ad alcune centinaia.

Attività per l'attuazione dell'art. 186 e 187 del Codice della Strada (DL 285)

Il Dipartimento del Farmaco 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 CdS (DL 285 del 30/04/1992). 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 27/06/2003 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, della Salute e delle Politiche Sociali del 30 luglio 2008, GU n. 210 dell'8 settembre 2008, "Disposizioni urgenti modificative del codice della strada per incrementare i livelli di sicurezza nella circolazione).

Piano triennale

A seguito delle modifiche apportate al CdS con DL 30/12/2008 n. 207 convertito in L 27/02/2009 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 Dipartimento del Farmaco, 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.

Piano triennale

Si prevede, sulla base delle attività già svolte, di evadere circa 95 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. Numero medio di pareri/anno: dieci.

Piano triennale

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 di Registrazione dei Farmaci (EMA)

Il Dipartimento svolge una consistente attività di consulenza tecnico-scientifica altamente qualificata, per l'Agenzia Europea del Farmaco (EMA, Londra). Il Direttore del Dipartimento

è membro di un importante Gruppo di lavoro dell'Agenzia stessa, denominato *Scientific Advisory Group for HIV/Viral Diseases* (SAG). Alcuni esperti del Dipartimento partecipano ai gruppi tecnici delle'EMEA, supportando il membro italiano del *Quality Working Party*, del *Pharmacovigilance Working Party*, e dell'*Efficacy Working* nelle questioni che riguardano la qualità, la sicurezza post registrazione e l'efficacia 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, numero di riunioni standard /anno: quattro, possibili altre riunioni straordinarie non più di tre l'anno).

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.

Piano triennale

L'accelerazione dei processi di sviluppo dei medicinali e la simultanea necessità di operare su mercati sempre più globali, hanno spinto il mondo farmaceutico verso un percorso di standardizzazione di alcune sue pratiche fondamentali, per cui lo sviluppo dei medicinali richiede attualmente l'applicazione di una metodologia internazionalmente codificata, aderente a norme e linee guida internazionali. Presupposto per poter formulare un rapporto di valutazione di standard internazionale è perciò la conoscenza di queste norme e linee guida, e non ultimo delle procedure di buona pratica (GMP, GLP, GCP) che ne regolano la produzione e la sperimentazione non e clinica. Mantenere ed elevare la partecipazione e la professionalità degli esperti del Dipartimento che partecipano al lavoro di tali gruppi, attraverso un aggiornamento formativo continuo interno ed esterno, è quindi uno degli obiettivi del prossimo triennio.

Consulenza per l'Autorità Garante del Mercato e dell'Editoria

Esame della documentazione e formulazione di pareri sulla rispondenza della pubblicità delle preparazioni in grado di esercitare attività biologiche alle evidenze scientifiche e loro eventuale tossicità e correttezza di impiego; classificazioni di preparazioni ad uso cosmetico o con finalità salutistiche.

Piano triennale

Tale attività comporta l'esame di circa quattro pratiche annue.

Consulenza per organismi internazionali

Alcuni ricercatori del Dipartimento sono inseriti da tempo nelle liste di esperti dell'OCSE (Parigi), 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 alla formulazione di documenti tecnici di indirizzo per l'esecuzione di prove di tossicità.

Nell'ambito di tale attività tali esperti possono essere chiamati a partecipare a riunioni internazionali, che si possono stimare in 2-4 riunioni l'anno.

Inoltre esperti del Dipartimento partecipano anche a riunioni delle Commissioni normative della Comunità Europea a Bruxelles e a Strasburgo, (circa cinque riunioni l'anno).

Piano triennale

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

Esame, pareri e valutazioni su documentazione presentata per l'approvazione della Registrazione di farmaci. Inoltre formulazione e aggiornamento di linee guida per la conduzione di studi tossicologici e preclinici di farmaci e xenobiotici. Nell'ambito di tale attività numerosi esperti del Dipartimento partecipano a commissioni, gruppi di lavoro tecnici e riunioni dell'AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco), al Consiglio Superiore di Sanità, al Ministero della Salute e ad altri Ministeri, qualora necessario. Numero medio di interventi totali: 200 l'anno.

Una considerevole attività che comporta la stesura finale di un rapporto di valutazione, viene svolta per la valutazione di aspetti di qualità e sicurezza pre-clinica e la stesura dei relativi rapporti degli *Investigational Medicinal Product Dossier* (IMPD), cioè i dossier dei medicinali in investigazione in sperimentazione clinica di fase I ai sensi del DPR 70/2001 art. 2, comma 3, lettera c, del DPR 439/2001 e DL.vo 200/2007 che hanno indicato l'ISS come l'Autorità Competente per l'autorizzazione di tutte le sperimentazione cliniche di fase I, da condursi sul territorio nazionale.

Il Dipartimento collabora con l'AIFA alle ispezione di Buona Pratica di Fabbricazione (GMP), in particolare per siti produttivi di radio farmaci, il DL.vo 219/2006 art. 53. comma 12, richiede espressamente che la visita ispettiva venga condotta da un team di ispettori misto AIFA-ISS. Inoltre 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 Buona Pratica di Laboratorio (BPL) in accordo al DL 50 del 2007 e del Decreto del Ministro della Salute del marzo 2008.

Piano triennale

Implementare il numero e la capacità valutativa (mediante aggiornamenti formativi sia interni che esterni, corsi nazionali e internazionali) dei dossier che supportano le richieste di sperimentazioni cliniche di fase I, degli esperti ISS che sono di supporto alla Commissione di cui al DPR 70/2001 art. 2, comma 3, lettera c, del DPR 439/2001 e DL.vo 200/2007 appare indispensabile al fine di implementare l'efficienza dell'Autorità Competente italiana per le fasi I. Un considerevole impegno nel prossimo triennio sarà volto alle attività, all'interno di gruppi di lavoro specifici del Ministero della Salute e dell'AIFA, correlate all'emanazione di linee guida, manuali e procedure dedicate ad aspetti registrativi e autorizzativi di radiofarmaci, per il loro adeguamento alle normative vigenti (DL 211 /2003, DL 200/2007, e le Norme di Buona Fabbricazione di Farmacopea).

Controlli/pareri sulla qualità di specialità medicinali, compresi farmaci di origine vegetale e generici/equivalenti

Il Dipartimento svolge attività di controllo e valutazione sulla qualità dei farmaci, 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 Sistema di Assicurazione della Qualità (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 aprile 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.

Piano triennale

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 del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali e Magistratura), la cui numerosità non è prevedibile. È previsto un incremento delle attività di controllo e valutazione nell'ambito del Gruppo nazionale per la lotta alla contraffazione farmaceutica (IMPACT Italia), in particolare in relazione alla campagna di campionamento e analisi di medicinali sospetti da reti illegali (Internet).

Controlli/pareri su Presidi Medico Chirurgici disinfettanti

Il Dipartimento si occupa del coordinamento delle attività relative alla valutazione della documentazione tecnica presentata per l'autorizzazione all'immissione in commercio a livello nazionale dei Presidi Medico Chirurgici (PMC) disinfettanti per uso umano, veterinario e ambientale (prime registrazioni, variazioni e revisioni) e della verifica della conformità di tale documentazione ai requisiti previsti dal Provvedimento Ministeriale del 5 febbraio 1999 per l'attuazione del DPR n. 392 del 6 ottobre 1998. In genere il Dipartimento richiede parere di competenza al Dipartimento di MIPI (documentazione relativa all'attività disinfettante) e al Centro Nazionale Sostanze Chimiche (accettabilità principi attivi sulla base della normativa biocidi e conformità etichettatura alla normativa sui preparati pericolosi). Il Dipartimento esprime anche pareri su richieste pervenute dall'Autorità Giudiziaria, NAS o Ministero della Salute su tematiche di salute pubblica inerenti i PMC disinfettanti.

Ogni anno arrivano al Dipartimento più di 100 richieste di parere sui PMC disinfettanti, di queste circa il 40% sono relative a nuove registrazioni e il 50% a variazioni e revisioni. Questa attività prevede il pagamento di una tariffa all'ISS secondo quanto previsto dal Tariffario in vigore (Decreto 16/06/2008, tariffe 7b e 7b3). Ogni anno vengono espressi circa 150 pareri l'anno sui PMC disinfettanti. L'unità che si occupa dei PMC disinfettanti appartiene al Reparto Qualità dei farmaci di origine chimica e si avvale della collaborazione del personale della segreteria tecnica del Dipartimento.

Piano triennale

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). Inoltre si propone di continuare a raccogliere dati relativi ai PMC disinfettanti esaminati dall'ISS dall'entrata in vigore del DPR n. 392 del 6 ottobre 1998 ad oggi, grazie all'aggiornamento costante di un archivio elettronico che contiene più di mille voci.

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 od altro, rientra nelle specifiche competenze del Dipartimento del Farmaco.

Il Dipartimento effettua circa 30-35 pratiche l'anno.

Piano triennale

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 Farmaco 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 l'SFU è l'unica struttura nazionale ufficialmente in contatto con il Direttorato Europeo per la Qualità dei Medicinali (EDQM) nel quale ha sede il Segretariato tecnico della Commissione della Farmacopea Europea. L'adesione dell'Italia alla Convenzione per la 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 l'SFU costituisce la Segreteria della Commissione permanente per la revisione e la pubblicazione della Farmacopea Ufficiale.

In tale contesto l'anno 2008 è stato caratterizzato dal notevole impegno derivante dalla pubblicazione della XII Edizione della Farmacopea Ufficiale.

Di particolare rilievo è stato il lavoro connesso con la definizione delle Norme di Buona Preparazione dei Radiofarmaci per Medicina Nucleare.

Nell'ambito delle Commissioni e Gruppi di esperti nazionali ed europei della Farmacopea sono coinvolti esperti appartenenti al Dipartimento del Farmaco. In particolare sette esperti per la Commissione permanente e gruppi di lavoro nazionali; quattro esperti per i gruppi di lavoro della Farmacopea Europea.

È inoltre in essere una convenzione tra l'ISS e l'Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato relativa a "Attività di studio e documentazione finalizzata alla revisione e pubblicazione della Farmacopea Ufficiale".

Piano triennale

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 (CTD, *Common Technical Document*). Nell'ambito del programma di collaborazione ISS-AIFA, gli esperti del Dipartimento del Farmaco valutano dossier di registrazione per procedure di mutuo riconoscimento, 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 (ad esempio vaccini) e da tecnologia ricombinante (ad esempio anticorpi monoclonali). L'attività si può quantificare in circa 220 pareri/anno.

Piano triennale

Si prevede il mantenimento di quest'attività con un impegno, probabilmente in crescita, rispetto alle esigenze dell'AIFA e dell'EMA.

Vigilanza sui laboratori preposti al controllo sanitario dell'attività sportiva

L'ISS come previsto dal DM 13 aprile 2001, GU n. 105 del 08/05/2001, è l'organo responsabile della vigilanza sui laboratori che effettuano i controlli anti-doping. Per l'espletamento della suddetta attività, il Dipartimento del Farmaco organizzerà programmi di valutazione esterna di qualità; procederà a verifiche ispettive sui laboratori; controllerà la fase pre e postanalitica delle analisi e la validità della catena di custodia.

Piano triennale

Questa attività verrà mantenuta per il prossimo triennio 2009-2011.

Dipartimento
Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate

Attività di ricerca

Adjuvanti e immunomodulatori per lo sviluppo di vaccini in patologie infettive e immuno-mediate

Vaccini efficaci per diverse malattie infettive, ma anche per patologie immuno-mediate, sarebbero quanto mai necessari. Tuttavia, le conoscenze sui meccanismi d'attivazione/regolazione della risposta immune e sui potenziali target farmacologici sono scarse. Per problemi di sicurezza, molti vaccini sono costituiti da subunità altamente purificate spesso poco immunogeniche. Questo richiede lo sviluppo di adiuvanti che siano in grado di amplificare e modulare una risposta immune specifica. Storicamente gli adiuvanti sono stati scoperti in modo empirico e molti sono associati ad effetti tossici. Solo due adiuvanti sono registrati per uso umano: l'alum e l'MF59. Entrambi promuovono una buona risposta anticorpale, ma non è noto se hanno effetto sull'immunità cellulo-mediata che è critica in alcuni tipi di malattie. L'adiuvante ha lo scopo di attivare la risposta innata e attraverso un'appropriata presentazione antigenica innesca la risposta adattativa. Tale risposta attraverso lo sviluppo di cellule *memory*, conferisce efficacia vaccinale. Un adiuvante di nuova generazione deve possedere una bassa tossicità e la capacità di stimolare esclusivamente le risposte immunitarie coinvolte nella protezione. Molti patogeni invadono o causano malattia a livello delle mucose, quindi lo sviluppo di adiuvanti mucosali è fortemente auspicato. In questo studio saranno studiati i meccanismi di azione di adiuvanti noti, con lo scopo di individuare nuove sostanze sicure ed efficaci.

Risultati attesi nel triennio

Scopo del progetto è quello di trovare nuovi adiuvanti, efficaci e non tossici, per uso sia mucosale sia sistemico che abbiano la capacità di attivare/regolare l'intero ventaglio delle risposte immunoprotettive. Saranno studiati i meccanismi di azione di adiuvanti o immunomodulatori noti con lo scopo di individuare nuove sostanze sicure ed efficaci. La capacità adiuvante verso antigeni batterici/virali di nuove sostanze di derivazione microbica (tossine batteriche, lipidi, peptidi), verrà valutata in modelli sperimentali animali. La risposta anticorpale, con caratterizzazione dei diversi isotipi, e quella cellulo-mediata, con analisi della Th1, Th2, Th17, Treg e della citotossica CD8-mediata saranno i nostri indicatori biologici. La funzione adiuvante a scopo vaccinale o terapeutico potrà essere valutata in modelli animali di alcune patologie causate da agenti infettivi. Gli effetti sulla attivazione/maturazione delle cellule dendritiche sia mieloidi sia plasmacitoidi, o delle cellule macrofagiche saranno studiati con particolare cura. I meccanismi di regolazione immunologici sia mucosali sia sistemici in corso d'infezioni saranno studiati con lo scopo di capire le risposte coinvolte nella protezione o nella patogenesi e come queste possano essere modulate farmacologicamente.

Trasferibilità dei risultati

Nuovi adiuvanti consentirebbero formulazioni vaccinali/terapeutiche sicure e protettive verso agenti di malattia contro i quali non esistono ancora tali formulazioni. 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. La caratterizzazione delle reali risposte immunitarie coinvolte nella protezione permetterà di individuare nuovi correlati immunologici per lo sviluppo di opportune strategie vaccinali atte a ripristinare una adeguata risposta immune in patologie di estrema importanza per la salute pubblica.

Analisi del fenomeno della citoaderenza degli eritrociti infetti dalle forme sessuate del *Plasmodium falciparum* (EU FP7 – MALSIG)

Scopo del progetto è lo studio dei meccanismi coinvolti nel sequestro delle forme responsabili della trasmissione (gametociti) del parassita malarico *P. falciparum* nel midollo osseo. Il progetto richiede la messa a punto di protocolli per la purificazione di differenti stadi di sviluppo dei gametociti, sistema di cocultura dei parassiti e cellule endoteliali di midollo umano, analisi dell'espressione genica e proteomica allo scopo di identificare i recettori e ligandi coinvolti nel riconoscimento e adesione cellulare.

Risultati attesi nel triennio

Sviluppo di un modello *in vitro* per lo studio dell'interazione tra ospite e parassita. Identificazione delle molecole responsabili nel riconoscimento e adesione tra parassita e cellule umane.

Trasferibilità dei risultati

Protocolli di purificazione di differenti stadi di sviluppo del parassita. Sistema di cocultura di parassiti e cellule endoteliali. Identificazione di antigeni di superficie e ligandi.

Analisi di strategie vaccinali innovative contro il *Mycobacterium tuberculosis* attraverso lo studio del profilo citochinico di cellule dendritiche e macrofagi primari umani

La tubercolosi (TB) è ancora la principale causa di mortalità nel mondo e, pertanto, l'esigenza di trovare un vaccino più efficace di quello composto dal ceppo attenuato bacillo Calmette-Guerin (BCG) è di fondamentale importanza. Infatti negli adulti il BCG diminuisce il rischio di TB solo del 50% riducendo l'incidenza della malattia a livello polmonare ed extrapolmonare. Tra i candidati per nuove strategie vaccinali ci sono BCG ricombinanti, vaccini a subunità o ceppi attenuati di *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), la cui efficacia viene attualmente testata in studi pre-clinici condotti principalmente in topi e cavie. Tuttavia, in considerazione del fatto che il decorso dell'infezione da Mtb è diverso nell'uomo rispetto ai modelli animali utilizzati, è importante verificare l'efficacia di tali strategie vaccinali anche in sistemi sperimentali umani. A tale scopo DC e macrofagi primari umani, che sono i principali target dell'infezione da Mtb, possono rappresentare un valido modello per studiare la regolazione della risposta innata e adattativa diretta contro questo patogeno. Il nostro studio prevede pertanto l'analisi comparativa dell'espressione di citochine infiammatorie e regolatorie coinvolte nell'induzione di una risposta protettiva.

Risultati attesi nel triennio

I maggiori obiettivi di questo studio sono:

- analizzare se la *signature* dell'IFN di tipo I può rappresentare un nuovo biomarcatore per valutare l'efficacia delle strategie vaccinali sulle proprietà immunoregolatorie delle DC umane e sull'attività anti-micobatterica dei macrofagi;
- caratterizzare le diverse strategie vaccinali sull'espressione delle citochine appartenenti alla famiglia dell'IL-12 che possiedono una peculiare capacità di polarizzare la risposta dei linfociti T;
- studiare se l'aggiunta esogena di IFN- β può compensare eventuali deficienze nella risposta delle DC o a ceppi attenuati di Mtb.

L'impatto dell'infezione con un Mtb mutato, con un BCG ricombinante o con vaccini a subunità potrebbe essere studiato e confrontato con gli effetti indotti da ceppi *wild-type* in DC, macrofagi e, se possibile, in DC plasmacitoidi che rappresentano la maggiore sorgente di IFN di tipo I nel sistema immunitario.

Trasferibilità dei risultati

Questo studio potrà fornire nuovi test immunologici per la valutazione dell'efficacia di strategie vaccinali innovative nell'induzione di una risposta immunitaria protettiva contro l'infezione da Mtb.

Antigeni glucanici e anticorpi anti-glucano: potenzialità applicative nel campo delle micosi

Lo sviluppo di terapie innovative a base di anticorpi (Ab) per la lotta alle micosi sistemiche tipiche del soggetto immunocompromesso (candidosi, criptococcosi, aspergillosi) è oggi fortemente auspicato dalla comunità medico-scientifica, sia per la crescente diffusione delle resistenze agli antimicotici, sia per la loro elevata tossicità. Non è facile però individuare Ab antifungini con reale valore protettivo poiché questo è fortemente variabile a seconda dell'isotipo e della fine specificità, mentre molti Ab risultano indifferenti o anche dannosi per la protezione. Il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato per la prima volta che Ab diretti contro i β -glucani, composti altamente conservati presenti nella parete cellulare dei funghi, conferiscono un buon livello di protezione in modelli sperimentali contro diversi patogeni fungini, quali *C. albicans*, *A. fumigatus* e *C. neoformans*. Abbiamo recentemente generato vari Ab monoclonali murini (mAb), con diverso isotipo e diversa specificità verso le configurazioni molecolari presenti nel β -glucano fungino, alcuni dei quali hanno mostrato significativa attività protettiva in modelli animali di candidosi e criptococcosi. Le caratteristiche associate alla protezione e il meccanismo d'azione antifungina di questi mAb non sono ancora state ancora studiate in dettaglio. Dati preliminari suggeriscono comunque che la specificità ristretta per il glucano in configurazione β -1,3 sia predittiva di capacità protettiva e che i mAb possano risultare efficaci anche senza il contributo del sistema immune dell'ospite, ad esempio tramite la capacità di inibire direttamente l'adesione ai tessuti e la crescita delle cellule fungine. Questa caratteristica, particolarmente vantaggiosa per l'applicazione in pazienti con difetti del sistema immune, e la capacità di conferire protezione simultanea contro i maggiori e più diffusi agenti di micosi profonde rende i mAb anti- β -1,3-glucano dei candidati estremamente originali e promettenti per lo sviluppo di reagenti immunologici validi per l'uso clinico. Obiettivo generale del progetto è studiare le proprietà e le attività protettive di questi Ab, caratterizzarne il meccanismo di azione e valutarne l'applicabilità e l'efficacia per il trattamento delle infezioni fungine nell'ospite immunocompromesso.

Risultati attesi nel triennio

Grazie alle competenze del nostro gruppo di ricerca e a collaborazioni già operative con altri gruppi di ricerca, sia intra- che extra-murali, produrremo e caratterizzeremo mAb anti- β -1,3-glucano umanizzati, ingegnerizzati in diversi formati e mAb completamente umani, allo scopo di creare un *panel* di reagenti potenzialmente applicabili per studi clinici nell'uomo. Mediante approcci multipli (biochimici, serologici, immunoelettromicroscopia, *microarray*, metodiche diverse di isolamento e identificazione di proteine) condurremo uno studio dettagliato delle proprietà immunologiche e dei target molecolari dei mAb anti- β -glucano protettivi, in particolare nel modello *C. albicans*. In parallelo, intendiamo indagare più in dettaglio il meccanismo di azione dei mAb, in particolare la loro influenza sui processi di adesione dei funghi ai tessuti e formazione di biofilm, la capacità di bloccare la crescita fungina e la loro possibile modulazione, a vantaggio dell'ospite, dei processi di infiammazione in corso di infezione. Modelli murini di candidosi e aspergillosi sistemica in topi immunocompetenti o immunocompromessi, già in parte messi a punto del nostro gruppo di ricerca, saranno impiegati per valutare in modelli preclinici le attività profilattiche e terapeutiche dei mAb ottenuti, anche in associazione con la terapia antimicotica.

Trasferibilità dei risultati

Questi approcci, tra loro integrati, permetteranno di ottenere mAb anti- β -glucano in forma di reagenti ben caratterizzati (di natura anche brevettabile) applicabili per l'uso nell'uomo e di avere una prima valutazione obiettiva delle loro potenzialità terapeutiche per il controllo delle candidosi e di altre micosi invasive dell'ospite immunocompromesso.

Applicazione di approcci bioinformatici per la definizione della proteina di fusione del virus dell'epatite C

Lo sviluppo di nuovi farmaci è uno degli obiettivi sanitari principali per il trattamento dell'Epatite C (HCV). L'HCV entra nella cellula ospite attraverso un processo di fusione, mediato da una proteina virale, che coinvolge la membrana virale e cellulare. Sebbene l'identità della proteina di fusione dell'HCV non sia nota, la proteina di membrana E1 sembra essere un buon candidato, perchè contiene due regioni idrofobiche che potrebbero rappresentare il peptide di fusione (FP), che si inserisce nella membrana cellulare all'inizio del processo, e il dominio di ancoraggio (TM), inserito nella membrana virale. Secondo il modello di fusione virale, FP e TM interagirebbero strettamente trascinando nell'interazione le due membrane. Obiettivo del progetto è la valutazione bioinformatica della capacità di interazione dei domini idrofobici di E1 a supporto del loro coinvolgimento nel processo di fusione, propedeutico per allestire peptidi inibitori. A tale scopo è previsto l'impiego di due metodi computazionali basati: i) sulla co-evoluzione delle sequenze dei domini proteici interagenti e ii) sulla presenza di *pattern* idrofobici comuni nei domini proteici (*Recurrence Quantification Analysis*, RQA). Obiettivo secondario è di elaborare un metodo computazionale che possa essere applicato in maniera universale anche alle proteine di fusione di altri virus rilevanti dal punto di vista sanitario.

Risultati attesi nel triennio

L'analisi delle sequenze della proteina E1 provenienti da differenti genotipi di HCV fornirà una prima indicazione della presenza di un *pattern* co-evolutivo che lega i due frammenti FP e TM.

La successiva analisi con RQA verrà utilizzata per rilevare il livello di *cross*-ricorrenza tra i due domini FP e TM che, se elevato, suggerirà la presenza di domini idrofobici interagenti nei due peptidi rafforzando l'ipotesi di un loro coinvolgimento nel processo di fusione virale.

L'analisi con RQA verrà utilizzata anche per misurare una riduzione nella quantità di *cross*-ricorrenza tra i due domini proteici FP e TM dovuta a mutazioni puntiformi che risultino efficaci nell'inibire la fusione virale *in vitro*.

La progettazione di peptidi che possano interferire nel processo di interazione tra i due domini FP e TM potrà rappresentare una base da cui partire per la successiva progettazione di farmaci inibitori da valutare in sistemi di infezione *in vitro* dell'HCV (clone infettivo JFH).

In una fase successiva verrà valutata la possibilità di estendere l'approccio utilizzato per HCV ad altri virus provvisti di membrana per i quali il disegno di farmaci inibitori della fusione rappresenti una necessità sanitaria.

Trasferibilità dei risultati

L'approccio computazionale proposto rappresenta uno strumento innovativo per definire le regioni proteiche coinvolte nel processo di fusione virale. La definizione di tali porzioni è importante per la progettazione di nuovi farmaci contro HCV. L'importanza dell'inibizione della fusione virale come approccio terapeutico è sostenuta da evidenze sperimentali relative all'efficacia di farmaci inibitori della fusione virale di HIV-1 e di altri virus provvisti di membrana come Dengue e *Yellow Fever Virus*.

L'approccio proposto potrebbe inoltre permettere di ottenere dati rilevanti per la fusione virale in generale. Infatti, una delle più grandi limitazioni per lo studio della fusione virale è

rappresentata dalla incapacità di ottenere la proteina di fusione cristallizzata. Questa limitazione conferisce quindi all'approccio bioinformatico un ruolo cruciale per l'interpretazione del processo di fusione.

Approcci attuali nello studio delle malattie da *Haemophilus influenzae* in epoca post-vaccinale

Sebbene la vaccinazione dell'infanzia con vaccini coniugati anti *Haemophilus influenzae* di tipo b (Hib) abbia prodotto un drastico decremento dell'incidenza di malattia invasive da Hib, è stata paventata la possibile emergenza di ceppi di *H. influenzae* non prevenibili mediante vaccinazione (capsulati diversi dal b o non capsulati). Sono stati descritti in letteratura *cluster* di casi di malattia invasiva causati da ceppi di *H. influenzae* di tipo a, caratterizzati dalla presenza di una particolare delezione (IS1016/bexA) entro il *locus* capsulare, associata ad un aumento di virulenza del ceppo. Nell'ambito della sorveglianza nazionale delle malattie batteriche invasive, il presente progetto si propone di indagare le caratteristiche di virulenza di ceppi di *H. influenzae* diversi dal b, con particolare riguardo alla caratterizzazione genetica del *locus* capsulare dei ceppi di tipo e circolanti nel nostro Paese e per i quali non è nota l'organizzazione dei geni capsulari.

Nonostante l'introduzione della vaccinazione anti-Hib, *H. influenzae* continua a rappresentare un serio problema in pazienti con immunodeficienza primitiva, che presentano un'aumentata suscettibilità ad infezioni sostenute da germi capsulati. Nell'ambito della rete nazionale specifica IPINET, il presente progetto si propone di stabilire correlazioni tra le caratteristiche di ceppi di *H. influenzae* isolati da pazienti con immunodeficienza primitiva e le caratteristiche cliniche e immunologiche del paziente stesso.

Risultati attesi nel triennio

- Valutare l'impatto dell'introduzione della vaccinazione anti-Hib sulla popolazione di ceppi di *H. influenzae* circolanti in Italia e individuare prontamente un eventuale incremento di specifici tipi capsulari diversi dal b o di ceppi non capsulati.
- Caratterizzare genotipicamente eventuali nuovi cloni di *H. influenzae* emersi come causa di malattia invasiva.
- Analizzare l'organizzazione del *locus cap* e, sequenziandolo completamente da ceppi invasivi di *H. influenzae* isolati nel nostro Paese.
- Correlare caratteristiche fenotipiche e genotipiche di ceppi di *H. influenzae* isolati da pazienti con immunodeficienza primitiva con caratteristiche cliniche e immunologiche del paziente stesso, quali la risposta anticorpale, la funzione e la frequenza delle sottopopolazioni dei linfociti B.
- Sviluppare, sulla scorta dei risultati conseguiti nel presente progetto, linee guida riguardanti l'isolamento e la caratterizzazione di *H. influenzae* da inserire tra i protocolli standardizzati della rete IPINET

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti dai due progetti 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 IPINET le informazioni saranno trasferite 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.

Approccio bioinformatico per la ricerca post-genomica di classi di proteine batteriche coinvolte nella patogenesi

La possibilità di analizzare i genomi batterici alla ricerca di nuovi potenziali determinanti di virulenza è un'opportunità molto importante in un momento in cui l'aumento di organismi multiresistenti agli antibiotici rende il trattamento terapeutico sempre più complesso.

Questa possibilità assume una importanza ancor più rilevante se l'approccio bioinformatico permette l'identificazione di proteine di interesse partendo direttamente dal DNA di genomi batterici ancora in corso di sequenziamento e non assemblati (contig), di cui quindi non è ancora disponibile l'annotazione dei geni.

I programmi disponibili per l'analisi di stringhe si basano infatti sulla sequenza nucleotidica tradotta; spesso non tengono conto della loro posizione nel gene mentre è invece fondamentale nella configurazione tridimensionale della proteina come pure non sono in grado di distinguere se la stringa trovata sia all'interno o all'esterno di una regione codificante.

Con la collaborazione del Dipartimento di TES, l'esigenza di analizzare particolari classi di proteine batteriche di interesse si è concretizzata nello sviluppo di un software *ad hoc* denominato SWIFT.

Il metodo è stato applicato con successo, in termini di sensibilità e specificità, all'identificazione delle proteine di superficie nei batteri gram-positivi in possesso del motivo di ancoraggio alla membrana LPxTG e sue varianti.

Risultati attesi nel triennio

Il sequenziamento di un intero genoma batterico è oggi possibile in due giorni. Al contrario, il lavoro di assemblaggio delle porzioni sequenziate e l'annotazione dei geni presenti può richiedere molti mesi.

Si ritiene opportuno continuare la ricerca già in atto, sia applicando il metodo a nuovi genomi batterici sia individuando altre firme biologiche di interesse (metalloproteasi, antigeni cross-reattivi con costituenti nell'uomo).

A tal fine, l'utilizzo del software SWIFT ha permesso l'identificazione di tutte le proteine di superficie in possesso del motivo LPxTG di ancoraggio alla membrana di genomi non ancora annotati di alcuni batteri gram positivi quali streptococchi ed enterococchi. Questa ricerca pone le basi per lo studio del possibile ruolo nella virulenza di antigeni esposti finora non identificati che, nel caso di emergenti batteri nosocomiali multiresistenti agli antibiotici, assume una notevole importanza di sanità pubblica.

Altro approccio che è in corso di studio è quello dell'identificazione delle proteine di *S. pyogenes* coinvolte nei fenomeni auto-immunitari e possibilmente coinvolte nei disturbi neurologici a carattere auto-immunitario come la corea di Sydenham oppure altre turbe come la sindrome di Tourette in età pediatrica in cui il coinvolgimento di *S. pyogenes* comincia a ricevere consensi dalla comunità scientifica.

Trasferibilità dei risultati

La possibilità di poter usufruire di un software "in casa", adattabile alle esigenze dell'utente, lo rende particolarmente versatile e finora molto apprezzato e richiesto dalla comunità scientifica.

Il programma è stato descritto considerando il caso delle proteine di superficie, ma ovviamente consente la ricerca di altri pattern ad arbitrario livello di lunghezza e complessità. La capacità di analisi diretta dei genomi in corso di sequenziamento permette di velocizzare l'identificazione di nuovi possibili determinanti di virulenza batterici e di verificarne l'importanza e il ruolo nei processi infettivi acquisendo un estremo valore nell'ambito della sanità pubblica per la ricerca di nuovi approcci terapeutici.

Artrite reumatoide e psoriasica: meccanismi immunologici patogenetici con particolare riguardo alle complicanze cardiovascolari

L'artrite reumatoide (AR) e l'artrite psoriasica (APs) sono malattie infiammatorie croniche con danni a carico delle articolazioni. In corso di AR o APs, la sinovia è caratterizzata da un infiltrato infiammatorio, composto principalmente da linfociti T e monociti che promuovono una infiammazione di tipo Th1-Th17. Pazienti con AR e APs presentano una aumentata incidenza di aterosclerosi accelerata, probabilmente dovuta all'attivazione cronica di meccanismi infiammatori coinvolti in tali patologie. In un recente lavoro abbiamo osservato più alti livelli di LDL ossidate e più bassi livelli di NO associati ad un valore di IMT>1, suggerendo che tali marcatori di stress ossidativo potrebbero essere utili per monitorare lo sviluppo della patologia aterosclerotica in corso di AR e APs, (Profumo E, *et al.* Subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid and psoriatic arthritis. In: *Autoimmunity: Role, Regulation and Disorders*. Vogel and Zimmermann (Ed). 2008 Nova Science Publishers, Inc.).

Obiettivi del presente progetto saranno: i) l'identificazione di molecole *self* quali target della risposta immunitaria nell'AR e nell'APs, con particolare riguardo a quelle coinvolte nello sviluppo di disfunzione endoteliale; ii) l'individuazione di marcatori infiammatori circolanti associati allo sviluppo di aterosclerosi accelerata. A tale scopo l'infiammazione sarà valutata sia in circolo che localmente nel liquido sinoviale e nelle biopsie cutanee.

Risultati attesi nel triennio

Il primo risultato atteso è l'acquisizione di nuove informazioni relative ai target antigenici responsabili dell'attivazione linfocitaria nell'artrite reumatoide e nell'artrite psoriasica, che permetteranno di comprendere meglio i meccanismi fisiopatologici alla base di tali patologie, con particolare riguardo a quelli coinvolti nella disfunzione endoteliale. Il secondo risultato atteso è l'identificazione di marcatori infiammatori circolanti associati ad aterosclerosi accelerata in corso di artrite reumatoide e artrite psoriasica che possano avere un ruolo preventivo o prognostico. L'identificazione di tali marcatori potrebbe essere utile per identificare pazienti a rischio di sviluppare la patologia aterosclerotica e per monitorare l'andamento di terapie farmacologiche per ridurre il rischio cardiovascolare.

Trasferibilità dei risultati

Le conoscenze acquisite potrebbero essere utili per lo sviluppo di nuovi strumenti di intervento preventivo e riparativo che potrebbero interferire con i meccanismi di danno nei pazienti con AR e APs, con particolare riguardo al danno vascolare. In particolare l'identificazione di marcatori immunologici in circolo potrebbe rappresentare un valido approccio clinico da utilizzare in concomitanza con quelli già disponibili per migliorare la diagnosi di insorgenza di aterosclerosi accelerata in pazienti con AR o APs.

Attività immunomodulante della subunità B della tossina colerica su monociti del sangue periferico umano

La Tossina colerica è un'enterotossina prodotta dal *Vibrio Cholerae* ed è costituita da due subunità non covalentemente associate: la subunità A che determina la tossicità della tossina e la subunità B (CTB) necessaria per l'ancoraggio e l'ingresso della tossina nelle cellule.

Studi sulla subunità B, non tossica, utilizzata come *carrier* per il trasporto di antigeni a livello mucosale hanno evidenziato le sue capacità immunomodulanti. Negli ultimi anni è stata studiata la funzione immunomodulatoria della subunità B purificata o ricombinate della tossina non coniugata ad antigeni. In un nostro recente lavoro abbiamo evidenziato come la CTB agisca sulle cellule dendritiche umane di derivazione monocitaria riducendone l'espressione del fattore di costimolazione di superficie CD40 e la capacità di produrre IL-12 in seguito ad attivazione con LPS. Queste dendritiche pretrattate con la CTB inducono cellule

regolatorie Tr1 caratterizzate da un aumento di produzione di IL-10 e una ridotta produzione di INF- γ e dalla capacità di sopprimere la proliferazione di cellule T autologhe attivate. Sulla base di questi risultati il presente progetto si propone di:

- studiare l'effetto immunomodulante della CTB sui monociti del sangue periferico umano
- studiare i meccanismi alla base dell'azione della CTB
- studiare l'influenza dei monociti trattati con la CTB sulla risposta delle cellule T *memory*.

Risultati attesi nel triennio

In questo progetto ci proponiamo di studiare gli effetti della CTB ricombinante sui monociti del sangue periferico umano. In particolare ci proponiamo di studiare gli effetti della CTB sul fenotipo, sulle citochine prodotte e sulla funzionalità dei monociti, con particolare attenzione alla produzione di IL-23.

Ci proponiamo inoltre di studiare se i monociti trattati con la CTB siano in grado di agire sulle cellule T *memory* autologhe ed eterologhe con particolare riguardo alla produzione di IL-17, citochina implicata in molti fenomeni infiammatori comprese le malattie autoimmuni e il rigetto dei trapianti d'organo.

Trasferibilità dei risultati

La possibilità di poter regolare le risposte immunitarie derivanti da un'eccessiva infiammazione o dall'attivazione di cellule T autoreattive è uno dei goal della ricerca immunologica. A tale scopo, l'individuazione e lo studio di molecole in grado di modulare le risposte infiammatorie a livello di cellule presentanti l'antigene, che sono le principali responsabili dell'attivazione delle cellule T, riveste un particolare interesse in tutte quelle patologie in cui la risposta mediata da cellule T risulta dannosa per l'organismo.

Attività di ricerca psico-socio-comportamentale e di formazione. Area salute e transculturalità. Malattie infettive e popolazioni straniere. Promozione e tutela della salute della persona straniera attraverso l'individuazione e la sperimentazione di una metodologia di intervento nell'ambito delle malattie infettive

Il progetto, attualmente in corso, intende identificare, sperimentare e promuovere una metodologia di intervento rivolta a persone straniere con problematiche sanitarie legate a specifiche malattie infettive quali HIV, Tuberculosis e Papilloma virus-HPV, con il contributo degli esperti del *National Focal Point* italiano (NFP). L'NFP è una rete, costituitasi nel 1997, e che oggi vede la presenza di 62 esperti appartenenti a strutture pubbliche e ad organizzazioni non governative dislocate in 12 regioni del Nord, Centro e Sud Italia. Il progetto prevede, inoltre, grazie alla collaborazione integrata degli esperti dell'NFP italiano la diffusione di buone prassi attraverso l'attivazione di moduli formativi su aspetti tecnico-scientifici e comunicativo-relazionali nell'approccio transculturale. La metodologia didattica farà riferimento ai principi e ai criteri del modello andragogico di Malcom Knowles che pone al centro dell'intervento formativo l'esperienza del singolo operatore, il quale diventa elemento centrale come persona, come soggetto di apprendimento come professionista. Lo scopo è quello di stimolare nel partecipante nuovi schemi cognitivi, elaborazioni concettuali e collegamenti con l'esperienza pratica, atti a consentire non solo rapide e corrette risposte alle richieste della persona straniera, ma anche interventi specifici in relazione alla complessità che la situazione presenta. Pertanto, nella messa a punto del percorso formativo, che avrà durata di 20-24 ore articolate in tre giorni, si procederà non per argomenti, ma per obiettivi.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi consentiranno la messa in rete di esperienze, competenze e metodologie di intervento in ambito transculturale, nonché l'individuazione di un modello condiviso di strategie

efficaci nella comunicazione della diagnosi e nella presa in carico della persona straniera con problematiche legate alle malattie infettive.

Trasferibilità dei risultati

Al termine del progetto si potrà disporre di una mappatura aggiornata dei servizi pubblici e delle organizzazioni non governative, presenti sull'intero territorio nazionale, impegnati in interventi di prevenzione, diagnosi e cura delle malattie infettive. Inoltre, le attività progettuali consentiranno di ottenere un'ampia panoramica degli interventi indirizzati alla persona straniera rivelatisi efficaci e appropriati in merito a tre specifiche patologie infettive (HIV, Tuberculosis, HPV). Infine, la metodologia formativa sperimentata rivolta al personale dell'SSN e delle ONG potrà essere implementata anche in altre aree di sanità pubblica.

La diffusione dei risultati sarà attuata attraverso pubblicazioni scientifiche internazionali e documenti di indirizzo da inserire su siti internet istituzionali.

Attività di ricerca psico-socio-comportamentale e di formazione. Area salute e transculturalità. Migrazione e salute. Migrazione: sistema di accoglienza verso la popolazione immigrata dei servizi sanitari e verifica dell'osservanza del diritto alla salute di queste popolazioni

Il progetto, attualmente in corso, intende focalizzare l'attenzione su quanto già esistente nel nostro Paese relativamente alle informazioni desumibili dai flussi correnti e alle specifiche politiche regionali. Inoltre, è necessario individuare buone prassi che si avvalgano di un approccio multidisciplinare attraverso la collaborazione integrata tra operatori sanitari con professionalità diverse impegnati sia nel sistema sanitario, sia nel privato sociale. Ciò anche al fine di favorire l'attivazione di interventi preventivi specifici, ad alta efficacia, capaci di raggiungere la popolazione target e finalizzati a stimolare nella persona straniera processi atti a tutelare la propria salute.

Il progetto "Migrazione e Salute" è articolato in sei Unità Operative e due Sotto-Unità. Il ruolo dell'Unità Operativa "Telefono Verde AIDS" dell'ISS è quello di coordinare le attività progettuali, nonché di analizzare flussi informativi quali SDO, Mortalità, IVG e CEDAP.

La specifica struttura del progetto, la complessità degli obiettivi prefissati e l'estensione delle azioni all'intero territorio nazionale hanno richiesto il coinvolgimento degli Assessorati alla Salute e alle Politiche Sociali delle singole Regioni e delle Province autonome.

Risultati attesi nel triennio

I risultati consentiranno di ottenere un contributo volto ad orientare e supportare politiche e interventi di promozione e tutela della salute di persone, famiglie e comunità straniere, di fornire una panoramica della legislazione nazionale e delle politiche regionali, nonché di individuare buone prassi assistenziali con particolare attenzione alla fruibilità dei servizi e, infine, di valutare i percorsi formativi attivati sui temi sanitari dell'immigrazione.

Trasferibilità dei risultati

La metodologia utilizzata, che vede il coinvolgimento di esperti appartenenti a strutture pubbliche e non, impegnati in differenti ambiti di tutela e promozione della salute della persona straniera, costituirà un modello di collaborazione integrata che potrebbe rappresentare un riferimento importante anche in altri studi e ricerche, nazionali e internazionali.

La diffusione dei risultati sarà attuata attraverso pubblicazioni scientifiche internazionali e documenti di indirizzo da inserire su siti internet istituzionali.

Attività di ricerca psico-socio-comportamentale e di formazione. Area prevenzione e sanità pubblica. Progetto di ricerca per l'individuazione e la sperimentazione di modelli di intervento atti a migliorare l'adesione al test

di screening HIV attraverso il contributo delle associazioni facenti parte della Consulta di Lotta all'AIDS

In Italia sembra non esserci uniformità tra le Regioni circa le modalità di accesso al test per la ricerca degli anticorpi anti-HIV, così come non sono noti i dati e la prassi utilizzata dai centri trasfusionali che intercettano, invece, un grande numero di persone, le quali si rivolgono a queste strutture, talvolta, con la sola finalità di sottoporsi al test anti-HIV.

In tale scenario risulta necessario individuare strategie efficaci per facilitare l'accesso ai servizi di screening HIV e sperimentare validi modelli di intervento (*counselling* pre e post test HIV, invio mirato, attivazione di Reti tra servizi) rivolti alla popolazione generale e a specifici target (giovani, donne e persone straniere).

Il progetto, attualmente in corso, si articola in sei Unità Operative per consentire di condurre le differenti azioni previste (indagine conoscitiva – applicazione di interventi atti a favorire l'accesso al test – stesura di linee di indirizzo) su tutto il territorio nazionale. Il ruolo dell'Unità Operativa “Telefono Verde AIDS” dell'ISS è quello di coordinare le attività progettuali, nonché di analizzare i dati e interpretare i risultati.

Le fasi progettuali, compresa la formazione degli operatori-intervistatori, sono coordinate dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali e dall'ISS e sono svolte in collaborazione con Consulta per la lotta contro l'AIDS: LILA, ANLAIDS, CNCA, San Benedetto al Porto e, attraverso di loro, Caritas Italiana, CICA, Circolo Mario Mieli, Forum AIDS Italia, Gruppo Abele, Nadir, NPS, Arché.

Risultati attesi nel triennio

I risultati conseguiti al termine dei lavori permetteranno: l'aggiornamento della situazione italiana relativamente all'accesso al test, indicativo delle singole, specifiche realtà regionali; la realizzazione di interventi volti alla riduzione delle situazioni di criticità, con particolare attenzione ai diversi target di interesse (giovani, donne, stranieri); l'applicazione di buone prassi in tre città (Palermo, Firenze, Genova) di differenti aree geografiche italiane, nonché l'estensione delle buone prassi sperimentate a livello nazionale.

Trasferibilità dei risultati

Tramite tale indagine sarà possibile osservare il quadro delle modalità di accesso (anonimato, gratuità, consenso informato e *counselling*) la tipologia e la quantità dei test eseguiti, in conformità alla L 135/90 e alle indicazioni internazionali in materia.

Tale “fotografia” fornirà elementi importanti ai *policy maker* in merito alle strategie da adottare per favorire l'accesso al test e alla standardizzazione dell'offerta, nonché alle modalità di esecuzione dello stesso.

Infine, il progetto, grazie a un fattivo processo di collaborazione tra tutti i soggetti coinvolti potrà costituire un interessante modello di integrazione tra istituzioni (nazionali, regionali, locali) e privato sociale impegnati in Italia nel contrasto all'HIV. Tale modello di integrazione potrà essere proposto anche a livello europeo in quanto le criticità legate all'accesso e alla fruibilità del Test HIV rappresentano temi di interesse e priorità nell'ambito di EU *Health Programme*.

Cambiamenti climatici e altri possibili determinanti di diffusione dei virus trasmessi da vettori: studi epidemiologici e modelli matematici

Gli *outbreak* di Chikungunya (CHIKV) e *West Nile* (WNV) verificatesi in Italia negli ultimi anni hanno confermato che esiste la possibilità di introdurre nel nostro Paese malattie virali esotiche trasmesse da zanzare. Il virus CHIKV è trasmesso da zanzare della specie *Aedes* in Africa tropicale e in Asia e in particolare da *Ae. albopictus* in Italia. Il virus WNV può essere trasmesso da diverse specie di zanzara (almeno 75). In Europa *Culex pipiens* è il vettore più

competente. In seguito alle variazioni climatiche aumenta il rischio che altre specie di zanzara come per esempio *Ae. aegypt* (il vettore dei virus DENV e del virus della Febbre gialla) possano diffondersi stabilmente in Italia. Tali vettori erano presenti in Italia nel 1944 e nel 1972.

In questo progetto, i dati sulle dinamiche stagionali e sulla distribuzione delle popolazioni di *Ae. albopictus* e *Cx. pipiens* verranno utilizzati assieme a quelli dell'epidemia umana di CHIKV che si è verificata a Ravenna nel 2007 e a dati meteorologici per predire, con un modello matematico multi-compartimentale, il rischio di epidemie da arbovirus nel tempo e nello spazio. La popolazione umana verrà suddivisa nei seguenti compartimenti: suscettibile, esposti, infettati e guariti (modello SEIR); la popolazione delle zanzare sarà suddivisa nelle frazioni: suscettibili e infettati (modello SI). I dati meteorologici (pioggia, umidità relative, temperatura) saranno ottenuti dall'ARPA – Agenzia Regionale Prevenzione e Ambiente. Un simile modello sarà utilizzato per predire il rischio di Dengue. Le informazioni ottenute saranno utilizzate per pianificare la prevenzione delle malattie da arbovirus e valutare azioni specifiche volte al controllo dei vettori. Il progetto ha un approccio multidisciplinare e permette di intervenire a diversi livelli dell'interfaccia tra zanzare, ospite e patogeni. Questo rappresenta una novità nell'ambito delle malattie trasmesse da vettori.

Risultati attesi nel triennio

La distribuzione delle zanzare sarà messa in relazione con fattori climatici e ad altri fattori per predire le variazioni spazio-temporale delle malattie trasmesse da vettori. I risultati saranno riportati su mappe e saranno utilizzati per produrre una brochure sulle zanzare da distribuire alla popolazione generale e ai turisti e una brochure tecnico-scientifica per il personale sanitario. La brochure per la popolazione generale darà informazioni sulle infezioni da arbovirus in Italia e sulle misure preventive che ciascun cittadino potrà mettere in atto nella propria abitazione/proprietà terriera per minimizzare l'habitat delle zanzare. La brochure tecnico-scientifica spiegherà in maggiore dettaglio i materiali e metodi dello studio e illustrerà i principali risultati dello studio. Le brochure saranno distribuite alle ASL e al personale sanitario e saranno disponibili in italiano e in inglese.

Trasferibilità dei risultati

I risultati saranno utilizzati per predire l'andamento spazio-temporale dell'epidemie da arbovirus in Italia e per valutare le azioni finalizzate al controllo delle zanzare. Tali azioni rappresentano un fattore chiave nella selezione e implementazione degli interventi di prevenzione e controllo dei virus esotici. Il progetto permetterà di ottenere informazioni su come la distribuzione dei vettori vari nel tempo e nello spazio in funzione di parametri climatici e di altri fattori. Tali informazioni permetteranno di segnalare in modo tempestivo le situazioni a rischio e di identificare le aree in cui intervenire. Le informazioni ottenute saranno accurate e attendibili in modo tale da permettere di massimizzare l'efficacia degli interventi. I risultati del progetto potranno essere utilizzati dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali e dalle ASL per decidere quali strategie adottare nell'eventualità si verificano delle epidemie di CHIKV, WNV, o DENV in Italia. Le brochure per la popolazione generale e per i turisti potranno essere utilizzate in campagne di sensibilizzazione della popolazione per aumentare il livello di attenzione e informazione sulle zanzare e sulle malattie che possono trasmettere agli uomini e agli animali. È infatti importante coinvolgere anche la popolazione generale perché cooperi eliminando i micro focolai in cui si sviluppano le zanzare nelle proprietà private. La brochure tecnico-scientifica informerà il personale medico e paramedico sulle malattie trasmesse dalla zanzara. Tali dati saranno utili per l'identificazione precoce di eventuali casi di CHIKV, WNV, o DENV.

Caratterizzazione di geni di *Legionella pneumophila* codificanti potenziali fattori di virulenza

Legionella è un patogeno intracellulare facoltativo capace di alterare le difese dell'ospite sfuggendo alla fusione fagosoma-lisosoma. Lo studio di mutanti avirulenti può essere uno strumento per la caratterizzazione dei meccanismi molecolari che regolano gli eventi che determinano tale alterazione. Le avanzate tecnologie e la conoscenza del genoma di *Legionella* hanno dato una svolta nell'approccio agli studi di patogenesi. Nel nostro laboratorio abbiamo analizzato il proteoma di un ceppo di *Legionella pneumophila* sierogruppo 6 avirulento, mutante spontaneo (Vir-) e del ceppo parentale (Vir+). L'analisi comparativa dei proteomi ha rilevato la presenza di circa cento proteine differenzialmente espresse, alcune delle quali sono state identificate. In particolare sono stati identificati gli spot proteici presenti o iperespressi in Vir+ ma non in Vir-. Molte delle proteine identificate corrispondono ad enzimi del metabolismo basale, per i quali non è nota in letteratura alcuna correlazione con la virulenza. Poiché si tratta di enzimi scarsamente caratterizzati in *Legionella*, il significato della loro assenza o della loro ipoespressione non è facilmente correlabile con la perdita di virulenza. Le alterazioni osservate probabilmente rappresentano un segnale di allarme per il nostro mutante per cercare di sopperire a possibili situazioni di stress, provenienti dall'ambiente. Pertanto, la caratterizzazione dei corrispondenti geni e, laddove noti, dei loro regolatori, darà utili informazioni sia sulla differente espressione sia, eventualmente, sulla correlazione con la perdita di virulenza.

Risultati attesi nel triennio

Determinazione della sequenza nucleotidica dei geni differenzialmente espressi nei due ceppi di *Legionella pneumophila* sierogruppo 6 e confronto con gli stessi geni in *L. pneumophila* sierogruppo 1. Creazione di ceppi mutati nei geni presi in esame e ripristino del genotipo *wild type* attraverso transcomplementazione. Determinazione della virulenza di tali ceppi *in vitro* attraverso saggi di adesione e moltiplicazione cellulare e *in vivo* con infezione in topi A/J permissivi.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti potranno dare informazioni sul significato della differente espressione dei geni oggetto di studio e la possibile correlazione con gli stessi geni presenti in *Legionella pneumophila* sierogruppo 1 (ceppo che insieme al siero gruppo 6, si riscontra maggiormente in patologia). Inoltre l'uso di ceppi di *Legionella* specificamente mutati potrà meglio caratterizzare geni mai studiati e contribuire a comprendere il loro ruolo nella patogenesi di questo microorganismo.

Caratterizzazione di *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) dormiente *in vitro* e nell'interazione con la cellula ospite (finanziato, *workpackage* 1 e 2 del progetto europeo 2008-10, titolo "*Latent Tuberculosis: new tools for the detection and clearance of dormant Mycobacterium tuberculosis*")

Mtb infetta un terzo della popolazione umana, nella maggior parte dei casi in forma latente. La tubercolosi latente dipende dalla capacità del micobatterio di entrare in una fase non replicativa detta dormienza. *In vitro*, Mtb viene reso dormiente utilizzando colture a tappo chiuso in cui l'ossigeno viene lentamente consumato e il batterio si adatta a condizioni anaerobiche, arrestando la replicazione. Nell'ambito del progetto verrà utilizzata questa metodica per due approcci: i) studi *in vitro*: analisi dell'espressione genica di Mtb dormiente di varie classi di geni legati alla fase di crescita e quiescente, al metabolismo aerobio e anaerobio, al metabolismo lipidico. Inoltre verranno studiati batteri dormienti a cui saranno aggiunti specifici nutrienti per osservarne il comportamento e verrà affrontata la tematica della resuscitazione, come cioè il batterio è capace di risvegliarsi dalla fase dormiente, uno step essenziale per la

conversione della TB latente in TB attiva; ii) studio di Mtb intracellulare: batteri dormienti verranno utilizzati per infettare cellule della linea monocitaria umana THP-1 allo scopo di studiare come il micobatterio dormiente viene fagocitato, il suo destino intracellulare, la capacità di crescere e di replicarsi all'interno della cellula, l'espressione genica e infine la reazione della cellula al micobatterio dormiente. Tali studi verranno effettuati analizzando parametri microbiologici, di biologia molecolare e microscopia.

Risultati attesi nel triennio

Questi studi permetteranno l'acquisizione di nuove conoscenze sulla capacità di sopravvivenza e sull'espressione genica del *Mycobacterium tuberculosis* nelle diverse fasi della dormienza e in diverse condizioni di coltura, nonché i meccanismi di riattivazione della replicazione e della ripresa dell'espressione genica durante la fase di resuscitazione. Per quanto riguarda l'infezione delle cellule con il micobatterio dormiente, l'analisi dei parametri microbiologici e di espressione genica nonché di microscopia permetteranno di identificare eventuali differenze nell'interazione micobatterio dormiente-cellula ospite rispetto al micobatterio aerobio-cellula, di studiare il percorso intracellulare del micobatterio dormiente e di analizzare la modulazione dell'espressione genica del micobatterio e della cellula ospite durante l'infezione.

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 dormiente, come la capacità di sopravvivenza, l'espressione genica, il metabolismo e la capacità di riprendere la crescita in presenza di ossigeno e nutrienti. Inoltre, gli studi sull'interazione micobatterio dormiente-cellula ospite porterà nuove conoscenze su importanti tematiche riguardanti i meccanismi che determinano la tubercolosi latente e la sua riattivazione. Lo studio di tali modelli, infine, saranno di utilità per approcci futuri innovativi per debellare questa malattia.

Caratterizzazione di patogeni zoonotici emergenti e loro interazione con l'ospite e i vettori: caratterizzazione molecolare di ceppi di *Campylobacter jejuni* isolati da infezioni umane e da animali

Le zoonosi trasmesse da alimenti sono caratterizzate da estesi episodi epidemici e dall'emergenza continua di nuovi agenti patogeni. Il numero di segnalazioni di infezioni gastroenteriche da *Campylobacter jejuni* rimane elevato in Europa con 180.000 casi riportati nel 2006 e un numero considerevole di episodi epidemici nazionali e internazionali. Il gruppo di età più colpito è rappresentato da bambini inferiori a quattro anni e la percentuale di ceppi di *Campylobacter* resistenti ad antibiotici come chinoloni e fluorochinoloni si avvicina al 50%.

Campylobacter jejuni colonizza il tratto intestinale degli animali da reddito e il pollame rappresenta il principale serbatoio per questo microrganismo. Ci sono evidenze sul fatto che solo alcuni dei ceppi animali sono in grado di causare gravi infezioni nell'uomo, tuttavia i marcatori genetici in grado di predire la virulenza non sono stati ancora individuati. Sebbene la specie *Campylobacter* venga considerata geneticamente eterogenea, sembrerebbe che solo un limitato numero di cloni sia in grado di diffondere e di persistere nel tempo. Se il successo di queste linee clonali sia dovuto al diverso grado di patogenicità o ad un migliore adattamento all'ospite non è chiaro.

Risultati attesi nel triennio

Attraverso una caratterizzazione molecolare di ceppi di *C. jejuni* di diverso isolamento (uomo, diverse specie animali) sarà possibile identificare linee clonali con caratteristiche microbiologiche ed epidemiologiche diverse.

L'identificazione a livello genomico delle caratteristiche di ceppi rappresentativi di linee clonali diverse permetterà lo sviluppo di strumenti diagnostici atti a discriminare ceppi con diverso grado di patogenicità.

Tutto ciò contribuirà a chiarire i meccanismi alla base della loro circolazione negli animali serbatoio, permetterà una migliore definizione di criteri microbiologici per la sicurezza degli alimenti favorendo l'individuazione di più idonee misure di controllo dell'infezione nell'uomo.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti saranno trasferiti al Sistema sanitario nazionale 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.

Caratterizzazione di proteine immunostimolanti di *Cryptosporidium parvum*

La ricerca di molecole coinvolte nel processo dell'infezione da *Cryptosporidium parvum* ha portato all'identificazione di 14 nuove proteine del parassita particolarmente immunogeniche, di cui sette sono strettamente correlate a proteine simili in altri *Apicomplexa* (es. generi *Plasmodium* e *Toxoplasma*). Il prossimo obiettivo sarà quello di identificare il ruolo svolto da queste proteine nella fase d'invasione della cellula ospite. Inoltre si studieranno l'interazione di queste molecole con il sistema immunitario dell'ospite.

La proteina multimodulare Cpa135, precedentemente caratterizzata nel nostro laboratorio, appartiene ad una famiglia di proteine caratteristiche ed esclusive degli *Apicomplexa*. La sequenza del gene per questa proteina sarà utilizzata per l'analisi dei polimorfismi all'interno del genere *Cryptosporidium*. Inoltre, verranno studiate le proprietà immunomodulanti di questa proteina che si comporta come un antigene immunodominante.

Risultati attesi nel triennio

La ricerca di molecole coinvolte nel processo dell'infezione da *Cryptosporidium parvum* ha portato all'identificazione di 14 nuove proteine del parassita particolarmente immunogeniche, di cui sette sono strettamente correlate a proteine simili in altri *Apicomplexa* (es. generi *Plasmodium* e *Toxoplasma*). Il prossimo obiettivo sarà quello di identificare il ruolo svolto da queste proteine nella fase d'invasione della cellula ospite. Inoltre si studieranno l'interazione di queste molecole con il sistema immunitario dell'ospite.

La proteina multimodulare Cpa135, precedentemente caratterizzata nel nostro laboratorio, appartiene ad una famiglia di proteine caratteristiche ed esclusive degli *Apicomplexa*. La sequenza del gene per questa proteina sarà utilizzata per l'analisi dei polimorfismi all'interno del genere *Cryptosporidium*. Inoltre, verranno studiate le proprietà immunomodulanti di questa proteina che si comporta come un antigene immunodominante.

Trasferibilità dei risultati

Si provvederà ad informare il personale dell'SSN dei risultati ottenuti mediante presentazioni a congressi e convegni scientifici e tramite l'organizzazione di workshop su temi specifici. Inoltre i principali e più significativi risultati del progetto saranno oggetto di pubblicazioni su riviste internazionali e nazionali.

Caratterizzazione virale ed epidemiologia delle infezioni da Virus epatitici

Il progetto ha lo scopo di sviluppare, con un approccio coordinato tra vari gruppi di ricerca sulle epatiti virali, interni all'ISS e presenti sul territorio nazionale, le recenti acquisizioni di genetica virale e nuove tecnologie molecolari, per ricerche in campo epidemiologico anche in

relazione alle modificazioni dei *pattern* epidemici conseguenti alle variazioni dei comportamenti e agli spostamenti di popolazioni. Tali ricerche hanno impatto nei settori della diagnosi e prevenzione. Il progetto include lo studio di virus di recente caratterizzazione e la definizione del relativo potenziale epatopatico anche attraverso l'applicazione di nuove metodologie diagnostiche. È focalizzato all'obiettivo generale dello studio della struttura molecolare, della replicazione virale e dell'epidemiologia dei virus HAV, HBV, HCV, HDV, HEV e di nuovi virus dell'epatite e varianti virali. Il progetto si avvale della disponibilità di "Librerie di Acidi Nucleici o di Espressione Differenziale", della possibilità di approcci sperimentali per l'analisi simultanea e il confronto dei profili di espressione di un considerevole numero di geni e della disponibilità di strumenti di nuova generazione (*pysequencing technology*) per l'analisi di sequenze genomiche.

Risultati attesi nel triennio

La valutazione di diverse associazioni di infezioni, includenti i nuovi virus potenzialmente epatotropici e virus con prevalente target epatico e varianti virali e virus causa di infezioni occulte, potrà portare all'identificazione di categorie di infezioni singole e multiple caratterizzate da più elevati livelli di patogenicità. Possono essere identificati, mediante analisi di follow-up relativi a varie fasi della progressione cronica e dell'insorgenza di epatocarcinoma, i profili di espressione sia dell'ospite che del patogeno. Tali dati possono contribuire alla formulazione di precise ipotesi patogenetiche a livello molecolare anche applicabili in campo terapeutico.

Il progetto è basato sulla pluriennale collaborazione instaurata con vari gruppi nazionali del precedente progetto nazionale Epatiti Virali dell'ISS. Obiettivi specifici sono:

- Studio di agenti virali associati ad epatiti anche di recente caratterizzazione (infezioni da nuovi virus, varianti virali e infezione occulte). Valutazione del ruolo nell'evoluzione patologica con particolare riferimento alla presenza di infezioni multiple;
- Studi di caratterizzazione genomica e analisi filogenetica di virus dell'epatite ivi inclusi i virus di più recente caratterizzazione (HEV);
- Studio delle modificazioni molecolari e di espressione genica nell'epatocarcinogenesi da HBV e HCV;
- Studio dell'evoluzione dei *pattern* epidemici anche conseguenti a modificazioni di comportamenti e spostamenti di popolazioni.

Trasferibilità dei risultati

L'incremento delle cognizioni sulla struttura virale e patogenesi delle infezioni da virus dell'epatite, anche di recente caratterizzazione, basato sulla maggiore definizione delle caratteristiche delle cinetiche di replicazione e variazioni di competizione struttura delle popolazioni virali in relazione all'evoluzione genetica, potrà portare al perfezionamento di strumenti e metodologie diagnostiche e unitamente alla disponibilità di nuove preparazioni immunogeniche e nuovi farmaci antivirali all'applicazione di mirate terapie combinate.

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 e la sua espressione è spesso associata ai diversi stadi di maturazione e/o attivazione. È in grado di esplicare 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 cellule dendritiche (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. JI* 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 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-kB. Punto focale sarà inoltre lo studio del coinvolgimento del CD38 nella regolazione di IL-12, citochina chiave nel differenziamento delle cellule Th. Ci proponiamo, inoltre, di studiare l'espressione di CD38 nelle DC mieloidi e plasmacitoidi circolanti mediante analisi citofluorimetrica di campioni di sangue intero stimolati con molecole di origine microbica, atte dunque ad indurre maturazione delle DC.

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 CD4 Th1, Th2, Th17 e Tregs.

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.

Contributo esterno: Università di Torino.

Cellule dendritiche plasmacitoidi nella sclerosi multipla: valutazione del loro ruolo patogenetico e modulazione della loro funzione durante il trattamento con IFN-beta

La sclerosi multipla è la più diffusa patologia infiammatoria cronica e demielinizzante del sistema nervoso centrale. L'Interferone (IFN)- β , il trattamento di scelta nella cura dei pazienti con sclerosi multipla a ricadute e remissione, influenza diversi aspetti della risposta infiammatoria che caratterizza questa patologia autoimmune. Tuttavia, il meccanismo esatto

mediante il quale questo farmaco esercita i suoi effetti terapeutici rimane ancora non completamente chiaro. Nel corso dei nostri studi ci siamo occupati di analizzare gli effetti indotti da questa terapia sulle cellule dendritiche plasmacitoidi (pDC), una sottopopolazione di cellule dendritiche caratterizzate dalla capacità di rilasciare elevate quantità di IFN di tipo I se opportunamente stimulate. Numerosi dati in letteratura hanno evidenziato il loro accumulo nei tessuti cronicamente infiammati suggerendo il loro diretto coinvolgimento, associato all'alterato e continuo rilascio di IFN di tipo I, nell'induzione di alcune patologie infiammatorie croniche (*Lupus* sistemico eritematoso, psoriasi, artrite reumatoide). Da questi risultati si evince che la presenza di pDC e il rilascio di IFN di tipo I sono dei fattori determinanti per l'induzione e/o cronicizzazione dei processi flogistici che caratterizzano alcune malattie autoimmuni. Nel corso dei nostri studi abbiamo osservato che queste cellule sono presenti nelle lesioni cerebrali e che l'IFN- β è capace di influenzare la loro maturazione e la loro capacità di stimolare una risposta infiammatoria. I nostri risultati pertanto suggeriscono che le pDC, dopo essere venute a contatto con IFN- β nel sangue periferico, diventano "iporesponsive" verso gli stimoli maturativi che possono incontrare nel tessuto cerebrale infiammato. Sulla base di queste intendiamo estendere i nostri studi analizzando i meccanismi indotti dall'IFN- β in queste cellule e studiando gli effetti che le pDC "iporesponsive" svolgono nella regolazione della risposta immunitaria.

Risultati attesi nel triennio

Nei nostri precedenti progetti abbiamo mostrato che le pDC sono reclutate e si attivano nel tessuto cerebrale di pazienti con SM e che la loro maturazione è influenzata dal trattamento con IFN- β sia *in vivo* che *in vitro*. In particolare, abbiamo osservato che l'IFN- β 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. Basandoci su queste premesse, vorremmo estendere i nostri studi:

- per identificare i meccanismi mediante i quali l'IFN- β agisce sulla capacità immunoregolatoria delle pDC;
- per caratterizzare gli effetti indotti da queste pDC "iporesponsive" sul differenziamento dei linfociti Th e Treg.

Pensiamo inoltre di caratterizzare la risposta dei linfociti B alla stimolazione dei TLR-7 e TLR-9, recettori condivisi con le pDC, in pazienti con MS in trattamento con IFN- β .

Trasferibilità dei risultati

L'ottenimento degli obiettivi permetterà di individuare se e come le pDC sono coinvolte nella patogenesi della sclerosi multipla. Inoltre ci proponiamo di arrivare ad una migliore definizione dei meccanismi indotti dalla terapia con IFN- β tramite lo studio degli effetti stimolati nelle pDC con l'obiettivo di individuare nuove prospettive di studio e applicazione per questo trattamento terapeutico.

Cloni batterici di *E. coli* causa di infezioni extra-intestinali nell'uomo con particolari profili di antibiotico resistenza di possibile origine zoonosica

Nell'uomo, infezioni extraintestinali (infezioni del tratto urinario, sepsi, ecc.) causate da ceppi di *E. coli* definiti ExPEC sono comuni e rappresentano un problema emergente nell'ambito della salute pubblica. Durante gli ultimi anni, in numerose Nazioni europee, inclusa l'Italia, si è avuta una notevole e generale diffusione di ceppi ExPEC resistenti ai fluorochinoloni, considerati antibiotici di prima scelta nel trattamento delle infezioni da essi causate. Infezioni extraintestinali da *E. coli* sono molto diffuse anche tra gli animali e vengono definite colibacillosi sistemiche. La concomitanza temporale tra la comparsa di ceppi di ExPEC fluorochinoloni-resistenti isolati da infezioni umane e l'autorizzazione all'uso di enrofloxacin in medicina veterinaria, in particolare nel trattamento di colibacillosi nelle specie aviarie, ha

indotto ad ipotizzare che detto uso possa aver contribuito all'incremento di resistenza ai fluorochinoloni osservato in patologia umana. Nell'ambito di un sistema pilota da realizzare entro le reti di sorveglianza esistenti, quali Enter-net, il presente progetto si propone di monitorare la circolazione di cloni ExPEC con particolari profili di antibiotico resistenza di possibile origine zoonosica, al fine di fornire elementi scientifici di valutazione riguardo la possibile origine aviaria di ceppi ExPEC fluorochinoloni-resistente responsabile di infezioni nell'uomo.

Risultati attesi nel triennio

- Realizzazione di un sistema pilota di sorveglianza in grado di monitorare la circolazione di ceppi di *E. coli* fluorochinoloni-resistenti sia tra isolati da infezioni extraintestinali nell'uomo sia tra isolati da animali.
- Caratterizzazione fenotipica e genotipica di isolati di origine umana e aviaria raccolti mediante il sistema pilota, comprensiva di determinazione del gruppo filogenetico e analisi MLST al fine di definire il complesso clonale.
- Caratterizzazione e localizzazione dei geni di resistenza ai fluorochinoloni, inclusi i determinanti genetici *qnr* (*qnrA*, *qnrB* e *qnrS*) e *aac(6')*-Ib-cr associati ai plasmidi, in ceppi di origine umana ed aviaria.
- Identificazione di particolari cloni fluorochinoloni-resistenti e multiresistenti in relazione all'origine (umana o aviaria).
- Valutazione della possibile origine aviaria di ceppi ExPEC fluorochinolone-resistenti causa di infezioni nell'uomo.
- Valutazione del rischio per la salute dell'uomo associato all'esposizione a *E. coli* fluorochinolone-resistente di possibile origine zoonosica mediante la catena alimentare.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti saranno trasferiti al Sistema sanitario nazionale 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 pilota i risultati prodotti saranno trasferiti 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.

Comunità europea: VI EU Framework Programme for research, technological development and demonstration. Sub-Priority: Global changes and Ecosystems, EDEN (Emerging Diseases European Network). Sottoprogetto EDEN West Nile

EDEN (*Emerging Diseases in a changing European environment*) è un progetto integrato quinquennale della comunità europea, composto da sei sottoprogetti, che si prefigge di identificare le condizioni eco-ambientali che, in Europa, possono influenzare la distribuzione spazio-temporale di alcuni tra i potenziali vettori di agenti patogeni umani. EDEN vede coinvolti 24 Paesi europei e 47 istituti di ricerca con esperienza e caratteristiche tali da permettere il raggiungimento degli obiettivi del progetto. L'Istituto partecipa al progetto come una delle tre Unità Operative italiane, coordinate dall'IZS di Teramo, con il *team* di entomologia medica che fa capo al Reparto di Malattie trasmesse da vettori e sanità internazionale.

Il sottoprogetto EDEN/*West Nile Disease*, si propone di migliorare la conoscenza di questo arbovirus, responsabile dell'encefalite equina, e di individuare, in Europa, le specie di zanzare vettrici tra quelle del genere *Culex*. Per l'Italia la riserva naturale della Palude di Fucecchio,

Firenze, dove nel 1998 si sono verificati alcuni casi di questa malattia, rappresenta l'area pilota per lo studio dell'ecologia e biologia del vettore e dell'ospite. Nell'area sono state individuate dieci stazioni di studio, corrispondenti ad altrettante aziende con allevamento di cavalli. Come previsto nel protocollo operativo, le attività entomologiche verranno effettuate settimanalmente (raccolta di larve, catture diurne e notturne di adulti, catture con esca animale, catture con trappole) da aprile ad ottobre 2005.

Risultati attesi nel triennio

Definizione degli effetti che i cambiamenti ambientali e climatici previsti per il prossimo decennio potrebbero avere sulla diffusione del virus dell'encefalite equina *West Nile*. Conoscenza approfondita dell'epidemiologia di questa arbovirosi, con particolare riferimento ai vettori e ai serbatoi.

Trasferibilità dei risultati

- Definizione delle aree a rischio di introduzione del virus in Italia.
- Acquisizione di metodiche per la diagnosi rapida sia in medicina veterinaria che in medicina umana.
- Produzione di mappe di rischio.

Controllo delle infezioni della povertà e delle infezioni emergenti in Paesi con economie di transizione o in via di sviluppo

HIV è il prototipo delle infezioni emergenti, essendo stato introdotto nella popolazione umano intorno nella prima metà del '900, ma è anche la più importante fra le malattie della povertà. L'ultimo quarto di secolo, però, è stato caratterizzato dall'emergenza di altre malattie infettive (es. febbri emorragiche quali Ebola o Lassa, SARS, virus influenzale H5N1) e dalla riemergenza di una serie di infezioni trasmesse da vettori (es. Dengue, *West Nile*, Chikungunya, febbre emorragica Crimea-Congo). Alcune di queste malattie infettive hanno raggiunto e si sono diffuse in Paesi industrializzati a clima temperato, mentre altre tendono ad emergere e circolare quasi esclusivamente in Paesi poveri di risorse e caratterizzati da un clima tropicale. La recente comparsa di malattie dovute ad agenti esogeni anche nel nostro Paese rende ancora più importante il controllo delle infezioni emergenti e delle malattie della povertà nei Paesi in via di sviluppo (es. Paesi africani) e in quelli con economie di transizione (es. Paesi balcanici). Questo progetto si propone di rafforzare le reti epidemiologiche, migliorare le indagini su focolai epidemici e le misure di controllo in una serie di paesi (es. Bulgaria, Egitto, Camerun, Mali).

Risultati attesi nel triennio

Dai risultati del progetto ci si aspetta una miglior definizione della distribuzione e dei determinanti di emergenza e diffusione di specifiche malattie infettive in Paesi con i quali sono in atto progetti di cooperazione. In particolare, questi includono progetti di ricerca e interventi di controllo dell'infezione da HIV in Camerun, studi e interventi relativi alle cause infettive di cecità o ipovisione in Mali, studi epidemiologici e molecolari sulle virosi respiratorie e sulle meningoencefaliti virali in Egitto, il rafforzamento dei sistemi di sorveglianza basati su dati di laboratorio in Bulgaria e Turchia. Verranno inoltre condotte indagini epidemiologiche finalizzate alla identificazione di determinanti di *outbreak*, con particolare riferimento a quelli causati da virus emergenti e riemergenti (es. indagini su focolai di febbre emorragica da virus Crimea-Congo nei Paesi balcanici).

Trasferibilità dei risultati

Il progetto ha un doppio livello di trasferibilità: il primo riguarda l'aumento di conoscenze e di capacità di controllo delle infezioni emergenti e riemergenti e/o della povertà nei Paesi con i quali sono in atto interventi di collaborazione o cooperazione; il secondo è relativo alla

trasferibilità di informazioni ed esperienze finalizzate anche alla sorveglianza epidemiologica e il controllo delle infezioni nel nostro Paese. Infatti, a causa della globalizzazione, è sempre più necessario abituarsi a convivere con malattie infettive sino ad ora considerate esotiche. È per questo che i progetti di cooperazione non possono essere considerati esclusivamente interventi a favore di paesi e popoli bisognosi, ma anche attività che hanno un ritorno che, in termini di conoscenze ed esperienze, li rende utili e fruibili anche da parte dei Paesi che li hanno promossi, finanziati e coordinati.

Controllo dell'infezione virale mediante anticorpi ricombinanti di tipo scFv diretti verso le oncoproteine del papilloma virus umano di tipo 16 (HPV16) espressi intracellularmente

I carcinomi del tratto anogenitale, particolarmente di quello della cervice, rappresentano il 12% di tutti i tumori nelle donne nel mondo. L'associazione tra il cancro della cervice e alcuni tipi di HPV, i cosiddetti "ad alto rischio", ha portato a pensare a questi virus come agenti carcinogeni. Questa associazione ha aperto nuove strade per il controllo e il trattamento di questo tipo di cancro. Con questo progetto noi proponiamo una strategia terapeutica basata sull'espressione intracellulare di anticorpi *single chain* (scFv) diretti contro le proteine oncogene dell'HPV16, E6 ed E7, e una di tipo preventivo basata su anticorpi scFv neutralizzanti contro le proteine virali L1 e L2 che compongono il capsido virale. La strategia terapeutica è stata sviluppata con successo in altri tipi di tumore. Le oncoproteine virali E6 ed E7 di HPV16 contribuiscono fortemente agli eventi che portano alla trasformazione cellulare interagendo con proteine cellulari coinvolte nella regolazione dell'apoptosi, nell'arresto della crescita, nella differenziazione cellulare e nella difesa antivirale. La possibilità di bloccare queste proteine può rappresentare un approccio interessante per alterare i processi che esse mediano. In questo quadro gli anticorpi intracellulari rappresentano un interessante mezzo.

Anticorpi neutralizzanti *single chain* potrebbero rappresentare un interessante mezzo per prevenire l'infezione *in loco*.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si propone quindi di selezionare gli anticorpi e saggiarne *in vitro* le caratteristiche in termini di stabilità, reattività con l'antigene, attività nel ridurre la proliferazione cellulare (scFv contro E6 ed E7), attività neutralizzante (scFv contro L1 e L2).

- Selezione e produzione degli anticorpi. Gli anticorpi vengono selezionati da una *library* di scFv usando come antigeni le proteine ricombinanti E6 ed E7 e pseudo-virioni prodotti *in vitro*. Alcuni scFv contro E7 sono stati già selezionati e caratterizzati ed espressi in differenti compartimenti cellulari (citoplasma, nucleo, reticolo endoplasmatico). La loro capacità di inibire la proliferazione sarà saggiata su linee cellulari derivate da carcinomi umani esprimenti le oncoproteine virali. Nel caso questo avvenga si cercherà di capire il meccanismo sottostante. Gli anticorpi più promettenti saranno saggiati per la loro eventuale capacità di inibire la crescita o ridurre un tumore HPV-correlato in un modello animale sfruttando la capacità di cellule murine ingegnerizzate per produrre E6 ed E7 e capaci di indurre tumore *in topo*.
- Per ottenere anticorpi scFv contro le proteine L1 e L2 la *library* di scFvs verrà scrinata con pseudo-virioni fornitici dal Dr. Schiller (NIH). Questi anticorpi verranno saggiati per la loro capacità neutralizzante in un sistema *in vitro*. Verranno inoltre espressi in differenti compartimenti cellulari per eventualmente essere usati per studiare il ciclo infettivo dei papillomavirus oncogeni.

Trasferibilità dei risultati

La disponibilità di anticorpi scFv specifici contro le oncoproteine virali e stabili intracellularmente potrebbe aprire la strada per una terapia genica del tumore HPV-associato. Una prospettiva di questo genere sarebbe molto importante per la cura di lesioni HPV-associate in soggetti immunodepressi per un vaccino terapeutico potrebbe non essere efficace. Per la profilassi dell'infezione da HPV sarebbe molto importante poter disporre di anticorpi neutralizzanti il virus. Questi potrebbero essere usati *in loco* per bloccare l'entrata del virus. Essendo l'infezione da HPV una infezione sessualmente trasmessa si potrebbe pensare presidi farmaceutici, tipo crema o soluzione, da usare al momento debito. Un tale procedimento potrebbe essere non costoso e quindi utilizzabile anche nei Paesi in via di sviluppo.

Convenzione tra Comune di Roma, Assessorato alle Politiche ambientali, Dipartimento X e ISS per il "Monitoraggio e controllo di *Aedes albopictus* nel comune di Roma"

Aedes albopictus, meglio conosciuta come zanzara tigre, è presente a Roma dal 1997. La specie, di origine orientale, è un potente vettore di arbovirus agenti di malattie umane e del bestiame. Recentemente nel Lazio sono stati isolati esemplari di *Ae. albopictus* naturalmente infetti con *Dirofilaria repens* e *D. immitis*. Nell'estate 2007, in provincia di Ravenna, si è verificato il primo focolaio epidemico, in Europa, di una arbovirosi trasmessa dalla zanzara tigre (Chikungunya virus).

Il progetto si propone di continuare le attività di monitoraggio (raccolta ed elaborazione settimanale dei dati sulla distribuzione e sulla densità relativa di *Ae. albopictus*) a Roma a tutto il 2011. In più, rispetto al precedente biennio, si propongono tre ricerche di campo, da condursi in città.

Il fine è quello di: i) valutare il costo/beneficio dei trattamenti antilarvali e adulticidi in termini di efficacia, aspetti economici e di possibile danno ambientale; ii) valutazione sul campo dell'efficacia e della persistenza dei prodotti larvicidi disponibili (regolatori della crescita) e messa a punto di protocolli per gli interventi adulticidi in situazioni di emergenza; iii) proseguimento dello studio della dinamica di popolazione della zanzara tigre durante i mesi più freddi dell'anno (dicembre-febbraio).

Risultati attesi nel triennio

Contenimento del problema di sanità pubblica legato alla presenza della specie infestante, riducendo la densità del vettore a livelli di buona sopportabilità. Prevenire eventuali episodi epidemici di arbovirosi (Dengue, Chikungunya).

Trasferibilità dei risultati

Disponibilità a cadenza settimanale di dati sulla presenza e abbondanza della zanzara tigre a livello territoriale dettagliato (zone Sanama) per indirizzare gli interventi di controllo routinari. Acquisizione di linee guida per fronteggiare eventuali emergenze.

Costruzione e implementazione di una rete di laboratori per la sorveglianza virologica dell'influenza, con particolare riferimento alla diagnostica dei virus influenzali con potenziale pandemico

In vista di un'eventuale pandemia, risulta particolarmente importante e urgente rafforzare la rete dei laboratori diagnostici per la sorveglianza virologica dell'influenza in Italia, affinché essa possa meglio svolgere le attività previste dal Programma della WHO in periodo interpandemico e al contempo essere utilizzata in situazioni di emergenza pandemica. Lo svolgimento del progetto, incrementando il livello di competenza tecnica dei laboratori

diagnostici per l'influenza, farà crescere complessivamente la capacità del Paese di contrastare altre malattie infettive.

Obiettivi specifici sono:

- Ampliare la copertura geografica della rete INFLUNET, in particolare nelle aree centro-meridionali.
- Validare i vecchi e nuovi laboratori della rete INFLUNET, attraverso Controlli di Qualità (QCA) in grado di verificare il loro livello di competenza tecnica per la diagnosi di virus influenzali epidemici e pandemici.
- Svolgere un programma di formazione attraverso opportuni corsi di addestramento tecnico/laboratoristico.

Risultati attesi nel triennio

Acquisire una conoscenza approfondita del livello di competenza tecnico-scientifica dei laboratori periferici afferenti all'attuale rete INFLUNET, relativamente alle loro capacità di diagnosticare virus influenzali appartenenti ai sottotipi antigenici circolanti nell'uomo in periodo interpandemico (ceppi stagionali), ma anche virus appartenenti a sottotipi circolanti in ospiti animali (con particolare riferimento alle specie aviarie sia domestiche che selvatiche), dotati di potenziale potere pandemico per l'uomo.

Identificazione di nuovi laboratori potenzialmente in grado di rientrare nel sistema di sorveglianza virologica dell'influenza, in Regioni attualmente sprovviste di strutture adeguate.

Migliorare la capacità di risposta sia degli attuali laboratori della rete INFLUNET, sia dei laboratori di nuova identificazione, in caso di emergenza pandemica.

Nell'ambito del progetto si provvederà ad una standardizzazione e armonizzazione dei protocolli tecnici da utilizzare per la diagnostica sia tradizionale che molecolare dei virus influenzali.

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).

DC e sclerosi multipla: analisi del TLR signalling e IFN signature indotte dall'EBV

Pur rappresentando la causa più frequente di disabilità nei giovani adulti, la sclerosi multipla (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. Ad oggi, circa 20 agenti infettivi sono stati associati alla SM, tuttavia solo per il virus di Epstein-Barr (EBV) è stato possibile fare un'associazione credibile con l'SM sostenuta da un numero crescente di osservazioni epidemiologiche e di studi immunologici.

L'esistenza di DC plasmacitoidi attivate nelle placche e nei tessuti linfoidi dell'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 come LSE, artrite reumatoide, psoriasi.

Risultati attesi nel triennio

Sulla base di queste premesse il nostro studio propone l'analisi comparativa del *signalling* dei TLR ragionevolmente coinvolto nella stimolazione delle DC da parte dell'EBV e della conseguente IFN *signature* in pazienti affetti da SM. L'obiettivo principale è l'identificazione di eventuali alterazioni di questi *pathway* nei pazienti SM, in relazione ai controlli sani, al fine di valutare il loro possibile utilizzo come biomarcatori dell'attività virale con valore prognostico e/o diagnostico in relazione al decorso clinico o allo stadio della malattia.

Trasferibilità dei risultati

I risultati consentiranno una migliore valutazione del ruolo di agenti infettivi e di meccanismi di disregolazione della risposta immunitaria nei pazienti con SM. Le DC e le loro modificazioni morfofunzionali rappresentano pertanto il principale oggetto del nostro studio al fine di valutare il loro potenziale coinvolgimento nell'immunopatogenesi della SM in relazione alle recenti acquisizioni sulla eziologia virale (EBV) di questa patologia autoimmune.

Development and validation of a microarray based automated diagnostic system for the detection of influenza virus types and subtypes at point-of-care – FLUARRAY

La diagnosi rapida è un elemento cruciale per il trattamento e il controllo dell'influenza, soprattutto in situazioni di emergenza pandemica. In simili scenari epidemiologici la rapida identificazione del ceppo pandemico nel primo o nei primi casi di infezione umana sul territorio nazionale, può contribuire fortemente a circoscrivere i primi focolai, prevenendo e/o rallentando la diffusione dell'infezione nella popolazione. La diagnosi rapida è inoltre uno strumento utilissimo nelle attività di sorveglianza dell'influenza stagionale, in quanto la rapida identificazione delle nuove varianti emergenti in periodo epidemico contribuisce ad un più veloce aggiornamento della composizione vaccinale. Il progetto si pone l'obiettivo di utilizzare la tecnologia del *Macroarray*, in grado di analizzare un gran numero di differenti tipi e sottotipi influenzali, la cui identificazione con i metodi tradizionali richiederebbe tempi lunghi e costi elevati. Nell'ambito del progetto sarà sviluppato un sistema di diagnosi "a letto del malato", attraverso uno strumento di facile impiego che potrà essere utilizzato anche nei piccoli laboratori, sia di medicina umana che veterinaria. La tecnologia impiegata nel progetto si basa sullo sviluppo di un saggio immunologico competitivo che sarà messo a punto nell'ambito del progetto stesso.

Risultati attesi nel triennio

Nell'ambito del progetto sarà sviluppato un saggio immunologico competitivo, che dovrà essere in grado di rilevare ogni sottotipo di Emagglutinina (HA) e di Neuraminidasi (NA) virali, estratte dai campioni clinici (tamponi faringei o rinofaringei, aspirati o lavaggi nasali, nonché, nel caso di virus circolanti in specie aviarie, tamponi cloacali o campioni di feci). Saranno identificati e caratterizzati antigenicamente e molecularmente i sottotipi virali, sia di origine umana che aviaria, più rappresentativi dei ceppi potenzialmente pandemici per l'uomo. Tali virus saranno utilizzati sia per la produzione di anticorpi monoclonali, che per la produzione di proteine ricombinanti da utilizzare nel saggio immunologico.

Trasferibilità dei risultati

Le metodiche analitiche e il dispositivo diagnostico sviluppati nell'ambito del progetto saranno messi a disposizione di selezionati laboratori periferici, per la validazione sul campo del saggio e del dispositivo stesso.

Diagnosi e patogenesi delle candidosi

Le candidosi sono in continuo aumento e variano da infezioni invasive fatali in pazienti immunocompromessi ad infezioni delle mucose che sono quasi comunemente osservate in pazienti affetti da AIDS. Le candidosi invasive rappresentano una delle maggiori cause di mortalità in pazienti immunocompromessi, come 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 maggiore del 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 in forme ricorrenti e refrattarie alla terapia antimicotica. Tuttavia la sua patogenesi e la risposta immune dell'ospite a livello vaginale non è chiara.

Gli obiettivi di questo progetto sono:

- Il miglioramento della diagnosi delle candidosi invasive.
- Lo studio della candidosi vulvovaginale.

Risultati attesi nel triennio

- Miglioramento della diagnosi delle candidosi invasive
L'evidenziamento di DNA fungino, direttamente in campioni di sangue si pone come metodica alternativa alla tradizionale emocoltura. Abbiamo messo a punto un metodo per rilevare DNA di varie specie di *Candida* in campioni biologici basato sull'amplificazione mediante PCR, *Multiplex PCR* e *Real Time PCR* con *primer* della sequenza genica di una mannoproteina di 65 Kda della parete cellulare di *Candida*. La nuova ricerca riguarderà la valutazione di queste metodiche in campioni clinici di soggetti affetti da candidosi invasiva.
- Studio della vaginite da candida
Le ricerche saranno mirate ad evidenziare i fattori di virulenza di *Candida* che possono aggredire o aggirare le difese dell'ospite. In particolare verrà seguita, durante l'infezione vaginale, con diverse metodiche (RT-PCR, *Real Time*, *microarray*) l'espressione di geni di *C. albicans* coinvolti nella regolazione dell'adesione, della secrezione di proteinasi, del dimorfismo e della formazione di biofilm. Verrà valutata la patogenicità di mutanti con i geni deleti per capire la funzione e la rilevanza dei geni identificati. Nel modello di vaginite nella ratta verranno individuati i meccanismi di protezione anti-*Candida* e i costituenti immunogenici di *Candida* potenzialmente utilizzabili in immunoterapia. Infatti, abbiamo prodotto proteine ricombinanti (proteinasi, mannoproteina) e anticorpi monoclonali da sperimentare per protezione vaccinale e/o terapeutica.

Trasferibilità dei risultati

- Miglioramento della diagnosi delle candidosi 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 immuno-modulatori di *Candida* per possibili interventi immunopreventivi e/o terapeutici, che potrebbero essere utili per la

prevenzione/controllo delle forme di candidosi vaginali refrattarie alla terapia antimicotica.

Diagnosi e profilassi dell'influenza aviaria e studio dei meccanismi di evoluzione virale e trasmissione interspecie

L'influenza aviaria rappresenta una delle principali minacce per la salute umana degli ultimi venti anni e una corretta diagnosi rapida, su tutto il territorio nazionale, rappresenta un punto critico per la salvaguardia della sanità pubblica. I meccanismi di evoluzione e adattamento virale nei vari ospiti sono ad oggi in larga parte sconosciuti e necessitano di essere approfonditi, in quanto rappresentano la base per comprendere in maniera più completa il rischio infettivo. Il primo obiettivo del progetto è la standardizzazione di metodiche molecolari per la ricerca di sottotipi di virus influenzali aviari, potenzialmente in grado di infettare l'uomo, e il trasferimento delle metodologie standardizzate ai laboratori coinvolti nella sorveglianza dei virus influenzali aviari.

La seconda parte del progetto si pone l'obiettivo di studiare i meccanismi di evoluzione virale e di trasmissione interspecie. È documentato il potenziale pandemico di alcuni virus influenzali circolanti in ospiti animali e in particolare nell'avifauna. Tuttavia il ruolo di diverse specie di uccelli (selvatici, domestici) nella emergenza di ceppi pandemici appare significativamente diverso e tale fenomeno sembra legato ai diversi processi di evoluzione molecolare a cui i virus vanno incontro in specie "serbatoio" (come gli uccelli acquatici selvatici) e specie *spill-over* (galliformi), ancora poco conosciuti.

Risultati attesi nel triennio

Messa a punto e standardizzazione di metodiche diagnostiche omolecolari per la ricerca di virus influenzali tipo A (sottotipi H5-H7-H9) e partecipazione ad un *proficiency test* finale.

Identificazione delle relazioni filogenetiche tra virus influenzali aviari circolanti in Italia e in altre aree geografiche del mondo e di eventuali fenomeni di riassortimento. Studio di varianti caratterizzate da determinanti genetici tipici di virus con provata capacità di trasmissione interspecie e/o alterata patogenicità. Valutazione dell'esistenza di fenomeni di evoluzione adattativa, per effetto della differente pressione di selezione operante in specie diverse, aviarie e non. In particolare, questi effetti saranno valutati su virus appartenenti al sottotipo H1 isolati in alcune specie aviarie selvatiche, nonché nella specie suina e nell'uomo.

Trasferibilità dei risultati

Trasferimento alle Autorità nazionali e internazionali competenti (Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, OIE, WHO, ECDC) dei dati ottenuti, con particolare riferimento a quelli relativi alla conoscenza del potenziale pandemico di alcuni virus aviari circolanti, oggetto dello studio. Diffusione delle conoscenze acquisite alla comunità scientifica. Inoltre il raggiungimento degli obiettivi proposti contribuirà ad una migliore pianificazione degli interventi preventivi sia in ambito veterinario che di sanità pubblica.

Diagnosi innovativa di infezione tubercolare attiva o latente mediante test ELISA di secrezione di citochine intracellulari

Un test ideale per la diagnosi rapida di infezione da *Mycobacterium tuberculosis* (MT) dovrebbe superare i limiti dello *skin-test* alla tubercolina e non dovrebbe richiedere l'isolamento del batterio. Il test alla tubercolina, infatti, manca di sensibilità e specificità oltre a non discriminare i soggetti infettati dai vaccinati con BCG. Recentemente la dimostrazione che le proteine ESAT-6 e CFP-10 sono antigeni altamente specifici dell'MT non essendo espressi in BCG, ha posto le basi per una diagnostica dell'infezione da MT basata sulla reattività

specifica per queste proteine di linfociti T, valutata con il metodo ELISPOT. Tale metodica si è rivelata estremamente sensibile e specifica nell'identificare soggetti infettati anche in popolazioni di soggetti HIV positivi o precedentemente vaccinati con BCG. Obiettivo finale di questo contributo è la messa a punto e validazione di un test per la diagnosi di infezione tubercolare basata sulla quantizzazione dell'IL2 e IFN-gamma secreti da linfociti T specifici per ESAT-6 e CFP-10.

Risultati attesi nel triennio

In uno studio preliminare si è potuto definire che la secrezione di IFN-gamma dopo stimolazione specifica con esat-6 e CFP10 è rivelata con una metodica citofluorimetrica che permette la contemporanea visualizzazione di cellule secernenti sia IFNgamma che IL-2 è sufficiente per identificare i soggetti venuti a contatto con *M. tuberculosis*, ma la quantizzazione di cellule secernenti IL-2 identifica fra i soggetti infettati quelli con infezione latente. Scopo di questo progetto, che rappresenta, con metodica ELISA ottenuta attraverso una modifica di quella correntemente usata per la diagnosi di infezione tubercolare, come *marker* di stato di malattia.

Trasferibilità dei risultati

Disponibilità di un test per la diagnosi rapida d'infezione tubercolare e di stato di malattia (latente o attiva) e con possibilità di discriminazione dei soggetti vaccinati con BCG. Calcolo di sensibilità, specificità valore predittivo positivo e negativo, derivati dall'analisi dei dati ottenuti su pazienti e controlli.

Pubblicazioni, comunicazioni a congressi, brevetti.

Differenziamento cellulare e virulenza nel fungo opportunisto *Aspergillus fumigatus* e nel modello fungino *Saccharomyces cerevisiae*: ruolo della proteina AFMP65p

Le infezioni delle mucose da funghi opportunisti, quali *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, sono un problema grave soprattutto in pazienti immunodepressi. Fra i fattori di virulenza fungina, va ricordato il passaggio da una forma unicellulare ad una forma filamentosa dotata di forte potere invasivo tissutale. Mutanti di *C. albicans* deleti per il gene camp65 (che codifica per una mannoproteina parietale) hanno mostrato difetti differenziativi e una ridotta virulenza in modelli animali sperimentali. L'attenzione di questo progetto è focalizzata sul gene afmp65 di *A. fumigatus*. Abbiamo clonato le 2260 bp di *Aspergillus fumigatus* contenenti il locus afmp65 e subclonato la sola porzione codificante intera afmp65cds in un apposito vettore batterico per ottenere l'espressione inducibile di una proteina ricombinate fusa all'amino-terminale con una coda di 6 istidine (r6xHIS-AFMP65p), proteina purificabile per affinità al nickel.

Nonostante la sua importanza in patologia, i meccanismi di regolazione genetica e molecolare del dimorfismo non sono ben conosciuti, anche perché gli studi di genetica molecolare in *C. albicans* e *A. fumigatus* sono resi difficili dall'assenza di ciclo sessuale. Perciò, lo studio del ruolo di AFMP65p nel differenziamento e nella virulenza potrebbe ricevere notevoli vantaggi nell'avvalersi di organismi fungini evolutivamente vicini ma più "maneggevoli" dal punto di vista genetico-molecolare, quale *S. cerevisiae*, anch'esso in grado di crescere in una forma filamentosa. Abbiamo clonato i geni SCW4 e SCW10 di *S. cerevisiae* (omologhi di Afmp65 e Camp65) e li abbiamo espressi in forma ricombinante purificabile (r6xHis-Scw4p e r6xHis-Scw10p). Infine abbiamo creato mutanti scw4- e scw10-.

Risultati attesi nel triennio

I risultati preliminari ottenuti utilizzando svariati oligonucleotidi (sintetizzati per omologia alla sequenza afmp65) in reazioni di PCR su campioni di DNA purificato da diverse specie

fungine indicano che afmp65 potrebbe rappresentare una sequenza genica utilizzabile per la diagnosi molecolare dell'infezione fungina. Le coppie di oligonucleotidi "promettenti" verranno saggiare in reazioni di PCR ampliando il numero di specie di confronto e utilizzando un ampio numero di isolati, prima di passare a saggi di sensibilità della reazione in campioni biologici simulati e ospedalieri, o a tecniche più avanzate quale la *real-time* PCR.

La proteina AFMP65p verrà studiata per le proprietà immunologiche e la capacità di conferire, ad animali da laboratorio, protezione nei confronti di una aspergillosi sperimentale. Inoltre, verranno costruiti per ricombinazione omologa ceppi mutanti afmp65- che saranno analizzati per la capacità di differenziare in senso filamentoso e di provocare infezione in modelli animali sperimentali. L'espressione e la localizzazione cellulare di AFMP65 verrà studiata utilizzando una versione della proteina fusa ad un epitopo fluorescente. Con una mutagenesi sito mirata si potrà analizzare il ruolo di specifici aminoacidi o domini di questa proteina nel differenziamento e nella virulenza fungina.

Infine, l'utilizzo di *S. cerevisiae* consentirà un approccio genetico volto a studiare la relazione tra l'espressione dei geni della famiglia mp65 e le vie di trasduzione del segnale differenziativo note (cAMP e MAPK) nonché a chiarire il ruolo delle proteine della famiglia SCWp (MP65p) nel differenziamento di *S. cerevisiae*.

Trasferibilità dei risultati

Tali ricerche permetteranno di chiarire il ruolo della mannoproteina parietale fungina AFMP65p nel differenziamento filamentoso e nella virulenza di *A. fumigatus*, un importante fungo patogeno opportunista umano. In particolare, l'utilizzo di oligonucleotidi derivati dalla sequenza afmp65 in reazioni di PCR permetterà di verificarne la validità dal punto di vista diagnostico, mentre l'utilizzo della proteina AFMP65p in vari saggi immunologici consentirà di valutarne le proprietà terapeutiche e protettive. Gli studi di mutagenesi dovrebbero indicare gli epitopi e/o domini importanti per la filamentazione e la virulenza, domini che potrebbero essere analizzati ed eventualmente utilizzati a scopo diagnostico, immunopreventivo o terapeutico. Infine l'utilizzo di *S. cerevisiae* consentirà anche di chiarire il ruolo della famiglia SCWp (MP65p) nel differenziamento fungino e la relazione tra i geni della famiglia scw/mp65 e le vie di trasduzione del segnale filamentoso che coinvolgono l'AMP ciclico (cAMP) e la cascata delle chinasi attivate da mitogeni (MAPK).

Distribuzione di infezioni da *Arbovirus* in aree sentinella e definizione dello spettro clinico

Gli ultimi 30 anni hanno testimoniato la drammatica emergenza di diverse infezioni virali "nuove" e la riemergenza di altre. Alcune di queste infezioni sono dovute ad *Arbovirus*, ovvero agenti virali che richiedono un vettore per essere trasmessi da un uomo all'altro.

In Italia, la distribuzione dei diversi artropodi, vettori di infezioni virali, è influenzata dalle condizioni climatiche che variano, a seconda dell'area geografica, da continentali a subtropicali. Di conseguenza, possono essere presenti infezioni tipiche dell'Europa centrale, come l'encefalite da zecche, così come infezioni caratteristiche dell'area mediterranea, quali quelle da virus Toscana. Inoltre, la globalizzazione e l'aumento dei movimenti di popolazione hanno contribuito a determinare una diffusione di virus esotici in aree diverse da quelle che rappresentano le nicchie ecologiche originarie di tali virus. A tal proposito, il recente focolaio epidemico di febbre Chikungunya in Romagna e i casi di *West Nile* verificatisi in Emilia-Romagna e Veneto enfatizzano la sfida e la minaccia rappresentata da arbovirus esotici.

L'obiettivo di questo progetto è quello di valutare il ruolo di *Arboviruses* endemici (ad esempio il virus Toscana o altri *Flebovirus*, e quello del virus TBE), ed eventualmente di *Flavivirus* quali il *West Nile*, in grado di provocare sporadici focolai epidemici, nelle meningiti

asettiche e/o meningoencefaliti, nonché nelle febbri di origine non nota che si presentano nel periodo estivo. A tal fine, saranno coinvolte nello studio strutture ospedaliere e medici di base delle province di Sassari e di Firenze, che provvederanno a raccogliere campioni di sangue e liquor, i quali verranno analizzati presso il nostro Istituto.

Risultati attesi nel triennio

- Verificare la distribuzione di infezioni da *Arbovirus* endemici e/o esotici in aree selezionate del nostro Paese. I metodi utilizzati saranno: ELISA per anticorpi anti-Sandfly, e IgG e IgM anti-*West Nile*; HI per TBE e *West Nile*; *Plaque Neutralization/Reduction Test* per la conferma delle reattività sierologiche; PCR per l'identificazione di sequenze genomiche virali nel liquor; isolamento virale. Tecniche di bioinformatica saranno utilizzate per analisi filogenetica ed evolutiva.
- Definire l'intero spettro clinico delle malattie da *Arbovirus*, con particolare riguardo alle infezioni da virus Toscana;
- Identificare eventuali quadri clinici attribuibili a infezioni da *Arbovirus* non endemiche nel nostro Paese.

Trasferibilità dei risultati

Trattandosi di un progetto di ricerca applicata, i risultati sono del tutto trasferibili in termini di sanità pubblica e di potenziale beneficio per il Sistema Sanitario Nazionale. In particolare, i dati generati permetteranno di informare e formare i medici sui quadri clinici attribuibili alle diverse infezioni arbovirali, endemiche e/o esotiche, in modo da facilitare il sospetto diagnostico e indirizzare la richiesta di eventuali test diagnostici. Le informazioni relative alla distribuzione delle principali infezioni endemiche potrà anche essere di rilevante importanza per la pianificazione di interventi da parte degli operatori di sanità pubblica. Infine, la sorveglianza clinica e di laboratorio delle infezioni esotiche fornirà un ulteriore bagaglio conoscitivo utile ai fini delle preparazione di interventi di caso di eventi inattesi e focolai epidemici.

EC VII F framework programme. 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 CHYK e DEN viruses.

Risultati attesi nel triennio

Saranno realizzate due strutture *ex novo*, una in Italia per l'allevamento massivo di larve di *Ae. 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 e linee guida.

Ecologia e meccanismi patogenetici di virus con ciclo naturale coinvolgente invertebrati e/o vertebrati

- Meccanismi patogenetici coinvolti nell'infezione da virus Toscana
 - Valutazione del ruolo dell'apoptosi nelle infezioni in cellule di mammifero e di artropode.
 - Ruolo delle particelle difettive interferenti nelle cellule di mammifero e di artropode persistentemente infettate con il virus Toscana.
 - Valutazione delle sottoclassi anticorpali di tipo IgA-IgE nella risposta immune contro le infezioni da virus Toscana.
 - Studio degli epitopi della proteina N del virus Toscana.
- Studio delle relazioni virus/vettore: potenzialità vettoriali e meccanismi di mantenimento
 - Valutazione della competenza vettoriale delle specie di artropodi circolanti in Italia per virus attualmente presenti o di possibile importazione
 - Valutazione dell'importanza del ruolo della trasmissione verticale nel mantenimento del virus nella popolazione competente.
- Ecoepidemiologia e studio delle forme cliniche associate a virus trasmessi da artropodi.
 - Caratterizzazione dei focolai naturali e analisi epidemiologico-molecolare degli isolati virali.
 - Ruolo degli arbovirus nei casi di malattia neurologica acuta e nelle sindromi febbrili che si verificano nei periodi di attività dei vettori.
- Patologia d'importazione: la Dengue.
 - Incidenza della malattia da Dengue in soggetti a rischio provenienti da zone endemiche.
 - Valutazione della differente risposta anticorpale nei confronti delle proteine virali in soggetti vaccinati e non contro *Flavivirus* e con sospetta Dengue.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi nel triennio sono:

- Verifica della possibilità di replicazione di particelle DI di virus Toscana in sistemi cellulari di invertebrato.
- Individuazione di epitopi della proteina N specifici per differenti *Phlebovirus*.
- Caratterizzazione della risposta immune nei confronti del virus Toscana e verifica di un eventuale diverso *pattern* di risposta nei casi di malattia acuta e nei soggetti paucisintomatici o asintomatici.
- Valutazione della efficienza della trasmissione verticale in zanzare e flebotomi infettati rispettivamente con virus Dengue e Toscana e degli effetti della temperatura su tale meccanismo di mantenimento.
- Monitoraggio dell'infezione dei vettori nei focolai e definizione di una mappa di rischio di infezione.
- Caratterizzazione biologica e molecolare dei differenti ceppi virali isolati da artropodi.
- Definizione della risposta anticorpale omologa ed eterologa verso le singole proteine virali in soggetti vaccinati contro *Flavivirus*, con o senza sospetta Dengue.

Effetti antiproliferativi della combinazione interferone e acido retinoico in cheratinociti trasformati da papillomavirus cutanei

I papillomavirus umani (HPV) sono implicati nello sviluppo di lesioni benigne e maligne della cute e delle mucose. Genotipi di HPV mucosali ad alto rischio sono gli agenti causali del carcinoma squamoso della cervice uterina mentre è stato proposto che alcuni tipi di HPV

cutanei agiscano da co-fattori nell'insorgenza del non-melanoma *skin cancer*. È stato riportato che l'interferon (IFN) e l'acido retinoico (RA) inibiscono la proliferazione di cellule tumorali tra cui linee HPV-positive, tuttavia il loro utilizzo in terapia ha dato risultati contrastanti.

Abbiamo dimostrato che il trattamento combinato IFN+RA influenza sinergicamente la crescita di linee cellulari positive per HPV di tipo mucosale mediante rallentamento della fase S del ciclo e induzione di apoptosi. Risultati recenti mostrano che la somministrazione di solo IFN in cheratinociti trasformati dalle proteine virali E6 ed E7 di HPV38 (K38) di tipo cutaneo induce senescenza. Analizzeremo l'induzione di senescenza in K38 trattati con IFN+RA attraverso analisi del ciclo cellulare, incorporazione di bromodeossiridina, conta delle cellule senescenti, espressione proteica dei marcatori di senescenza p53 e p21. Amplieremo lo studio dell'effetto antiproliferativo di IFN+RA in K38 attraverso *Real Time RT-PCR Array* in grado di rilevare geni coinvolti in senescenza, apoptosi, ciclo cellulare, trasduzione del segnale, angiogenesi e invasività. Estenderemo poi le analisi a cheratinociti trasformati da altri tipi di HPV cutanei.

Risultati attesi nel triennio

Sulla base dei nostri risultati precedenti sulle linee cellulari HPV-positive, ci aspettiamo che la combinazione IFN+RA induca senescenza nei K38 in misura maggiore rispetto al trattamento con IFN da solo ma che possano essere coinvolti *pathway* differenti. L'evidenza che la senescenza è un arresto proliferativo irreversibile indica che possa essere un meccanismo antitumorale e che l'induzione di senescenza possa rappresentare una strategia terapeutica contro il cancro. Tuttavia è stato riportato che l'induzione di senescenza è associata all'aumento di espressione di fattori coinvolti nell'angiogenesi e nell'invasività. Poiché è stato mostrato che RA regola negativamente l'espressione di alcune proteine coinvolte nell'invasività come le metalloproteinasi della matrice (MMP), ipotizziamo che la somministrazione di RA ai K38 possa determinare una diminuzione dei livelli di espressione di MMP, da noi osservati *up-regolati* nei K38 trattati con il solo IFN. Il trattamento combinato IFN+RA potrebbe quindi avere il vantaggio di determinare un incremento di induzione di senescenza senza la produzione di fattori pro-tumorali.

Trasferibilità dei risultati

Durante gli ultimi dieci anni si è osservato a livello mondiale un incremento di incidenza del non melanoma *skin cancer* (NMSC), che rappresenta circa il 30% dei tumori. La chirurgia è la terapia di elezione dell'NMSC e delle lesioni pre-cancerose. Tuttavia, soprattutto nei casi di lesioni estese, questa terapia può essere deturpante.

I risultati attesi del progetto potrebbero evidenziare l'importanza del trattamento combinato IFN+RA nella terapia dei tumori cutanei associati ad HPV e porre le basi per studi pre-clinici.

Effetti del trattamento chemioterapico sulle cellule T regolatorie: meccanismi coinvolti

Le cellule T regolatorie che giocano un ruolo chiave nello stabilire e mantenere la tolleranza immunologica sia agli antigeni *self* che non *self*, sono altresì 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. Pertanto un'inibizione del numero e/o delle attività delle cellule T regolatorie in combinazione con l'immunoterapia o la vaccinazione, aumenta la possibilità di eradicazione del tumore. È stato, altresì, riportato che il trattamento con basse dosi del chemoterapico ciclofosfamide è in grado di potenziare la risposta immune contro antigeni tumorali, ottenuta mediante vaccinazione e trasferimento adottivo di linfociti e studi recenti hanno dimostrato come il trattamento con

ciclofosfamide espliciti la sua funzione di potenziamento della risposta immune grazie all'effetto inibitorio che è in grado di esercitare sulle cellule Treg. Il trattamento con ciclofosfamide induce, oltre ad una incrementata proliferazione/attivazione e migrazione delle cellule trasferite, una massiccia produzione di citochine, tra cui IFN- γ , IL-7 e IL-15, e l'espressione di IL-7R, è stata inversamente correlata all'espressione di FOXP3 il *marker* genetico delle cellule Treg, e alla funzione soppressoria delle Treg. Noi abbiamo recentemente dimostrato che FOXP3 è negativamente regolato da un fattore di trascrizione a valle del *signaling* dell'interferone, IRF-1. Il ruolo fondamentale di tale proteina nel differenziamento, sviluppo e attività delle cellule T regolatorie è stato dimostrato *in vivo* e *in vitro* sia in cellule umane che in sistemi murini e i 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 meccanismi e dei marcatori molecolari dell'effetto del trattamento chemioterapico, combinato e non con immunoterapia, sulle cellule T regolatorie e se essi includano la modulazione di fattori di trascrizione quali IRF-1. IRF-1 può, infatti, da un lato rappresentare un "marcatore molecolare" dell'effetto della ciclofosfamide e altri chemioterapici associati, e non, con immuno-terapia e dall'altro essere utilizzato come strumento per modificare la capacità soppressoria di cellule T.

Risultati attesi nel triennio

- Misurazione del numero e attività delle cellule T regolatorie 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.
- 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 T regolatori.

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.

Effetto antiproliferativo dell'Interferon-beta in cheratinociti trasformati dalle proteine E6 ed E7 di Papillomavirus di tipo 38

I papillomavirus (HPV) sono implicati nello sviluppo di lesioni benigne e maligne della cute e delle mucose. L'espressione delle oncoproteine virali E6 ed E7 di HPV mucosali ad alto rischio è determinante nello sviluppo del carcinoma della cervice. E6 ed E7 agiscono principalmente inibendo rispettivamente p53 e pRb. È invece poco chiaro il ruolo oncogeno degli HPV cutanei rilevati in pazienti affetti da non melanoma *skin cancer*. L'HPV cutaneo 38 mostra proprietà trasformanti attribuibili alle proteine E6 ed E7. Abbiamo dimostrato che

l'interferon (IFN) beta inibisce la proliferazione di linee derivate da carcinoma della cervice positive per HPV mucosali ad alto rischio mediante il rallentamento della sintesi del DNA e l'induzione di apoptosi. In cheratinociti trasformati da E6 ed E7 di HPV cutaneo38 l'IFN beta sembra agire principalmente inducendo senescenza cellulare. Caratterizzeremo quindi l'effetto antiproliferativo dell'IFN beta in cheratinociti esprimenti E6/E7 di HPV38 mediante: analisi dell'induzione di senescenza e apoptosi in risposta all'IFN beta in cheratinociti trasformati da E6/E7 di HPV38 o di HPV16 mucosale; silenziamento di p53, p21, pRb per chiarire il relativo coinvolgimento nel programma di senescenza e analisi dell'attivazione di p53 in seguito al trattamento con IFN; silenziamento della proteina PML per determinarne il coinvolgimento nella senescenza e analisi al microscopio confocale di colocalizzazione di PML con specifiche proteine bersaglio.

Risultati attesi nel triennio

La conferma di elevati livelli di senescenza indotti dall'IFN beta in cheratinociti trasformati da E6/E7 di HPV38 e non osservata in quelli trasformati da E6/E7 di HPV16 porterebbe ad ipotizzare che la diversa risposta all'IFN possa essere dovuta al fatto che E6 di HPV38, contrariamente ad E6 di HPV16, inibisce p53 senza degradarla ma regolandone la funzione transattivante. I risultati del silenziamento di p53 e di PML, di attivazione di p53 ed eventuale colocalizzazione delle due proteine ci consentiranno di valutare se l'IFN induce la senescenza modificando lo stato di attivazione di p53 e se questo avviene direttamente o indirettamente mediante l'upregolazione di PML, che è un gene target dell'IFN e un importante coattivatore di p53. Gli studi incentrati su PML ci consentiranno inoltre di chiarire l'essenzialità di questa proteina, il cui ruolo centrale è già stato osservato nella senescenza indotta da diversi fattori in altri contesti cellulari.

Trasferibilità dei risultati

La caratterizzazione dei meccanismi molecolari mediante cui l'IFN beta induce la senescenza in cellule trasformate da E6 ed E7 di HPV38 rappresenta un importante contributo alla conoscenza del potenziale terapeutico di questa citochina per la terapia di lesioni pre-tumorali e di tumori cutanei estesi associati all'infezione da HPV.

Efficacious vaccine formulation system for prophylactic control of influenza pandemics – PANFLUVAC

Le pandemie influenzali sono un onere sia in termini di salute pubblica sia di economia nazionale, come testimoniato dalla recente emergenza nell'uomo del virus aviario H5N1, prima nel Sud-Est asiatico e successivamente in molti altri Paesi del mondo, Europa compresa. Nonostante i massicci interventi di eradicazione nella popolazione avicola i tentativi di eliminazione della circolazione virale nel pollame sono falliti e il virus è considerato ormai endemico nelle specie aviarie domestiche. Risulta quindi evidente l'importanza e l'urgenza di sviluppare in periodo pre-pandemico, un vaccino efficace contro questo ceppo virale. Il progetto PANFLUVAC si pone questo obiettivo, utilizzando diversi sistemi di somministrazione (intranasali e parenterali) e impiegando adiuvanti in grado di diminuire la dose immunogenica in termini di quantità di antigene (*Ag sparing strategy*). Il ruolo dell'ISS è stato quello di esaminare i sieri animali per verificare la risposta immunitaria mediante test sierologici quali l'emolisi radiale singola (SRH). Per valutare la sicurezza e l'immunogenicità dei vaccini intranasali e parenterali adiuvati, verrà studiata una popolazione naïve di soggetti sani nella fase I del *trial* clinico; i sieri di questi soggetti, presi prima e dopo la vaccinazione, saranno analizzati con test sierologici quali l'HI e qualora questo si dimostrasse poco sensibile, saranno testati mediante il saggio di SRH effettuato in ISS.

Risultati attesi nel triennio

Il principale risultato del progetto consisterà nell'allestimento di un vaccino pandemico, a basso dosaggio di antigene, efficace nella induzione di una risposta immunitaria protettiva nei confronti di virus influenzali potenzialmente pandemici per l'uomo. Ciò sarà reso possibile attraverso l'utilizzo di adiuvanti (ISCOM di terza generazione) e l'individuazione, in modelli animali, della migliore via di somministrazione. Ulteriori risultati riguarderanno:

- l'identificazione dei correlati immunologici della protezione per i vaccini pandemici;
- l'identificazione e standardizzazione delle tecniche sierologiche (es. SRH, MN) più adatte e riproducibili per la valutazione della risposta umorale stimolata dal vaccino così ottenuto;
- la valutazione della efficacia nell'uomo mediante *trial* clinici di fase I e II, in cui saranno considerate sia l'immunogenicità sia la protezione dall'infezione in prove di *challenge*;
- l'identificazione di adiuvanti di maggiore efficacia da utilizzare nella formulazione di vaccini pandemici.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto prevede non solo l'allestimento, ma anche la registrazione di un vaccino pandemico efficace, presso una autorità regolatoria nazionale, così da renderlo rapidamente disponibile per la produzione industriale in caso di pandemia.

L'allestimento di protocolli sierologici standardizzati per la determinazione di anticorpi antinfluenzali, in soggetti vaccinati e non, fornirà uno strumento importante sia per la corretta valutazione della immunogenicità di vaccini pandemici in generale, sia per valutare l'esposizione a virus influenzali animali di soggetti esposti ad animali infetti.

L'identificazione di nuovi adiuvanti utilizzabili nell'uomo fornirà alla comunità scientifica e all'industria un più ampio numero di strumenti per l'allestimento di vaccini pandemici efficaci.

Emerging Diseases in a changing European eNvironment (EDEN) – Sottoprogetto Leishmaniosi (EDEN-LEI): Monitoraggio e previsione dell'impatto dei cambiamenti ambientali sull'emergenza della Leishmaniosi in Italia

I flebotomi sono i vettori di *Leishmania*, protozoo causa di leishmaniosi viscerale (LV) e cutanea (LC) nell'ospite umano e nel mammifero domestico e/o selvatico. Di questo protozoo se ne conoscono più di 20 specie che solo dagli anni '80 è stato possibile identificare. In Europa la persistenza endemica della leishmaniosi da *L. infantum* nelle regioni meridionali del bacino del Mediterraneo, la presenza di *Phlebotomus sergenti* vettore di *L. tropica* agente antroponotico della LC in Medio Oriente e Nord Africa e l'assenza di un efficace sistema di controllo della malattia (es. vaccino) ha da sempre imposto un controllo continuo sulla diffusione della malattia. All'interno del progetto generale EDEN, il sottoprogetto Leishmaniosi svolge perciò un ruolo fondamentale nel migliorare e standardizzare le procedure di sorveglianza e controllo della leishmaniosi umana e canina in Europa. La definizione del ruolo dei rispettivi fattori climatici e ambientali nella diffusione dei flebotomi vettori in associazione con i dati di sorveglianza permettono di identificare i seguenti obiettivi del sottoprogetto EDEN-LEI: i) valutazione e quantificazione dei fattori globali, climatici e ambientali, determinanti nella diffusione delle varie specie e popolazioni di flebotomo vettore; ii) formulazione delle prime mappe di rischio paneuropee sulla leishmaniosi con la distribuzione delle diverse specie e ceppi di *Leishmania* causa della malattia e delle loro principali specie vettrici.

Risultati attesi nel triennio

- Elaborazione di tre database storici (2006-2009) su: i) identificazione e distribuzione delle specie e popolazione di flebotomi vettori in Italia; ii) distribuzione dei casi di LV e LC umana in Italia; iii) distribuzione della leishmaniosi canina (LCan) in Italia;

- Effettuazione di indagini mirate (2009-2010) in aree dell'Italia settentrionale per: i) identificazione e distribuzione delle specie e popolazioni di flebotomi; ii) identificazione di casi di LV e LC umana autoctoni e/o di importazione; iii) identificazione di casi di LCan autoctoni e/o d'importazione; iv) identificazione e distribuzione di specie e ceppi di *Leishmania* causa di casi di LV, LC, LCan o isolati direttamente da casi di infezione naturale del flebotomo vettore;
- Valutazione e quantificazione dei rispettivi ruoli dei fattori climatici e di modificazioni ambientali sulla diffusione e abbondanza dei flebotomi vettori e sulla distribuzione di ceppi di *L. infantum* causa di leishmaniosi umana e canina;
- Formulazione di mappe di rischio ad alta risoluzione sulla distribuzione geografica delle specie e ceppi di *Leishmania* causa di leishmaniosi umana e canina e dei loro principali flebotomi vettori in Italia.

Trasferibilità dei 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 di *marker* molecolari per studi di popolazione sui flebotomi vettori.
- Identificazione di *marker* molecolari per studi di popolazione su *L. infantum*.
- 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.

Epidemiologia di tenie appartenenti al genere *Echinococcus*

L'echinococcosi è un'infezione zoonotica causata dallo stadio larvale (metacestode) di cestodi appartenenti al genere *Echinococcus*. Lo stadio di metacestode (ciste idatidea) può svilupparsi nell'uomo (ospite aberrante) causando varie forme di echinococcosi. Questa parassitosi, che si comporta come una neoplasia a bassa malignità e a lenta crescita, può essere una malattia molto invalidante, a volte mortale o richiedere il monitoraggio clinico per tutta la vita del paziente.

Il controllo di ogni organismo infettivo richiede una approfondita conoscenza dei cicli di trasmissione e delle variabili ambientali che perpetuano la presenza dell'agente eziologico in natura. Il progetto triennale prevede lo sviluppo di tre diversi approcci al problema:

- La genotipizzazione di cisti idatidee (umane e animali) appartenenti al complesso *E. granulosus* attraverso l'utilizzo di marcatori mitocondriali (*cox1 nad1*) e del sequenziamento nucleotidico dei prodotti di amplificazione.
- L'utilizzo di microsattelliti *multilocus* come marcatori molecolari per l'identificazione dei genotipi appartenenti ad *E. multilocularis* e circolanti negli ospiti definitivi in Europa.
- L'utilizzo di Sistemi informativi territoriali (Gis) per l'identificazione, attraverso l'analisi di variabili ambientali (presenza di specie, clima, copertura vegetale), di aree idonee alla presenza di *E. multilocularis*.

Risultati attesi nel triennio

- Acquisizione di informazioni sulla prevalenza dei genotipi di *E. granulosus* negli ospiti intermedi e nei pazienti affetti da echinococcosi cistica. Le informazioni tassonomiche abbinate ai quadri clinici osservati nei pazienti affetti da echinococcosi cistica permetterà di conoscere la patogenicità di questi genotipi nell'uomo.
- I risultati dell'analisi dei polimorfismi su scala europea permetterà di chiarire l'origine dei focolai di trasmissione. Infatti l'identificazione di una popolazione omogenea di parassiti (mono od oligoclonale) supporta l'ipotesi di una recente introduzione mentre l'evidenza di polimorfismi a livello genomico rafforza l'ipotesi di una presenza nell'area sotto studio datata da tempo.
- Le mappe di rischio potenziale di distribuzione del parassita costruite attraverso base i sistemi informativi territoriali e combinate con le mappe di densità antropica, permetterà di produrre una mappa di rischio relativo per la popolazione umana di contrarre questa malattia.

Trasferibilità dei risultati

Si provvederà ad informare il personale dell'SSN dei risultati ottenuti mediante presentazioni a congressi e convegni scientifici e tramite l'organizzazione di workshop su temi specifici. Inoltre i principali e più significativi risultati del progetto saranno oggetto di pubblicazioni su riviste internazionali.

Epidemiologia e diagnostica delle zoonosi parassitarie trasmesse con gli alimenti in Europa

Le zoonosi parassitarie trasmesse dagli alimenti sono ancora presenti a livello ipoendemico o endemico nei 27 Stati membri dell'Unione Europea (UE) e il livello di endemia è fortemente influenzato dal patogeno, dal *range* di ospiti, dalle pratiche di allevamento, dallo stato socio-economico della popolazione, dalle abitudini alimentari, dal comportamento dei cacciatori e dalle condizioni ambientali. Cinque gruppi di protozoi possono essere trasmesse all'uomo attraverso il consumo di carne di diverse specie animali: *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis hominis*, e *S. suishominis*, o attraverso la contaminazione del cibo o dell'acqua: *Giardia duodenalis*, e cinque specie appartenenti al genere *Cryptosporidium*. Per il loro impatto sulla salute umana, i più importanti elminti zoonosici presenti nei Paesi dell'UE sono: *Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis*, e quattro specie del genere *Trichinella*. In aggiunta vi sono elminti trasmessi all'uomo attraverso il consumo di prodotti ittici come *Diphyllobotrium latum*, *Opisthorchis felinus*, *Pseudoterranova decipiens* e numerose specie del genere *Anisakis*, o il consumo di prodotti carnei *Taenia solium*, *T. saginata* e *T. multiceps* e, infine *Fasciola hepatica* trasmessa attraverso il consumo di vegetali crudi. Questi patogeni rappresentano ancora un problema nell'Europa comunitaria anche se il loro impatto sulla salute umana è altamente variabile da uno all'altro degli stati membri.

Scopo del progetto è l'identificazione delle aree di trasmissione, degli agenti eziologici, lo sviluppo di mezzi diagnostici, e la produzione di antigeni specifici e sieri di riferimento che vengano riconosciuti come standard internazionali.

Risultati attesi nel triennio

Standardizzazione di antigeni, sieri e ceppi di riferimento e altri prodotti per la diagnostica delle zoonosi parassitarie nell'uomo e negli animali ospiti.

Produzione e stoccaggio dei prodotti per la diagnostica non reperibili sul mercato per il loro utilizzo nell'ambito dell'SSN e per i laboratori nazionali di riferimento degli Stati membri.

Validazione delle tecniche diagnostiche sierologiche e molecolari per la diagnosi delle zoonosi parassitarie nell'uomo e negli animali ospiti.

Identificazione di marcatori molecolari della variabilità genetica dei patogeni utili alla loro tracciabilità.

Identificazione delle aree di trasmissione delle zoonosi parassitarie trasmesse con gli alimenti in Italia e nei Paesi dell'Unione Europea.

Identificazione delle specie animali che giocano il ruolo di ospiti intermedi o finali nelle varie situazioni epidemiologiche presenti in Italia e nei Paesi dell'UE.

Acquisizione di informazioni sulla prevalenza dei diversi patogeni nella popolazione umana e nelle popolazioni animali che fungono da ospiti.

Trasferibilità dei risultati

Presentazione dei risultati a congressi, workshop e meeting nazionali e internazionali.

Pubblicazioni dei risultati conseguiti su riviste scientifiche nazionali e internazionali.

Distribuzione dei prodotti diagnostici ai laboratori dell'SSN e ai laboratori di riferimento degli Stati membri.

Epidemiologia molecolare delle infezioni da virus dell'Epatite: circolazione di genotipi di HCV nei Paesi del Mediterraneo

Il progetto prevede la partecipazione del Reparto Virus epatitici. L'infezione da virus dell'Epatite C (HCV) ha una diffusione mondiale. I diversi genotipi mostrano differente patogenicità, epidemiologia e una distinta distribuzione geografica. In Egitto, il Paese con il più alto valore di prevalenza (15%), l' HCV di genotipo 4 è responsabile del 90% dei casi ed è la causa principale di malattia epatica. Negli ultimi anni si è assistito ad un incremento del genotipo 4 di HCV (prevalente nel Nord Africa) in aree del Mediterraneo dove era precedentemente considerato raro, ad esempio in Spagna, Grecia, Francia e soprattutto Italia (4,7% nel Sud e Centro). Il quadro attuale di distribuzione in questi Paesi europei è piuttosto complesso. Alcuni dati suggeriscono che il genotipo 4 si sia diffuso solo recentemente poiché è prevalente nei tossicodipendenti e negli immigrati. Tuttavia, in alcune Regioni del Sud Italia, quali la Calabria l'introduzione del genotipo 4 sembra essere più antica infatti l'infezione si osserva in soggetti anziani e provenienti da piccoli centri rimasti isolati per lungo tempo. Il progetto prevede l'impiego di metodi filogenetici ad elevata risoluzione che attraverso l'analisi di sequenze di HCV possano darci maggiori informazioni sulla storia evolutiva e sulla diffusione del genotipo 4 circolante in alcuni Paesi del Mediterraneo sia nella popolazione generale che in quella dei migranti.

Risultati attesi nel triennio

- Caratterizzazione molecolare di sequenze di HCV di genotipo 4 circolante in Calabria e in Egitto, con particolare riguardo allo studio della divergenza genetica e all'identificazione di nuovi sottotipi virali.
- Studio dell'origine del genotipo 4 di HCV in Calabria, mediante un confronto tra i virus circolanti in questa Regione e gli isolati virali di origine africana.
- Analisi filo-geografica degli isolati "locali" finalizzata a determinare la diffusione del genotipo 4 nelle varie province della Regione Calabria.
- Valutazione della circolazione di genotipi di HCV, con particolare riguardo al genotipo 4, in altri Paesi del Mediterraneo quali la Turchia.(storicamente collegata alla Regione Calabria).
- Sequenziamento del genoma completo di isolati di HCV di genotipo 4 mediante *Ultradeep Pyrosequencing* (piattaforma GS FLX).
- Stima della prevalenza dei genotipi di HCV nelle popolazioni di migranti in Italia anche in presenza di co-infezioni con HIV-1 e HIV-2.

Trasferibilità dei risultati

I risultati del progetto potranno contribuire a definire l'epidemiologia e i fattori di rischio che sono alla base della trasmissione del genotipo 4 in Europa.

Lo studio della circolazione del genotipo 4 nell'area del Mediterraneo, particolarmente nella popolazione di migranti provenienti da Paesi del Nord Africa, sarà importante per misurare e prevedere possibili variazioni nei valori di prevalenza di questo genotipo nei Paesi europei.

L'allestimento di banche dati di sequenze di genotipo 4 (soprattutto dell'intero genoma virale con tecnologia GS FLX) potrà essere utile per lo sviluppo futuro di un vaccino anti-HCV efficace e per il miglioramento della terapia anti-virale. A tale proposito è importante sottolineare che l'infezione da genotipo 4 è responsabile del 20% dei casi di Epatite C nel mondo (il 90 % in Egitto) ed è associata ad una scarsa risposta alla terapia anti-virale,

Epidemiologia molecolare di *Streptococcus pneumoniae* nell'era dei vaccini glico-coniugati

Streptococcus pneumoniae, il pneumococco, è responsabile della classica polmonite lobare, nonché di un ampio spettro di infezioni che vanno da otiti e sinusiti, a meningiti e sepsi. Il principale fattore che permette al pneumococco di causare infezioni invasive, è la presenza di una capsula polisaccaridica antifagocitaria. Gli anticorpi specifici diretti verso la capsula sono opsonizzanti e permettono la eliminazione del microrganismo. Su questa base sono stati disegnati i vaccini anti-pneumococcici oggi disponibili. Poiché per pneumococco si conoscono 91 tipi capsulari diversi è stato necessario selezionare i tipi capsulari più frequentemente responsabili di infezioni verso i quali immunizzare la popolazione. Il vaccino glicoconiugato ad uso pediatrico attualmente disponibile contiene sette tipi capsulari. Sono attualmente in fase di approvazione o registrazione altri due vaccini pediatrici che contengono 10 o 13 tipi capsulari diversi. Poiché l'utilizzo del vaccino nella popolazione modifica profondamente l'epidemiologia delle infezioni da pneumococco e i sierotipi circolanti per il fenomeno dell'immunità di gregge e del rimpiazzo o *switch* dei sierotipi con aumento assoluto delle infezioni dovute a sierotipi non vaccinali, questo progetto si propone di seguire nel tempo l'evoluzione dei sierotipi e dei cloni responsabili di infezioni invasive in Italia, con particolare riguardo ai ceppi causa di infezioni nella popolazione pediatrica ed 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 nei bambini target della vaccinazione (fino a cinque anni di età), ma anche nei bambini più grandi, per seguire il mantenimento dell'efficacia della vaccinazione e negli adulti/anziani per verificare la comparsa dell'immunità di gregge.

Risultati specifici saranno:

- Definizione del contributo dello *switch* capsulare all'aumento dei sierotipi non vaccinali, mediante studi molecolari per definire i cloni di appartenenza ed eventualmente individuare le sequenze di ricombinazione.
- Valutazione della variazione dell'antibiotico-resistenza nei ceppi responsabili di infezioni invasive, con particolare riguardo al livello di penicillino-resistenza e ai meccanismi molecolari sottostanti.
- Determinazione dei cloni circolanti, in particolare dei cloni a cui appartengono ceppi di sierotipo non vaccinale e antibiotico-resistenti, quale il sierotipo 19A, che è aumentato in seguito alla vaccinazione pneumococcica negli USA e in diversi Paesi europei.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti dal progetto potranno essere utilizzati dall'SSN e in particolare dalle Regioni per attuare o modificare le politiche sulla vaccinazione pneumococcica nell'età

pediatrica, soprattutto alla luce della futura disponibilità di nuovi vaccini che includono ulteriori sierotipi capsulari.

Informazioni sui sierotipi dei ceppi patogeni potrà contribuire a valutare la praticabilità di una vaccinazione basata su antigeni capsulari oppure riproporre l'esigenza di sperimentare vie nuove di vaccinazione. Ulteriori dati necessari per questa valutazione saranno forniti dalle associazioni sierotipo/antibiotico-resistenza/cloni. I risultati collegati con la caratterizzazione dei ceppi e cloni saranno oggetto di pubblicazione scientifica e messi a disposizione della comunità scientifica internazionale.

Espansione di linfociti T con funzione regolatoria per il controllo delle malattie infiammatorie croniche dell'intestino (MICI)

In precedenti studi, utilizzando il modello di colite sperimentale ottenuta mediante somministrazione intrarettale di acido trinitrobenzensulfonico (TNBS) in topi SJL, abbiamo dimostrato che la somministrazione orale di batteri probiotici (VSL#3) per tre settimane dopo una prima induzione di colite, era in grado di proteggere i topi da una successiva induzione di colite mediante l'induzione di cellule regolatorie. Vista la capacità dei batteri probiotici di espandere le popolazioni T regolatorie, abbiamo analizzato in dettaglio la risposta immunitaria locale alla normale flora commensale durante un transitorio aumento della permeabilità intestinale ipotizzandone un contributo al mantenimento della tolleranza orale. Il transitorio aumento della permeabilità si associa ad un significativo aumento delle cellule mucosali esprimenti TGF- β sulla superficie. Queste cellule sono specificamente indotte dalle cellule dendritiche CD11c⁺, sono IL-10 dipendenti e la loro espansione coinvolge primariamente lo stimolo attraverso il TLR2. Queste osservazioni sono particolarmente rilevanti sia per la comprensione dei meccanismi di mantenimento della tolleranza mucosale sia per la patogenesi delle MICI, e in particolare del morbo di Crohn. Nel 30% dei casi questa malattia si associa alla mutazione di NOD2, un sensore intracitoplasmatico del muramil dipeptide, prodotto di origine batterica. La mancanza di segnale attraverso NOD ha ripercussioni sul segnale indotto dal TLR2, venendo a mancare la regolazione negativa del segnale con conseguente aumento delle citochine infiammatorie. Per valutare l'effetto della mancanza di segnale NOD sulla regolazione della risposta immunitaria mucosale abbiamo intrapreso lo studio dell'effetto di un transitorio aumento della permeabilità intestinale nei topi NOD2 KO. I risultati preliminari suggeriscono che NOD2 possa influenzare anche la risposta regolatoria.

Risultati attesi nel triennio

Conoscenza dell'effetto della mutazione NOD2 sulla risposta locale alla flora commensale. Definizione dell'effetto prevalente.

Trasferibilità dei risultati

Individualizzazione dell'approccio terapeutico in pazienti con Morbo di Crohn portatori di mutazioni del gene NOD2.

European approach to combat outbreaks of *Clostridium difficile* associated diarrhoea by development of new diagnostic tools

Clostridium difficile è il principale agente responsabile di diarree nosocomiali.

Storicamente dal 3 al 5% dei casi mostravano una forma grave quale la colite pseudomembranosa ma dati recenti indicano un aumento significativo nel numero dei casi e nella gravità della presentazione più frequentemente letale. Il CDC ha allertato la comunità scientifica (*N Engl Med* 2005;353:2442-49; *CID* 2005;41; *The Lancet* 2005;366:1053) al controllo di specifici fenotipi responsabili di *outbreak* di particolare gravità. Studi precedenti del

nostro gruppo nell'ambito del Progetto europeo "Antimicrobial resistance transfer from and between Gram positive bacteria of the digestive tract and consequences for virulence" avevano messo in evidenza un polimorfismo e specifiche delezioni in un gene regolatore negativo (tcdC) presente nel *locus* di patogenicità del batterio che codifica per l'espressione delle tossine A e B, i principali fattori di virulenza di *C. difficile*. Il progetto attuale (EACCAD) svolto in collaborazione con cinque partner europei è stato finanziato dall'European Commission LSHE-CT-2006-037870 al fine di: i) caratterizzare ceppi di **C. difficile** ipervirulenti e antibiotico resistenti isolati in Europa per stabilire il ruolo della delezione nel gene regolatore, ii) definire target molecolari appropriati per test diagnostici, iii) conoscere i fattori di rischio che consentono una più elevata circolazione di ceppi ipervirulenti, iv) individuare nuove strategie per una terapia efficace anche nella riduzione delle recidive.

Risultati attesi nel triennio

I prodotti attesi dal progetto sono: la caratterizzazione dei nuovi cloni ipervirulenti circolanti in Europa; la definizione di protocolli standardizzati per i saggi di antibiotico sensibilità di *C. difficile*; la caratterizzazione dei determinanti di resistenza agli antibiotici; lo sviluppo di tecnologie diagnostiche rapide per la loro rilevazione; l'individuazione delle classi di antibiotici che costituiscono attualmente il principale fattore di rischio scatenante la malattia grave; caratterizzazione di elementi genetici mobili che trasportino specifiche resistenze associate ad altri fattori di virulenza; nuove molecole (alcune già disponibili al gruppo europeo) per controllare la malattia e le sue pericolose recidive.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti alla fine del progetto saranno trasferiti alla comunità internazionale mediante gli strumenti propri della Comunità Europea e dunque tramite pubblicazioni su riviste scientifiche *peer-review*, sito web dedicato, incontri con i responsabili della gestione dell'uso di antibiotici nelle strutture ospedaliere, brevetti di kit diagnostici per una diagnosi molecolare dei ceppi ipervirulenti.

Genomica di batteri Gram-negativi di origine nosocomiale e comunitaria: dal frammento di DNA al genoma completo

L'incidenza e la prevalenza di ceppi batterici Gram-negativi resistenti ai farmaci di nuova generazione e più efficaci da un punto di vista clinico (*Enterobacteriaceae* produttori beta-lattamasi a spettro esteso e/o resistenti ai fluoroquinoloni e patogeni opportunisti multi-resistenti come *Acinetobacter baumannii* resistente ai carbapenemici) sono in costante aumento in Europa. Questo progetto si propone di studiare i meccanismi di resistenza intrinseca e acquisita e di valutare i fattori di patogenicità di cloni prevalenti in ambito nosocomiale e comunitario. In particolare, i cloni epidemici multi-resistenti di *A. baumannii* già disponibili, provenienti da recenti studi epidemiologici effettuati in collaborazione con istituti ospedalieri italiani ed esteri, verranno sottoposti a sequenziamento rapido mediante *pyrosequencing*. La genomica comparativa tra i ceppi sensibili e resistenti e tra quelli che hanno causato malattie invasive o colonizzazioni evidenzierà le differenze genetiche potenzialmente associate a resistenza e patogenicità. Per gli enterobatteri si prevede la determinazione della sequenza di interi plasmidi di resistenza associati a resistenza ad antibiotici di rilevanza clinica per l'uomo.

Modelli animali di infezione (larve dell'insetto di *Galleria mellonella* e in seguito sistemi murini) verranno applicati mediante *gene knock out* per la verifica delle caratteristiche patogenetiche evidenziate dall'analisi genomica.

Risultati attesi nel triennio

Attraverso la determinazione della sequenza completa di ceppi particolarmente interessanti da un punto di vista clinico o epidemiologico saranno individuate caratteristiche uniche di

patogenicità, virulenza e resistenza agli antibiotici caratterizzanti quel(i) particolare(i) ceppo(i). Il numero di organismi di cui sono state determinate le sequenze genomiche è in grande aumento e questa banca di informazione serve per agevolare l'analisi mediante comparazione di genomi della stessa specie o di specie diverse, mettendo in relazione le caratteristiche particolari di un clone epidemico con quelle di ceppi non patogeni. *A. baumannii*, ad esempio, rappresenta in Italia uno dei più temibili agenti infettivi responsabili di infezioni nosocomiali caratterizzate da alti tassi di morbilità e mortalità attribuita e indiretta, ma i meccanismi di patogenesi non sono ancora noti. Il progetto include anche l'analisi degli elementi genetici mobili che attualmente rappresentano uno degli aspetti più interessanti e moderni della ricerca sulla resistenza agli antibiotici. L'analisi di questi elementi genetici permette di comprendere come si sono evoluti e continuano ad evolversi mediante l'acquisizione di nuovi geni di resistenza e di nuove combinazioni di geni.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti saranno di immediata disponibilità per l'SSN in termini di informazioni utili a monitorare l'evoluzione delle resistenze microbiche agli antibiotici e nell'individuazione dei meccanismi di virulenza e di fitness di ceppi microbici multi resistenti. Tali informazioni saranno la base per nuove ricerche e azioni concrete per la lotta a microrganismi di particolare impatto nella sanità pubblica. In particolare, saranno poste le basi per l'identificazione di nuovi bersagli molecolari da utilizzare negli screening diagnostici ma anche e per la messa a punto di strategie terapeutiche innovative e di nuovi farmaci da impiegare in combinazione con le terapie antibiotiche esistenti.

Gestione del sistema di assicurazione della qualità del Reparto di Malattie parassitarie gastroenteriche e tissutali nell'ambito delle attività condotte in qualità di Laboratorio Comunitario di Riferimento per i Parassiti (CRLP)

Il Reparto di Malattie parassitarie gastroenteriche e tissutali dal luglio 2006 è accreditato in conformità alla norma internazionale ISO/IEC 17025:2005 dal SINAL, 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 dal SINAL con cadenza annuale, il Reparto deve garantire che il sistema di assicurazione della qualità (SAQ) sia gestito, mantenuto e migliorato secondo quanto previsto dalla norma succitata. Il Reparto è stato inoltre designato dalla Commissione Europea quale Laboratorio Comunitario di Riferimento per i Parassiti (CRLP) per un periodo di cinque anni (2006-2011), con l'incarico di condurre attività specifiche e di fornire una serie di servizi ai Laboratori Nazionali di Riferimento (NRL) per i parassiti degli Stati membri, alla Commissione Europea e ai Paesi in via di sviluppo. Inoltre, il Reparto è stato designato quale NRL per la trichinellosi e come tale conduce annualmente *proficiency test* volti a verificare la competenza dei laboratori nazionali che eseguono i controlli di legge sulle carni destinate al consumo umano per accertare la presenza di *Trichinella*. Pertanto nei prossimi due anni tutte le attività che verranno condotte dal Reparto nell'ambito dei compiti istituzionali propri del CRLP (sviluppo e validazione di nuovi metodi analitici, studi collaborativi interlaboratorio, standardizzazione di metodi per la ricerca di parassiti negli alimenti, ecc.), saranno gestite conformemente alla norma ISO/IEC 17025:2005 seguendo le procedure del SAQ del Reparto, che verranno continuamente riviste ed aggiornate sulla base delle esigenze del sistema.

Risultati attesi nel triennio

La convenzione stipulata tra il SINAL e il Reparto di Malattie parassitarie gastroenteriche e tissutali, ha una durata di quattro anni e scadrà nel giugno 2010. Tale convenzione verrà rinnovata se il Reparto garantirà la gestione, il mantenimento e il miglioramento del SAQ,

secondo quanto previsto dalla norma internazionale ISO/IEC 17025:2005, condizione che verrà verificata mediante visita ispettiva condotta dal SINAL allo scopo. L'accreditamento del Reparto in conformità alla norma succitata, oltre all'eccellenza tecnico-scientifica del suo personale, è condizione indispensabile richiesta dalla Commissione Europea per la designazione del CRL per i parassiti che verrà rinnovata nel 2011. Pertanto la gestione del SAQ, volta al miglioramento continuo del sistema, dovrà conseguire come risultato il mantenimento dell'accreditamento, di fondamentale importanza per consentire al Reparto la prosecuzione delle attività istituzionali del CRLP.

Trasferibilità dei risultati

Tutte le attività condotte nell'ambito delle funzioni generali e i compiti assegnati al CRLP (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.

Host-parasite-vector interactions relevant to the transmission of Plasmodium parasite, identified by large-scale functional and proteomics approaches as targets for the control of malaria

Nell'ambito del *Call for Letters of Intent* promosso dal CNR e da Genome Canada su "Large-scale Genomics Research in Human Health", è stato presentato un progetto congiunto tra istituzioni canadesi e italiane che si propone lo studio delle interazioni ospite/parassita/vettore rilevanti per la trasmissione del Plasmodio della malaria, utilizzando approcci integrati di proteomica, trascrittomica e genomica. Le istituzioni coinvolte nel coordinamento del progetto sono l'ISS e lo *Structural Genomics Consortium* dell'Università di Toronto. Saranno inoltre coinvolte: l'Università Sapienza di Roma, l'Università Federico II di Napoli e il *Department of Pediatrics* dell'Università di Montreal. Il progetto si avvarrà della collaborazione del Prof. Glauco Tocchini Valentini (CNR) responsabile dell'*European Mouse Mutant Archive* (EMMA) di Monterotondo. Il progetto prevede la caratterizzazione della struttura e funzione di molecole e/o complessi proteici coinvolti: i) nel differenziamento delle forme sessuali del parassita nell'ospite vertebrato (gametociti) e nel rimodellamento dell'eritrocita; ii) nella regolazione della risposta immune della zanzara all'infezione; iii) nelle prime fasi di infezione degli sporozoi con attenzione alle proteine secrete dalle ghiandole salivari della zanzara e iniettate nell'ospite vertebrato.

Risultati attesi nel triennio

Definizione delle proteine specifiche dei gametociti esportate nella cellula ospite e coinvolte nel *trafficking* cellulare, nel rimodellamento della cellula ospite e nella citoaderenza.

Identificazione e caratterizzazione di geni della zanzara il cui prodotto è coinvolto nella interazione vettore/parassita.

Definizione dell'intero repertorio di proteine salivari della zanzara e dei loro polimorfismi nelle popolazioni naturali di *Anopheles gambiae*.

Determinazione della struttura di molecole chiave per la trasmissione del parassita.

Costruzione di un database integrato e sviluppo di strumenti computazionali per l'analisi dei data set prodotti nel corso del progetto.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto fornirà una caratterizzazione strutturale e funzionale di molecole dell'ospite, del parassita e del vettore rilevanti per la trasmissione del parassita. Lo sviluppo di nuovi test per monitorare la presenza di portatori di gametociti nelle aree endemiche e *marker* per valutare il livello di esposizione alle punture dell'ospite vettore. Questi strumenti potranno contribuire ad

elaborare nuove strategie di controllo della trasmissione. Saranno inoltre resi disponibili reagenti come: anticorpi monoclonali e policlonali, proteine ricombinanti.

Identification of Mechanisms Correlating with Susceptibility for Avian Influenza – IMECS

I meccanismi di immunità conseguenti da infezioni da virus influenzali aviari sono differenti da quelli conseguenti a infezione da virus influenzali circolanti nella popolazione umana in periodo epidemico. Conseguentemente, lo sviluppo di un vaccino pandemico richiede la conoscenza di meccanismi di protezione, fondamentali per una pronta risposta immunitaria.

Lo scopo del progetto, basato sulla collaborazione e interazione tra laboratori europei facenti parte di un preesistente network europeo è quello di chiarire questi meccanismi fornendo così un essenziale presupposto per lo sviluppo di efficaci vaccini pandemici. Il progetto permetterà di conoscere i correlati di protezione che faciliterà lo screening clinico di ceppi vaccinali in adulti sani e in diversi gruppi target (popolazione pediatrica e anziani). Inoltre sarà sviluppato un sistema per lo screening *in vitro* di candidati vaccinali

Risultati attesi nel triennio

Il progetto permetterà di conoscere:

- Le basi di protezione omologa e non omologa per l'influenza aviaria, in specifici gruppi target, inclusi bambini e anziani.
- La risposta specifica, dopo vaccinazione, in studi clinici nell'uomo.

Trasferibilità dei risultati

I risultati delle ricerche saranno messi a disposizione della comunità scientifica nazionale e internazionale, attraverso pubblicazioni e partecipazione a congressi. Inoltre, gli stessi risultati saranno trasferiti alle Ditte vaccinogene per l'allestimento di un efficace vaccino pandemico.

Identificazione del ruolo funzionale delle interazioni fra proteina core del virus dell'epatite C (HCV) 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 (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 target 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 del ruolo svolto dall'autofagia nel controllo dell'infezione da *Mycobacterium tuberculosis*

È noto che le cellule dendritiche (DC) e i macrofagi svolgono ruoli distinti nell'induzione e mantenimento della risposta immune contro il *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Infatti mentre i macrofagi sono principalmente coinvolti nel *killing* del tubercolare, le DC provvedono all'induzione della risposta adattativa contro questo patogeno. Sulla base di queste evidenze ci siamo recentemente domandati se un differente utilizzo dell'autofagia, una funzione primordiale preservata in tutti gli eucarioti, possa rappresentare l'elemento distintivo che caratterizza la risposta delle cellule presentanti l'antigene all'infezione del MTB.

Recentemente è stato infatti descritto che l'autofagia può svolgere un ruolo importante nel contenimento dell'infezione da MTB consentendo la degradazione degli autofagosomi contenenti il patogeno attraverso la fusione con i lisosomi. Sulla base di queste recenti osservazioni ci proponiamo di analizzare se questo processo possa essere utilizzato dai macrofagi/monociti e DC sia per controllare la replicazione del tubercolare che per rendere disponibili antigeni del MTB per la loro presentazione nel contesto del complesso MHC di classe II.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto di ricerca si propone di caratterizzare il ruolo del processo autofagico nel controllo dell'infezione da parte del *Mycobacterium tuberculosis*. A tale scopo verrà analizzata l'induzione dell'autofagia in diversi tipi di cellule presentanti l'antigene umane primarie, quali cellule dendritiche, macrofagi e monociti, successivamente all'infezione con *Mycobacterium tuberculosis*. L'impatto del processo autofagico sulla maturazione e attivazione delle cellule presentanti l'antigene verrà studiato al fine di comprendere gli effetti sull'espressione di marcatori specifici e produzione di citochine e chemochine. D'altro canto, i nostri studi prevedono anche la valutazione dell'effetto autocrino e paracrino delle citochine pro-infiammatorie, rilasciate dalle differenti cellule presentanti l'antigene successivamente all'infezione con l'MTB, sul processo autofagico. Verrà inoltre analizzato se specifici componenti della membrana e della parete del tubercolare così come alcune proteine secrete (19kDa, ESAT, CFP10 e PE_PGRS33) siano in grado di stimolare l'autofagia.

Trasferibilità dei risultati

Questi risultati consentiranno l'identificazione di nuovi target terapeutici necessari per contrastare l'infezione da MTB così come la caratterizzazione di deficit molecolari che potrebbero essere responsabili dei diversi outcome clinici della malattia.

Inoltre lo studio del processo autofagico nelle DC infettate rappresenta un aspetto critico per la definizione e il potenziamento della risposta immune “sterilizzante” sia innata che adattativa. Inoltre i nostri studi potranno fornire un modello sperimentale utilizzabile per la valutazione di farmaci o terapia capaci di modulare il processo autofagico nelle cellule presentanti l’antigene.

Identificazione di marcatori molecolari di elminti a trasmissione zoonotica

Nell’ambito delle malattie parassitarie zoonotiche trasmesse all’uomo con gli alimenti hanno un ruolo importante l’echinococcosi cistica, la trichinellosi e l’anisakiasi. Il progetto si propone di: i) sviluppare protocolli standard con certificazione di qualità, per la diagnosi specie-specifica degli agenti eziologici; e ii) sviluppare metodiche molecolari che permettano, attraverso studi di genetica di popolazione, di fare luce sulle vie di trasmissione. Pertanto si procederà allo studio della variabilità genetica delle specie/popolazioni dei parassiti ritenendo che la pluralità degli alleli individuati renderà possibile sia isolare marcatori necessari per lo sviluppo di metodi di diagnosi specifici sia ampliare le conoscenze sulla struttura genetica di popolazione. La struttura genetica delle popolazioni dei parassiti è cruciale per la comprensione della loro epidemiologia e per l’attuazione di programmi di controllo. L’efficacia di questi ultimi è necessariamente basata sulla conoscenza di parametri popolazionali tra i quali, la distribuzione geografica/ecologica delle specie e/o popolazioni, la variabilità genetica espressa dalle stesse e il livello di flusso genico esistente tra le popolazioni. I microsatelliti rappresentano un singolo *locus* indipendente, caratterizzato da ripetizioni di piccoli motivi di DNA (generalmente 1-6 bp), che possono variare per numero di ripetizioni all’interno del genoma dei singoli individui a causa di erronee duplicazioni nella fase meiotica. La differenza in numero di ripetizioni è facilmente individuabile mediante amplificazione PCR.

Risultati attesi nel triennio

- Validazione/certificazione di una metodica molecolare per l’identificazione di parassiti dei generi *Anisakis* e *Pseudoterranova* causa di patologie gastrointestinali e di tipo allergico.
- Validazione/certificazione di una metodica molecolare per l’identificazione di parassiti del genere *Echinococcus* causa di echinococcosi cistica.
- Identificazione dei genotipi di *Echinococcus granulosus*, *Anisakis spp*, *Pseudoterranova spp* e *Trichinella spp* circolanti sul territorio nazionale ed europeo.
- Valutazione della prevalenza di *Echinococcus multilocularis* nell’arco alpino.
- Identificazione di marcatori genetici polimorfici in *T. britovi*.
- Preparazione di una mappa europea della distribuzione degli alleli di *Trichinella spiralis* e *T. britovi* che identifichino gli isolati circolanti in aree geografiche definite.
- Individuazione di varianti alleliche distribuite in modo discontinuo nell’areale di distribuzione delle specie di *Trichinella spp*, che svolgono il ruolo di “marcatori di provenienza”.

Trasferibilità dei risultati

Si provvederà ad informare il personale dell’SSN e degli Stati membri dell’UE dei risultati ottenuti mediante presentazioni a congressi e convegni scientifici e tramite l’organizzazione di workshop su temi specifici. Inoltre i principali e più significativi risultati del progetto saranno oggetto di pubblicazioni su riviste internazionali e nazionali.

Identificazione di nuovi antigeni neuronali ed endoteliali e valutazione del potenziale ruolo patogenetico degli autoanticorpi verso di essi specifici nella Sclerosi Multipla

La sclerosi multipla (SM) è una patologia caratterizzata da demielinizzazione, danno assonale, perdita di cellule neuronali che causano principalmente deficit neurologici permanenti. Nonostante esistano forti evidenze riguardo il ruolo svolto nelle reazioni autoimmuni dalle cellule T dirette verso autoantigeni del sistema nervoso centrale (SNC), recenti studi focalizzano l'attenzione sul ruolo delle cellule B e degli autoanticorpi nella SM. Lo scopo di questo studio consiste nell'identificazione e nella caratterizzazione di antigeni endoteliali e neuronali di superficie riconosciuti dagli autoanticorpi presenti nel siero e/o nel liquido cerebrospinale.

L'identificazione di autoanticorpi diretti verso nuovi potenziali target neuronali ed endoteliali può far luce sui meccanismi autoimmuni che contribuiscono alla patogenesi della SM e può essere uno strumento utile per la diagnosi, la classificazione e il monitoraggio della malattia.

Risultati attesi nel triennio

L'identificazione e la caratterizzazione di nuovi antigeni neuronali ed endoteliali riconosciuti dagli autoanticorpi patogenetici potrebbero contribuire ad una migliore conoscenza dei meccanismi immunopatogenetici della SM.

Questo studio sarà effettuato utilizzando tecniche di biologia molecolare e di immunoproteomica.

Trasferibilità dei risultati

Gli autoanticorpi che contribuiscono ai meccanismi patofisiologici della SM, come la demielinizzazione, perdita neuronale e degli assoni, inibizione della rimielinizzazione e rigenerazione dell'SNC, potrebbero risultare potenziali biomarcatori della SM.

Identificazione di nuovi autoantigeni coinvolti nelle manifestazioni neuropsichiatriche nel *lupus* eritematoso sistemico e nelle patologie caratterizzate da danno endoteliale immunomediato

Il *lupus* eritematoso sistemico (LES) è una malattia autoimmune sistemica che presenta un ampio spettro di manifestazioni cliniche tra cui artrite, glomerulonefrite, vasculite, pericardite, pleurite e manifestazioni neuropsichiatriche. Le manifestazioni neuropsichiatriche sono frequenti e sono state classificate in 19 diverse sindromi dall'*American College of Rheumatology*. Il meccanismo patogenetico di tali manifestazioni è a tutt'oggi sconosciuto, ma è stata riportata un'associazione statisticamente significativa tra la presenza di manifestazioni neuropsichiatriche e alcuni autoanticorpi nel siero dei pazienti tra cui anticorpi anti-neuroni, anti-fosfolipidi, anti DNA e anti cellule endoteliali (AECA). Gli AECA sono inoltre presenti nel siero di pazienti con patologie autoimmuni e danno vascolare immunomediato come per es. vasculiti, ma l'identità degli antigeni bersaglio è a tutt'oggi scarsamente investigata. Scopo del presente progetto è l'identificazione e caratterizzazione di nuovi autoantigeni endoteliali e neuronali coinvolti nella patogenesi delle manifestazioni neuropsichiatriche in corso di *lupus*. Ulteriore scopo è la caratterizzazione di autoantigeni endoteliali in pazienti che presentano danno endoteliale immunomediato per la messa a punto di tecniche diagnostiche e prognostiche.

Risultati attesi nel triennio

- Individuazione mediante screening di librerie di espressione e analisi proteomiche di nuovi autoantigeni endoteliali implicati nei meccanismi del danno vascolare in corso di LES e di vasculiti.

- Comprensione del ruolo patogenetico degli autoanticorpi specifici sulle cellule bersaglio (induzione di apoptosi, espressione di molecole di adesione, produzione di citochine pro-infiammatorie).
- Caratterizzazione della risposta immunologica umorale e cellulare specifica per gli autoantigeni identificati, al fine di valutare il ruolo di tali risposte nella diagnosi e nel monitoraggio di pazienti con LES e di pazienti con vasculiti. Verrà inoltre valutata l'associazione tra presenza di autoanticorpi verso gli autoantigeni identificati e le manifestazioni cliniche dei pazienti.

Trasferibilità dei risultati

L'individuazione di autoantigeni riconosciuti da autoanticorpi specifici di pazienti con determinate manifestazioni cliniche in corso di LES o di vasculiti permetterebbe la messa a punto di tecniche diagnostiche più precoci, il monitoraggio dell'andamento delle manifestazioni cliniche e la prescrizione tempestiva di trattamenti terapeutici adeguati. Inoltre, la comprensione dei meccanismi patogenetici che portano all'instaurarsi di una particolare manifestazione clinica permetterebbe il disegno di approcci terapeutici volti a immunomodulare o sopprimere quella particolare risposta specifica.

Identificazione di nuovi bersagli terapeutici dell'ospite volti all'eliminazione dei *reservoir* latenti del virus HIV-1 mediante l'utilizzo di *short interfering RNA*

Il principale ostacolo all'eradicazione dell'infezione da HIV è nella presenza di *reservoir*: cellule a memoria T CD4+ *resting* e macrofagi, latentemente infettati. Queste cellule sono responsabili della persistenza del virus in presenza della terapia ART. Per queste ragioni è stato proposto che la stimolazione della fuoriuscita dell'HIV dalla latenza in presenza della terapia ART possa portare all'eliminazione delle cellule infette come conseguenza di un effetto citopatico diretto o mediante specifiche strategie terapeutiche.

La replicazione dell'HIV è inizialmente controllata a livello trascrizionale da proteine regolative dell'ospite che agiscono sul promotore virale LTR; questi fattori trascrizionali mediano la riattivazione virale da parte di stimoli dell'ospite.

L'*RNA interference* è un processo con cui RNA a doppia elica, siRNA, mediano la degradazione sequenza-specifica dell'RNA messaggero codificante per le proteine cellulari. Gli siRNA sono usati correntemente per silenziare l'espressione di specifici geni e rappresentano un approccio promettente alla terapia antivirale e di altre patologie.

Scopo del progetto:

- L'identificazione di potenziali target terapeutici rappresentati da proteine regolative cellulari in grado di inibire la riattivazione del virus dell'HIV dalla latenza.
- Lo sviluppo di tali siRNA come una nuova classe di farmaci basati sugli acidi nucleici in grado di causare la riattivazione del virus dell'HIV-1 in modelli cellulari di latenza.

Risultati attesi nel triennio

Ci attendiamo di:

- identificare una serie di siRNA efficaci nel bloccare l'espressione di quelle proteine a funzione regolativa negativa in grado di bloccare fattori di trascrizione cellulari coinvolti nella naturale riattivazione del virus dell'HIV-1 dai *latent reservoir*.
- ristimolare efficacemente la replicazione del virus HIV-1 in modelli cellulari di latenza universalmente accettati utilizzando i siRNA selezionati identificando inoltre così i migliori bersagli terapeutici.

Trasferibilità dei risultati

Si prevede di ottenere nuovi brevetti e che i siRNA sviluppati per la loro efficacia nel riattivare la replicazione di HIV dai *latent reservoir* possano essere di grande interesse per le *biotech company*.

Identificazione e analisi strutturale delle tRNA sintetasi in Plasmodia

Le aminoacil-tRNA sintetasi (AARs) sono gli enzimi responsabili del “caricamento” dell’aminoacido al corrispondente tRNA. La struttura di queste proteine è costituita da un dominio catalitico dove avviene il legame con l’ATP e l’aminoacido e da un dominio di riconoscimento dell’anticodone del tRNA. Le AARs e i processi biologici in cui esse sono coinvolte sono stati e continuano ad essere oggetto di moltissimi studi sia in cellule procariotiche che eucariotiche. Tuttavia poco è ancora noto di queste enzimi nei parassiti malarici. Il progetto FP7 MEPHITIS coinvolge otto gruppi di ricerca (europei ed extraeuropei) che studieranno e le AARs in *Plasmodium* sotto molteplici punti di vista. Il nostro gruppo è coinvolto nella caratterizzazione di questi enzimi sia da un punto di vista evolutivo che strutturale. Per fare questo verranno utilizzati metodi di biologia computazionale.

Risultati attesi nel triennio

Identificazione tramite costruzione di *Hidden Markov Model* delle AARs in diverse specie di *Plasmodium*.

Filogenesi delle AARs di *Plasmodium*.

Caratterizzazione di eventuali domini specifici delle proteine di *Plasmodium*.

Costruzione di modelli strutturali delle AARs di *P. falciparum*.

Trasferibilità dei risultati

Lista delle AARs in Plasmodia. Modelli 3D delle AARs di *P. falciparum*. Software per il confronto delle superfici di proteine omologhe.

Identificazione e caratterizzazione di elementi genetici portatori di geni di antibiotico-resistenza in streptococchi e enterococchi

Gli elementi genetici che portano geni di resistenza agli antibiotici contribuiscono in maniera rilevante alla diffusione della multiresistenza nei batteri. A differenza dei singoli geni di resistenza, gli elementi che li portano raramente sono studiati. Il progetto prevede l’identificazione e la caratterizzazione di elementi genetici di resistenza in streptococchi e enterococchi e l’epidemiologia molecolare di questi elementi. Saranno esaminati ceppi da un’ampia collezione presente in ISS e ceppi raccolti nei prossimi tre anni nell’ambito di sorveglianze nazionali o di collaborazioni internazionali. I ceppi multiresistenti saranno tipizzati e sarà esaminata l’associazione fisica tra i geni di resistenza. Nel caso di associazioni di geni già riportate in letteratura, si procederà a definire l’organizzazione genetica degli elementi mediante confronto con quelli noti. Nuove associazioni di geni o non corrispondenza con elementi già descritti indicherebbero la presenza di nuovi elementi genetici. L’organizzazione di questi elementi potrà essere definita mediante sequenziamento realizzato con la tecnologia del *Pyrosequencing* applicata al frammento genomico che include l’intero elemento, identificato dopo restrizione del DNA, elettroforesi in campo pulsato, *Southern blotting* e ibridazione. Mediante saggi di coniugazione potrà essere esaminata la trasferibilità degli elementi genetici come potenziale contributo alla diffusione intraspecie e interspecie dell’antibiotico-resistenza.

Risultati attesi nel triennio

Da questo studio si potrà ottenere un quadro completo non solo dei geni di resistenza agli antibiotici ma anche degli elementi genetici presenti nei ceppi multiresistenti. La tipizzazione

molecolare dei ceppi mediante *Multi Locus Sequence Typing* consentirà di identificare i cloni di appartenenza. La relazione tra gli elementi genetici presenti e i cloni identificati potrà dare indicazione di una eventuale associazione tra elementi di resistenza e diffusione clonale, confrontabile con la diffusione della multiresistenza in altre parti del mondo. I risultati, essendo ottenuti dallo studio di un'ampia collezione di ceppi, consentiranno di creare un catalogo dei geni e degli elementi genetici di resistenza presenti in streptococchi ed enterococchi. Sulla base di tutte le possibili associazioni dei geni di resistenza presenti negli elementi, sarà possibile allestire saggi di PCR specifici.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questo progetto saranno trasferiti alla comunità scientifica mediante pubblicazioni su riviste nazionali e internazionali, rappresentando un utile contributo agli studi sulla diffusione dell'antibiotico-resistenza e in particolare della multiresistenza. L'allestimento di saggi di PCR mirati all'analisi dell'associazione fisica dei geni di resistenza permetteranno una rapida identificazione degli elementi genetici portati dai batteri circolanti. Attraverso l'epidemiologia molecolare degli elementi di resistenza si avranno dati sulla epidemiologia dei ceppi multiresistenti e in particolare dei cloni multiresistenti che circolano in Italia, con possibilità di un confronto con cloni multiresistenti a diffusione globale.

Identificazione e caratterizzazione di proteine interattrici delle 14-3-3 di parassiti del phylum Apicomplexa quali possibili bersagli molecolari per lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche

Il phylum Apicomplexa comprende oltre 5.000 protozoi parassiti endocellulari. Tra cui *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* e *Cryptosporidium spp.* Il controllo di queste parassitosi è reso problematico dalla scarsità e/o assenza di farmaci efficaci, sviluppo di farmacoresistenza e dalla mancanza di vaccini. È quindi fondamentale comprendere i meccanismi molecolari che regolano l'interazione di questi patogeni con l'ospite. Proteine chiave delle vie di trasduzione del segnale, quali protein chinasi e fosfatasi, sono state individuate quali potenziali bersagli di nuovi antiparassitari. In questo panorama, rivestono un ruolo interessante le 14-3-3, una famiglia di proteine eucariotiche dimeriche. Ciascun monomero, di circa 30 kDa, è in grado di legare sequenze specifiche, contenenti fosfoserina/fosfotreonina, presenti nelle proteine bersaglio. Le 14-3-3 partecipano alla regolazione di processi quali il ciclo cellulare, la trasduzione del segnale, il differenziamento, il metabolismo primario e il traffico intra/extracellulare delle proteine, agendo da molecole effettrici e modulando l'azione delle protein chinasi e protein fosfatasi. Studi preliminari sono stati condotti sull'espressione delle 14-3-3 in *Plasmodium spp.*, e in *T. gondii*. Un vaccino basato sulle 14-3-3 è stato proposto per il trattamento della schistosomiasi.

Risultati attesi nel triennio

Il presente progetto si prefigge quattro obiettivi principali:

- Caratterizzazione e regolazione delle proteine 14-3-3 (trascrizione genica, espressione della proteina, modificazioni post-traduzionale e localizzazione intra/extracellulare) nei diversi stadi del ciclo vitale dei parassiti del genere *Plasmodium* (*P. falciparum* e *P. berghei*), di *T. gondii*.
- Identificazione delle proteine interagenti con le 14-3-3 e definizione, *in vitro* e *in vivo*, le modalità delle associazioni più rilevanti in fasi significative del loro ciclo vitale di ciascun parassita (es. stadi in cui la proteina è maggiormente espressa).
- Individuazione, mediante analisi seriali, di molecole in grado di inibire l'attività e/o modulare l'affinità delle 14-3-3 con le proteine bersaglio.

- Risolvere la struttura cristallografica delle 14-3-3 di *Plasmodium spp.* e di *T. gondii* per individuare epitopi immunologicamente rilevanti e definire meccanismi di legame unici attraverso co-cristallizzazione della 14-3-3 con fosfopeptidi sintetici e/o le proteine bersaglio. Gli studi biochimici saranno direttamente condotti su *T. gondii*, mentre per il genere *Plasmodium* si ci avvarrà di *P. berghei*, agente eziologico della malaria murina. Entrambe gli organismi sono manipolabili geneticamente e coltivabili su scala adeguata. I dati acquisiti saranno applicati allo studio di *P. falciparum* e, in parte, di *C. parvum*.

Trasferibilità dei risultati

Il presente progetto, che si configura come ricerca di tipo innovativo, risulta di rilevante interesse sia in campo medico che in campo veterinario. Infatti, lo studio trasversale di una proteina altamente conservata e multifunzionale, quale la 14-3-3, in diversi patogeni del *phylum Apicomplexa*, offre la possibilità di identificare e definire il ruolo di proteine parassitarie la cui funzione può risultare fondamentale per l'instaurarsi e/o il progredire dell'infezione. Lo studio condotto fornirà il punto di partenza per la messa a punto di vaccini e l'identificazione di composti farmacologici in grado di alterare la funzione delle suddette proteine. I risultati potranno quindi essere trasferiti in ambito veterinario, in special modo per la prevenzione della toxoplasmosi negli animali da reddito. A lungo termine, sarà possibile sviluppare opportune terapie, farmacologiche e/o vaccinali, per la profilassi e il trattamento di tali infezioni nell'uomo. Si provvederà ad informare il personale dell'SSN dei risultati ottenuti mediante presentazioni a congressi e convegni scientifici e tramite l'organizzazione di workshop su temi specifici. Inoltre i principali e più significativi risultati del progetto saranno oggetto di pubblicazioni su riviste internazionali e nazionali.

Identificazione e caratterizzazione molecolare di nuove proteine espresse nello stadio di oocisti/sporozoita del protozoo parassita intracellulare *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii è un protozoo parassita intracellulare del *Phylum Apicomplexa*. È causa di aborto o gravi anomalie fetali, e, nei soggetti immunocompromessi, di encefaliti spesso mortali. L'assenza di un vaccino e la frequente inefficiacia dei farmaci suggeriscono di espandere le conoscenze sulla biologia di *T. gondii*, onde poter sviluppare nuove strategie di controllo. Il progetto mira allo studio di nuove proteine del parassita espresse nello stadio di oocisti/sporozoita, responsabile della trasmissione ambientale della toxoplasmosi, ma poco caratterizzato a livello molecolare. Il lavoro sarà incentrato su due classi di proteine, quelle della famiglia LCCL – dal nome del dominio *Limulus coagulation factor C* (LCCL) – espresse nello sporozoita, e quelle che costituiscono la parete dell'oocisti (OWP, *oocyst wall protein*). Abbiamo recentemente identificato le sette proteine LCCL di *T. gondii*, aventi in comune un peptide segnale N-terminale, uno o più domini LCCL e varie combinazioni di domini coinvolti nel riconoscimento di zuccheri, lipidi o proteine. Per la loro natura di adesine extracellulari e in base a recenti dati sugli ortologi di *Plasmodium*, le proteine TgLCCL si candidano ad un ruolo importante nell'interazione parassita-ospite, che questo progetto si propone di chiarire. Per quanto riguarda le proteine TgOWP, ad oggi ignote, gli obiettivi consisteranno nella loro identificazione bioinformatica e nel clonaggio dei relativi geni e loro prodotti. L'interesse per le TgOWP deriva dal ruolo essenziale svolto nel preservare il parassita nell'ambiente e dalla possibilità di utilizzarle come antigeni in studi sieroepidemiologici o per lo sviluppo di anticorpi monoclonali per saggi di cattura delle oocisti nelle acque.

Risultati attesi nel triennio

- Obiettivo 1: studio della famiglia proteica TgLCCL di *Toxoplasma gondii*
 - Definizione del profilo di espressione dei sette geni TgLCCL in diversi stadi invasivi.

- Clonaggio dei cDNA codificanti dell'intera famiglia TgLCCL.
- Produzione in batteri di frammenti ricombinanti delle proteine TgLCCL.
- Produzione di antisieri murini e di coniglio diretti contro le diverse proteine TgLCCL.
- Caratterizzazione biochimica delle proteine TgLCCL tramite *western blot*.
- Localizzazione delle proteine TgLCCL tramite immunofluorescenza indiretta.
- Produzione di mutanti *knock-out* di *T. gondii* mancanti di uno o più geni TgLCCL.
- Analisi fenotipica dei mutanti *knock-out*.
- Valutazione delle proteine TgLCCL quali bersagli della risposta umorale.
- Obiettivo 2: studio delle proteine della parete dell'oocisti di *Toxoplasma gondii* (TgOWP)
 - Identificazione di putative proteine della parete dell'oocisti di *T. gondii* tramite analisi bioinformatica della banca dati ToxoDB.
 - Analisi dell'espressione degli mRNA corrispondenti nello stadio di oocisti.
 - Clonaggio dei cDNA delle putative proteine TgOWP.
 - Espressione di frammenti ricombinanti delle proteine TgOWP e produzione di anticorpi policlonali in topo e coniglio.
 - Caratterizzazione biochimica delle proteine TgOWP tramite *western blot* su lisati totali di oocisti.
 - Localizzazione delle proteine TgOWP tramite immunofluorescenza indiretta.
 - Produzione di anticorpi monoclonali specifici per una o più proteine TgOWP.
 - Definizione del profilo della risposta anticorpale diretta contro le proteine TgOWP in sieri di animali infettati sperimentalmente e di soggetti *Toxoplasma*-positivi.

Trasferibilità dei risultati

La caratterizzazione di due nuove famiglie proteiche di *Toxoplasma gondii* espresse nello stadio di oocisti/sporozoitia ha la potenzialità di espandere significativamente le attuali conoscenze di base su questo parassita, nonché di: i) 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; ii) identificare nuovi bersagli molecolari per lo sviluppo di un vaccino per uso umano; iii) consentire la produzione di anticorpi monoclonali specifici per la parete dell'oocisti di *Toxoplasma gondii* su cui basare un test di cattura immuno-magnetica per l'identificazione di oocisti disperse nell'ambiente, in particolare nelle acque, oppure un test per la ricerca di oocisti tramite immunofluorescenza indiretta da applicare a reperti ambientali, di cibo o campioni fecali felini.

Immunità e infezioni nell'ospite immunocompromesso per stile di vita: evidenze sperimentali e implicazioni terapeutiche

I soggetti immunocompromessi per stile di vita, quali gli alcolisti, sono caratterizzati da una disregolazione del sistema immunitario e quindi da una maggiore suscettibilità all'insorgenza di varie patologie tra cui le malattie infettive (in particolare polmonari). I meccanismi che determinano tale disregolazione immunitaria non sono ancora del tutto chiari. Obiettivi del progetto sono: i) Valutazione dell'immunità innata e adattativa verso *M. tuberculosis* e *S. pneumoniae* in soggetti alcolisti cronici. Le cellule del sistema immunitario ottenute da soggetti alcolisti e da donatori sani saranno esposte *in vitro* a ceppi batterici e loro derivati e caratterizzate fenotipicamente e funzionalmente. Per valutare l'effetto dell'esposizione acuta all'alcol, cellule di donatori sani verranno pre-trattate *in vitro* con etanolo e poi stimulate con antigeni batterici. In tali cellule verranno valutate possibili alterazioni a carico delle vie di trasduzione del segnale. ii) Valutazione dell'efficacia di strategie adiuvanti ad uso umano. Verranno messi a punto modelli animali di infezione associata ad abuso di alcool. In tali modelli

sperimentali e in sistemi cellulari in vitro verrà valutato l'effetto di terapie con molecole adiuvanti e immunomodulatorie.

Risultati attesi nel triennio

I nostri studi permetteranno di: i) conoscere i meccanismi responsabili della ridotta capacità dell'ospite immunocompromesso dall'abuso di alcol a sviluppare una risposta immunitaria efficace verso *M. tuberculosis* e *S. pneumoniae*; ii) valutare l'effetto di una esposizione acuta all'alcol su fenotipo e funzioni di cellule del sistema immunitario; iii) identificare molecole in grado di modulare l'attivazione delle cellule del sistema immunitario, con particolare riguardo alle cellule dendritiche, e ripristinare la loro capacità di montare una risposta immunitaria efficace.

Trasferibilità dei risultati

Il trattamento delle infezioni polmonari è basato sulla terapia antibiotica. Tuttavia, a causa dell'aumento di ceppi farmaco-resistenti, tale terapia sta diventando sempre più problematica, soprattutto negli ospiti immunocompromessi. Inoltre va considerato il potenziale epatotossico della chemioterapia antibatterica, soprattutto dei farmaci antitubercolari, particolarmente nei pazienti alcolisti in quanto l'alcolismo rappresenta uno dei principali fattori clinici di rischio per l'epatotossicità.

I nostri studi permetteranno di mettere a punto strategie adiuvanti per il trattamento delle infezioni polmonari e per aumentare l'efficacia di preparazioni vaccinali in soggetti immunocompromessi dall'abuso di alcool.

Immunità e infezioni nell'ospite immunocompromesso per stile di vita: evidenze sperimentali e implicazioni terapeutiche

L'abuso cronico di alcol è associato ad infezioni paradontali di *Porphyromonas gingivalis* che possono essere correlate ad un elevato rischio di sviluppare patologie cardiovascolari. A tutt'oggi non sono stati ancora definiti i meccanismi attraverso i quali l'infezione di *Porphyromonas gingivalis* possa portare ad un rischio più elevato di sviluppare una patologia cardiovascolare. Mediante un'analisi in banche dati delle sequenze aminoacidiche delle proteine di tale batterio, abbiamo recentemente identificato significative omologie di sequenze tra alcuni peptidi di *Porphyromonas gingivalis* e peptidi della regione extracellulare del *toll-like-receptor 4* (TLR4). Pertanto possiamo ipotizzare un meccanismo di mimetismo molecolare mediante il quale anticorpi specifici per *Porphyromonas gingivalis* possano crossreagire con componenti *self* e portare all'infiammazione e ispessimento dell'arteria.

Risultati attesi nel triennio

Questo studio permetterà di valutare la presenza di anticorpi verso il *Porphyromonas gingivalis* e in particolare verso i peptidi del batterio che presentano omologia di sequenza con il TLR4 umano in popolazioni di pazienti immunocompromessi con e senza malattie cardiovascolari. Verrà poi valutata la capacità degli anticorpi umani specifici per tali peptidi di *Porphyromonas gingivalis*, di legare e attivare il TLR4 in linee di cellule endoteliali umane.

Trasferibilità dei risultati

L'identificazione di peptidi di *Porphyromonas gingivalis* coinvolti nell'attivazione del TLR4 permetterà di sviluppare approcci terapeutici basati sulla somministrazione di peptidi bloccanti.

Immunogenicity of Mycobacterium tuberculosis lipids in the non replicating status of latency (MILD-TB)

La base scientifica di MILD-TB si fonda sulla convinzione che il principale strumento del *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) per evadere la ricognizione da parte del sistema immunitario

dell'ospite è quella di passare da uno stato replicativo tipico dell'infezione acuta ad uno stato non replicativo (dormienza) nel quale può persistere nell'organismo di una persona infetta in forma latente. In tale fase di dormienza il batterio non produce più la maggior parte dei suoi componenti strutturali e cambia il suo metabolismo. In tal modo il sistema immunitario dell'ospite non viene adeguatamente attivato e il bacillo persiste fino a quando le condizioni di salute del paziente non cambiano a favore del batterio. In tal modo Mtb può riattivarsi e determinare una malattia severa e ingravescente con la possibilità di infettare altri individui attraverso la formazione di lesioni aperte. Dunque la possibilità di identificare delle strategie che permettano di eradicare l'infezione durante il primo contatto impedendo che il batterio diventi latente o individuando degli antigeni tipici della fase di dormienza in modo da uccidere i batteri dormienti, rappresenta una forma intervento immunitario che potrebbe permettere di superare le limitazioni dell'attuale strumento vaccinale, ovvero il BCG.

Risultati attesi nel triennio

Dal momento che Mtb è composto per più del 60% del suo peso secco da lipidi e che alla struttura lipidica deve molto della sua resistenza all'ambiente e acido-base resistenza, nonché al fatto che durante la fase di latenza il Mtb cambia il proprio metabolismo in senso non-glicolitico utilizzando i lipidi come principale fonte di energia per la sua sopravvivenza in fase dormiente. Scopo di MILD-TBV è quello di identificare delle strutture lipidiche che possano essere utilizzate come nuovi antigeni per la eradicazione del Mtb. Per tale ragione verranno isolati lipidi da batteri in fase replicativa e da batteri in fase di latenza ottenuti *in vitro* con un modello che riproduce *in vitro* condizioni ipossiche *in vivo*. I lipidi isolati verranno comparati per selezionare quelli che sono specifici per la fase di dormienza e questi ultimi verranno utilizzati per studiarne l'antigenicità e la capacità modulatoria sulla risposta immunitaria. Lo studio della capacità di pazienti in diverse fasi di malattia, insieme a studi *in vitro*, potrà permettere di identificare quei lipidi che potrebbero avere un ruolo nella diagnostica e nella immunoterapia innovativa di infezioni tubercolari latenti.

Trasferibilità dei risultati

- Aumento di conoscenze
- Identificazione di antigeni utili per kit diagnostici e formulazioni vaccinali
- Strategie di immunointervento.

Impatto della risposta immunitaria dell'ospite sulla replicazione di *Listeria monocytogenes*

La listeriosi è definita "malattia alimentare atipica" in quanto causa infezioni estremamente gravi con il più alto tasso di ospedalizzazione (90,5% dei casi) e ad elevata letalità (20-30%) in alcune fasce di popolazioni a rischio come soggetti immunocompromessi, bambini, anziani e donne in gravidanza. Si pensa, tuttavia, che questi dati siano sottostimati visto che nell'uomo *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) determina quadri sintomatologici differenti, non sempre correttamente diagnosticati. È comunque importante sottolineare che mentre nei soggetti adulti sani *L. monocytogenes* può determinare una sindrome gastroenterica febbrile, nei pazienti immunodepressi la sintomatologia è prevalentemente neurologica e occasionalmente l'infezione ha decorso iperacuto ad esito letale. Questo quadro suggerisce che l'interazione che si stabilisce tra patogeno e il sistema immunitario dell'ospite gioca un ruolo decisivo sull'evoluzione dell'infezione. Il progetto si propone di identificare come la risposta immunitaria dell'ospite può modulare la replicazione di *L. monocytogenes* al fine di comprendere i meccanismi di immunoevasione utilizzati dal patogeno capaci di influenzarne la patogenicità soprattutto nei soggetti immunocompromessi, tra cui gli individui anziani rappresentano un target di particolare rilevanza.

Risultati attesi nel triennio

Risultati preliminari ottenuti indicano che il fattore B *lymphocyte-induced maturation protein 1* (BLIMP1), un fattore trascrizionale considerato *master regulator* del differenziamento delle cellule B e dell'attivazione delle cellule T, viene indotto nei macrofagi murini successivamente all'infezione con *L. monocytogenes*. Una diminuzione nella replicazione di *L. monocytogenes* è stata osservata in fibroblasti embrionali murini deficienti in BLIMP1 suggerendo che l'induzione di BLIMP1 potrebbe rappresentare un meccanismo attraverso il quale *L. monocytogenes* modula la risposta immunitaria dell'ospite. Sulla base di queste evidenze il nostro progetto intende analizzare il ruolo di BLIMP1 nell'infezione da *L. monocytogenes* comparando le risposte in macrofagi e cellule dendritiche umane. Inoltre, in funzione dei risultati che si otterranno, verrà anche valutato l'effetto del silenziamento di BLIMP1 attraverso siRNA sulla replicazione di *L. monocytogenes*. Studi di espressione di BLIMP1 verranno anche condotti sul sangue periferico di pazienti anziani immunosoppressi dopo stimolazione *in vitro* con *L. monocytogenes* e ceppi attenuati nel tentativo di chiarire il ruolo di BLIMP1 nella suscettibilità e nell'evoluzione dell'infezione da *L. monocytogenes*.

Trasferibilità dei risultati

Identificazione dei fattori cellulari che influenzano la patogenicità di *L. monocytogenes* in pazienti immunosoppressi.

Individuazione di bersagli e strategie terapeutiche per patologie croniche e immunodisregolative ad alta prevalenza

Obiettivo principale del progetto è definire terapie innovative utilizzabili a breve e medio termine dall'SSN, in pazienti affetti da patologie croniche e/o autoimmuni provocate da infezioni croniche o su base allergica. Tale progetto si è articolato in quattro WP che concorrono alla definizione dei meccanismi patogenetici (WP1) su cui è possibile intervenire con terapie verso target molecolari (WP2) e cellulari (WP3) e quindi saggiare tali approcci terapeutici in modelli sperimentali animali o *ex vivo* (WP4). L'insieme dei risultati sta consentendo la comprensione dei meccanismi molecolari e cellulari alla base del processo infiammatorio e di rottura della tolleranza immunologica al fine di individuare nuovi farmaci e/o bersagli terapeutici in grado di interferire anche a livello intra-cellulare con i processi responsabili dell'instaurarsi della patologia in esame utilizzando terapie immunologiche cellulari e molecolari basate sull'immunomodulazione e sull'utilizzo di peptidi bloccanti, anticorpi monoclonali bloccanti, farmaci inibitori di COX-2, vitamina D3 ed RNA interferenti. Il progetto è composto da nove UO. Le attività delle UO sono armonizzate in quattro WP.

Risultati attesi nel triennio

In dettaglio per WP il progetto si propone di:

– WP1

Identificazione di autoantigeni mediante screening di librerie di espressione; valutazione della presenza nei pazienti di risposte immuni cellulari e umorali verso gli autoantigeni; nuovi strumenti terapeutici basati sulla modulazione o il blocco di risposte immunitarie specifiche. E in particolare dell'asse IL-12-23/IL-17 utilizzando anticorpi monoclonali neutralizzanti (anti-IL-12/IL-23, anti-IFN γ , anti-IL-10) per interferire con l'eventuale determinarsi di condizioni atte a espandere cellule Th-17 presumibilmente coinvolte nella patologia della sclerosi multipla (SM). Inibitori molecolari specifici delle vie di traduzione dei segnali intracellulari identificati da saggiare *in vitro*.

– WP2

Ruolo della leptina nell'insorgenza delle patologie autoimmuni e nella individuazione di nuovi bersagli terapeutici. Trasferimento delle conoscenze acquisite sulla Pentraxina nel

contesto clinico di patologie infettive ed infiammatorie croniche con scopo diagnostico e terapeutico.

– WP3

Aumento delle conoscenze sul ruolo dei linfociti Tgamma/delta e della loro interazione con le DC nella risposta infiammatoria cronica tipica della SM; fornire il razionale per l'utilizzo degli analoghi della vitamina D3 come agenti terapeutici per il trattamento di questa patologia e per l'utilizzo del *cross-talk* DC/cellule Tgamma/delta come bersaglio specifico di tali agenti. Sviluppo di reagenti come vettori lentivirali e retrovirali esprimenti siRNA in grado di reprimere l'espressione di un gene modulatore del differenziamento di DC e T regolatorie. Preparazione *ex vivo* di cellule da utilizzare in immunoterapia sia per patologie autoimmuni che cronico-infiammatorie.

– WP4

Nuovi strumenti terapeutici per il controllo delle patologie croniche su base allergica e autoimmune. Tali strumenti comprendono batteri probiotici e loro componenti, tossoidi di batteri patogeni, antigeni e prodotti di parassiti elmintici, nuove molecole ipoallergeniche, e hanno in comune una attività immunomodulatoria connessa alla capacità di agire su cellule dendritiche e di indurre cellule T regolatorie.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto si propone di originare tre tipi di risultati o prodotti potenzialmente trasferibili alla clinica e all'SSN a breve-medio termine:

- Nuovi strumenti terapeutici per il controllo delle patologie basate sulla infiammazione cronica e disregolazione del sistema immunitario e sulle complesse interazioni tra sistema immunitario e stimoli da parte di agenti infettivi. Tali strumenti comprendono batteri probiotici e loro componenti, tossine e tossoidi di batteri patogeni, antigeni e prodotti di parassiti elmintici, nuove molecole ipoallergeniche, anticorpi bloccanti e molecole interferenti i *pathway* di attivazione che hanno in comune una attività immunomodulatoria connessa alla capacità di agire su DC e di indurre Treg eTgd.
- Approfondimento delle conoscenze sui meccanismi patogenetici del danno in corso di malattie infiammatorie croniche ed autoimmuni, con particolare attenzione al ruolo di antigeni microbici o di loro recettori, al fine di ottimizzare le scelte di antigeni vaccinali e di disegnare strategie terapeutiche con sostanze immunomodulatorie o bloccanti dei recettori.
- Definizione di parametri e di linee-guida per la selezione dei pazienti e il loro indirizzo alla strategia terapeutica più vantaggiosa.

Indicatori: Pubblicazioni, Presentazioni a congressi nazionali e internazionali, Brevetti, Contatti con industrie farmaceutiche per sperimentazione pre-cliniche/cliniche.

Infezioni croniche e mimetismo molecolare implicati nei processi patogenetici in infezioni a livello polmonare e gastroenterico: nuove strategie terapeutiche

Il progetto intende identificare componenti di superficie dei batteri che presentino una valenza patogenetica nei confronti dell'ospite. La presenza all'interno delle placche aterosclerotiche di *Chlamydia pneumoniae* (CP) è stata dimostrata e questo suggerisce il coinvolgimento di potenziali target microbici nell'attivazione dei linfociti infiltranti la placca e quindi coinvolti nei processi degenerativi aterosclerotici. Tra i meccanismi autoimmuni legati all'aterosclerosi abbiamo recentemente dimostrato (Ausiello, Fedele, *et al. Microb Infection* 2006) il perdurare di una risposta Th1 azionata specificamente da cellule dendritiche umane monocita-derivate (MDDC) maturate in presenza di CP.

Il *Clostridium difficile* (CD) è nuova emergenza sanitaria in Europa e nel mondo 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, Cerquetti, *et al. Microbes Infect* 2006) e che quindi possono rappresentare molecole implicate nella patogenicità del batterio e anche eventuali antigeni vaccinali.

Sia per quanto riguarda Cp che Cd particolare attenzione sarà posta sul tipo di risposta evocata dall'infezione/trattamento con il batterio intero o con prodotti batterici purificati in un modello sperimentale *in vitro* costituito da cellule dendritiche umane monocita-derivate (MDDC), di grande aiuto per capire la regolazione della risposta immune innata, e di quella T e B antigene specifica.

Risultati attesi nel triennio

Obiettivi dell'UO sono:

- Identificare i recettori delle DC coinvolti nell'infezione/interazione con il batterio e/o con i bersagli antigenici (proteine purificate) derivati dal batterio.
- Identificazione delle vie di trasduzione del segnale indotte in DC dall'infezione/interazione con il batterio e/o da bersagli antigenici (proteine purificate) derivati dal batterio.
- 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 e che in processi autoimmuni.
- Individuazione di strategie di immunomodulazione *in vitro* delle DC per ottenere lo spegnimento delle risposte Th patogenetica.
- Individuazione d'antigeni bersaglio della risposta antigene-specifica e differenzialmente espressi durante le fasi dell'infezione.

Trasferibilità dei 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 significativi da seguire nelle popolazioni in studio.

Una migliore comprensione dei meccanismi immunologici coinvolti permetterebbe interventi terapeutici con immunomodulanti, con particolare riguardo al possibile uso di citochine antiinfiammatorie o agenti bloccanti i recettori coinvolti nell'infiammazione in particolari categorie di soggetti a rischio.

La pubblicazione dei risultati su riviste internazionali di forte impatto, l'invio di abstract a congressi nazionali ed internazionali, sono gli indicatori che si intende raggiungere.

Questa linea di ricerca è iniziata nel triennio precedente finanziato con la ricerca Finalizzata del 2006 e continuerà grazie a un nuovo progetto finanziato dalla UE (Hyperdiff).

Influenza delle nanoparticelle sul sistema immunitario: studi *in vitro* e *in vivo* per la valutazione di un nuovo strumento per la diagnosi e la terapia

La nanotecnologia è un nuovo settore di ricerca che è legato allo sviluppo di strutture e dispositivi con ordine di grandezza che va da 1 a 100-nanometri. I nanomateriali sono già ampiamente utilizzati in rivestimenti, computer, abbigliamento, cosmetici, attrezzature sportive e dispositivi medici. Le nanoparticelle (NP) possono presentare possibili pericoli, sia dal punto di vista medico che ambientale. D'altro canto, l'uso di nanomateriali in medicina è una nuova metodologia che coinvolge diversi aspetti. Sistemi di rilascio di antigeni associati a particelle sono stati studiati per lo sviluppo di nuovi e più potenti vaccini. Inoltre, nanoparticelle

paramagnetiche possono essere utilizzate per l'*imaging*, quando coniugate con specifici recettori o ligandi, o in terapia, in associazione con farmaci.

Numerosi studi hanno tentato di valutare l'influenza sulla salute umana delle NP, ma non sono stati ottenuti risultati chiari, a causa della complessità della struttura, delle formule chimiche e l'interazione con i sistemi biologici.

Gli obiettivi di questo progetto sono capire le caratteristiche (dimensioni, carica, lipofilia, affinità per le proteine) di NP organiche e inorganiche, come ad esempio ossidi di zinco e titanio e derivati lipidici, e il loro impatto sulla risposta cellulare del sistema immunitario in termini di tossicità e l'influenza sulle funzioni principali, come ad esempio la presentazione dell'antigene delle cellule dendritiche o sulla risposta di cellule T,B o NK. Infine, si analizzerà l'influenza dell'NP in una tipica malattia immuno mediata come allergia utilizzando un modello murino. Si tenterà di valutare le possibilità di utilizzare la nanotecnologia nello sviluppo di nuove strategie di modulazione della risposta allergica

Risultati attesi nel triennio

Tutti gli studi saranno effettuati in collaborazione con il Dipartimento di Tecnologia e Salute dell'ISS e con l'Istituto di Biomedicina e di Immunologia Molecolare del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

La strategia del progetto sarà sviluppata a tre diversi livelli:

- Caratterizzazione fisico-chimica di NP: lo studio verrà effettuato su NP organiche e inorganiche (ad esempio, i lipidi e gli ossidi di Zn, Fe, Ti).
- Studi *in vitro*: diversi sottotipi di cellule immunitarie murine, come BMDC, T, B o cellule NK saranno utilizzate per definire concentrazioni subcitotossiche di NP e per indagare i meccanismi biologici dell'azione delle NP. In particolare, saranno analizzate le alterazioni del ciclo cellulare e l'induzione di meccanismi di morte cellulare attraverso la valutazione delle caratteristiche morfologiche, ultrastrutturali e dei parametri biochimici. Inoltre, saranno valutati i meccanismi di *uptake* e l'interazione delle NP con le cellule del sistema immunitario. Infine, l'influenza dell'NP sulle funzioni delle cellule T, B, NK umane e murine saranno valutate tramite l'analisi del fenotipo e la produzione di cito/chemochine.
- Studi dell'interazioni delle NP *in vivo* con la risposta immunitaria mediata (allergia): topi saranno sensibilizzati con diversi allergeni (ad esempio, derivati da pollini o da animali) e successivamente sottoposti a *challenge*. Entrambi sensibilizzazione e/o *challenge* saranno effettuati in presenza o meno di NP associate o meno con gli allergeni. La valutazione della risposta allergica umorale a livello sistemico (siero) e delle mucose (fluido del lavaggio broncoalveolare o feci) in termini di livello di produzione IgE, IgG1, IgG2a e IgA allergene-specifiche. Infine, le sottopopolazioni di cellule T saranno caratterizzate in termini di livello di secrezione di citochine ed espressione dei fattori di trascrizione.

Trasferibilità dei risultati

L'introduzione di nuove associazioni NP-farmaco è stata proposta per la diagnosi e il trattamento di diverse patologie. Recentemente, NP caricate con allergeni sono state impiegate per la progettazione di nuove strategie più efficaci e sicure di immunoterapia specifica delle malattie allergiche. Modelli murini di sensibilizzazione allergica possono fornire informazioni preziose nella valutazione preclinica di tali nuovi approcci immunomodulatori. I risultati della valutazione dell'immunotossicità dei preparati derivati dalle nanotecnologie, insieme con gli studi sul loro impatto sulla risposta immunitaria, aiuterà nella progettazione e valutazione di strumenti diagnostici e terapeutici innovativi. Inoltre, gli studi sul potenziale terapeutico dei vettori a NP, eseguita *ex vivo* e *in vivo*, permetterà di esplorare i meccanismi coinvolti.

Innovazione tecnologica nella diagnostica molecolare per patogeni 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: i) messa a punto di 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; ii) studiare e ottimizzare criteri pratici e allestire protocolli molecolari operativi per l'applicazione di laboratorio in ambito ospedaliero; iii) 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 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.

Interazioni tra immunità naturale e acquisita nelle fasi precoci delle malattie infiammatorie croniche: uno studio nella psoriasi come modello sperimentale

La psoriasi è una patologia comune che colpisce sia la pelle che le articolazioni e che può essere ritenuta come prototipo delle malattie infiammatorie croniche autoimmuni.

Fattori scatenanti quali infezioni microbiche della pelle, traumi lievi e stress, insieme a fattori genetici hanno un ruolo cruciale nell'induzione della malattia di cui però gli specifici meccanismi patogenetici sono ancora oscuri.

L'obiettivo di questo progetto è individuare gli eventi molecolari principali che caratterizzano le fasi precoci della psoriasi e di valutare la loro rilevanza come bersagli terapeutici usando un modello murino "umanizzato" di psoriasi.

L'epidermide, in soggetti geneticamente predisposti, produce alti livelli di peptidi antimicrobici (AMP) in risposta allo stress, traumi o infezioni microbiche. Nell'uomo sono note due principali famiglie di AMP, le defensine-beta e le catelicidine quali LL-37. Gli AMP vengono prodotti costantemente nella pelle psoriasica raggiungendo livelli molto elevati.

Un'importante relazione tra LL37 e l'innescò della cascata di risposte immunitarie è stata fornita dalla scoperta che evidenzia che LL37 può convertire il DNA *self* extracellulare, che è immunologicamente inerte, in un potente stimolo che induce le pDC a produrre IFN di tipo I (Lande R, *Nature* 2007). In questo modo, le pDC produttrici IFN di tipo I possono attivare le mDC residenti nella pelle che a loro volta presentano un autoantigene/i alle cellule T vergini permettendo il loro differenziamento a Th1 o Th17. Queste ultime rappresentano le due popolazioni T patogenetiche nella psoriasi. Recentemente, è stato dimostrato che l'IL-21 è una citochina critica nel differenziamento delle T vergini a cellule con fenotipo Th17. Anche l'IL-15 appare coinvolta nell'amplificazione della popolazione Th17 ma l'esatto ruolo nella psoriasi è ancora da chiarire.

In accordo con quanto detto, gli obiettivi principali di questo progetto sono:

- l'analisi delle fasi iniziali della formazione della placca psoriatica in un modello murino "umanizzato" basato su xenotrapianto di cute umana in topi SCID e AGR focalizzando sul ruolo degli AMP (LL37) e di specifiche citochine (IL-15; IL-21).
- lo studio degli effetti adiuvanti degli AMP nell'attivazione dell'immunità naturale ed adattativa nella psoriasi e nelle artriti correlate (spondiloartropatie sieronegative).
- l'analisi del ruolo degli AMP come autoantigeni capaci di indurre attivazione dei linfociti T sia di fenotipo CD4+ che CD8+ nella psoriasi e nelle artriti correlate (spondiloartropatie sieronegative).
- valutare gli effetti dell'IL-21 sulla proliferazione dei cheratinociti psoriasici e la loro abilità a produrre citochine pro-infiammatorie.
- analizzare nel modello murino "umanizzato" basato sullo xenotrapianto di cute psoriasica: i) la capacità di proteine sintetiche polianioniche di inibire sia gli effetti adiuvanti che le proprietà "autoantigeniche" degli AMP; ii) valutare gli effetti degli anticorpi anti-IL-15 and anti-IL-21 sulla formazione della placca per validare il loro uso nel trattamento preventivo/terapeutico della psoriasi.

Risultati attesi nel triennio

Riguardo gli effetti adiuvanti degli AMP sull'immunità innata e adattativa, ci aspettiamo di osservare che l'aberrante rilascio di IFN, prodotto dalle pDC stimulate dal complesso AMP/acido nucleico, induca un forte aumento dell'espressione di IL-15 su diverse cellule dell'SI, con particolare riferimento alle mDC. La transpresentazione dell'IL-15, così potenziata, potrebbe essere coinvolta nell'espansione/induzione di linfociti Th17 e T CD8+. Inoltre, poiché è stato suggerito che l'IL-21 può essere indotta dall'IFN stesso (Strengell, *et al. J Leuk Bio* 2004), ci aspettiamo di ottenere dati significativi sull'effetto patogenetico dei complessi AMP/acido nucleico, relativamente alla produzione di IL-15 e IL-21 e alla conseguente attivazione, anche in sinergia, dei linfociti T.

Ci aspettiamo di chiarire se AMP possano agire da autoantigeni in grado di innescare una risposta immune specifica da parte dei linfociti T (CD4+ e CD8+) nella psoriasi e nelle artriti correlate.

A tal proposito, alcune osservazioni preliminari *in vitro* (Frasca L e Lande R, in preparazione) mostrano che, in cellule del sangue periferico (PBMC) di pazienti con psoriasi, l'aggiunta di AMP (LL-37 e beta-defensine) induce la proliferazione di linfociti T CD4+ e CD8+. Non si osserva, invece, alcuna proliferazione nei soggetti sani. Ci aspettiamo di chiarire se la proliferazione osservata sia causata da un effetto adiuvante degli AMP o dal riconoscimento, da parte del TCR, di epitopi T presenti nella sequenza degli AMP stessi. Inoltre, vorremmo che tale studio conducesse all'isolamento di linee e cloni T stabili (con fenotipo Th1, Th17, citotossico), specifici per gli AMP. In particolare, l'uso dei cloni T ci permetterà di chiarire il ruolo delle pDC, oltre alle classiche mDC, come cellule presentanti gli autoantigeni ai diversi subsets di linfociti T. Questi risultati chiariranno non solo se gli AMP possono rappresentare autoantigeni, ma anche se sono presentati dalle molecole HLA-Cw6 e HLA-B27, associate con le patologie in studio, dando una ulteriore spiegazione di tale associazione genetica.

La valutazione del potenziale terapeutico di anticorpi neutralizzanti anti-IL-21 e anti-IL-15 e di proteine polianioniche (poli-aspartato e poli-glutammato), sarà testata nel modello murino soprariportato.

Trasferibilità dei risultati

Se poli-aspartato e poli-glutammato saranno efficaci nell'inibire gli effetti degli AMP sia *in vitro* che *in vivo* (modello murino di psoriasi) e se il blocco della IL-15 e dell'IL-21, o di entrambe, nella placca psoriasica si dimostrerà efficace nel ridurre l'infiammazione ciò getterà la basi per un possibile uso di tali reagenti in pazienti affetti da psoriasi e artriti correlate.

InterMalTraining

InterMaltraining è un progetto europeo FP7, in particolare è un *Initial Training Network* nel contesto delle Marie Curie *Action*.

Il progetto raccoglie un consorzio di ricercatori europei, coordinati dal Dr. Michael Blackman, NIMR, London, che gestisce 14 progetti di dottorato triennali, svolti da altrettanti studenti selezionati in una selezione internazionale. Uno di questi progetti è svolto in ISS, sotto la supervisione dell'ISS, e si intitola "*Adhesion of Plasmodium falciparum gametocyte-infected red blood cells*".

Risultati attesi nel triennio

Il progetto intende caratterizzare i processi cellulari e molecolari coinvolti nella capacità dei gametociti immaturi di *Plasmodium falciparum* di maturare all'interno di organi interni, in particolare del midollo osseo. A questo fine saranno messi a punti saggi cellulari di citoadesione di gametociti e cellule endoteliali di midollo osseo, saranno studiate alcune proteine espresse nel gametocita, che analisi proteomica e computazionale hanno suggerito essere coinvolte nel *remodelling* dell'eritrocita infettato dal gametocita, e saranno condotti esperimenti biochimici per identificare molecole del parassita esposte sulla superficie del globulo rosso infettato dal gametocita immaturo.

Trasferibilità dei risultati

L'identificazione di molecole coinvolte nell'adesione dei gametociti immaturi potrebbe offrire la possibilità di interferire con questo processo essenziale alla maturazione delle forme sessuali del parassita necessarie alla sua trasmissione da uomo a zanzara.

Italian Seroconversion Study

Lo studio di coorte "*Italian Seroconversion Study*" si colloca nell'ambito degli studi longitudinali di tipo prospettico con lo scopo di descrivere la storia naturale dell'HIV. 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 Seroconversion Study*" ha dato un contributo a livello nazionale, studiando i pazienti provenienti da centri clinici distribuiti in tutta Italia e con data di sieroconversione nota, stimata come punto centrale tra l'ultimo test HIV-negativo e il primo test HIV-positivo. I dati richiesti prevedono un "follow-up dettagliato, sia prima che dopo aver ricevuto le terapie antiretrovirali; ciò ha permesso di fare analisi sull'effetto delle terapie nella pratica clinica (l'*effectiveness*), obiettivo possibile con un disegno del tipo longitudinale. Lo studio ha dato un contributo anche a livello europeo: l'"*Italian Seroconversion Study*", 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 23 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*") che ha permesso di ampliare gli obiettivi sia da un punto di vista geografico che numerico.

Risultati attesi nel triennio:

Gli obiettivi principali permetteranno 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 l'individuazione di clusters di sottotipi diversi da quello più comune nell'HIV-1 (tipo B) per verificare l'eventuale diversa progressione della malattia a seconda del sottotipo, nonché il confronto temporale della distribuzione dei CD4 e della carica virale. Un altro obiettivo sarà quello di studiare l'effetto prognostico della terapia antiretrovirale (HAART), dando particolare attenzione alla risposta iniziale della terapia in termini di CD4. Precedenti studi hanno evidenziato, infatti l'importanza prognostica della risposta iniziale alla HAART in termini di incremento dei CD4 entro un anno dall'inizio della terapia. Verrà studiata quindi la distribuzione dei CD4 dopo un anno dall'inizio della terapia a seconda di variabili come il tipo di terapia iniziale, il CD4 all'inizio della terapia (*baseline*) e l'anno di calendario; inoltre verrà studiata l'associazione tra la risposta iniziale e la "normalizzazione" dei CD4. L'applicazione di modelli statistici nel progetto (modelli semi-Markov), darà inoltre l'opportunità di stimare delle tabelle di sopravvivenza dettagliate a seconda di caratteristiche come l'età dei pazienti e il livello dei CD4 all'inizio della terapia.

Trasferibilità dei risultati prodotti:

I risultati dell'"*Italian Seroconversion Study*" implicano un'ampia trasferibilità sia alla realtà clinica che a quella di sanità pubblica italiana. Infatti il progetto permette di stimare la sopravvivenza dei pazienti tenendo conto nel corso degli anni sia dei miglioramenti terapeutici sia di quelli a livello pratico nella clinica dell'AIDS in Italia. Quantificare l'aumento della sopravvivenza nelle persone HIV-positivo permette di stimare con precisione la speranza di vita a seconda, ad esempio, dell'età dei pazienti e della gravità della malattia. La conoscenza di tali parametri contribuisce a costruire modelli matematici atti a stimare in Italia il carico globale dell'AIDS, nonché a conoscere le dinamiche temporali della stessa. 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. L'"*Italian Seroconversion Study*" dà la possibilità di perseguire tali obiettivi anche a livello internazionale, dando un contributo ai progetti europei CASCADE e COHERE che grazie all'ampia dimensione campionaria e geografica permettono di individuare con precisione cambiamenti importanti dell'epidemia da HIV.

L'immunologia non-convenzionale della tubercolosi come base di interventi immuno-profilattici/terapeutici innovativi (newTBVAC)

Il controllo della tubercolosi (TB) è un goal fondamentale a causa dell'enorme diffusione della malattia a livello mondiale, per la limitazione degli approcci farmacologici e per la drammatica associazione con l'infezione da HIV.

Scopo di questo progetto è di produrre nuove conoscenze che possano essere alla base di nuovi approcci di immuno-profilassi/immunoterapia della TB focalizzando lo studio sulla sintesi di antigeni lipidici capaci di attivare quei linfociti T che riconoscono antigeni non convenzionali presentati nel contesto di molecole CD1. Oltre allo studio dell'immunogenicità, che verrà analizzata attraverso lo studio dell'attivazione di linee e cloni T CD1 ristretti, verrà data particolare enfasi al ruolo dei lipidi isolati nell'attivare cellule dell'immunità innata. Verrà inoltre studiata la suscettibilità al *killing* T dipendente di batteri intracellulari trattati con le diverse formulazioni lipidiche.

Risultati attesi nel triennio

Risultati attesi sono: i) l'identificazione di lipidi specifici del Micobatterio tubercolare e la valutazione della loro immunogenicità attraverso la loro capacità di stimolare pannelli di cloni T per antigeni di TB già disponibili e attraverso la generazione di cloni *ex novo* con metodi disponibili in laboratorio, che sfruttano le cellule dendritiche come APC. ii) Analisi del repertorio di CTL in pazienti in diverse fasi di malattia con particolare riferimento alla fase di infezione tubercolare latente e valutazione del ruolo dei CTL nel controllo della TB.

Trasferibilità dei risultati

Il modello di studio proposto può essere alla base dell'identificazione di antigeni non convenzionali (lipidi) non precedentemente messi in evidenza e del ruolo dei CTL nel controllo della TB

L'ottenimento degli obiettivi permetterà l'individuazione di nuovi strumenti diagnostici, target vaccinali e/o di immunoterapia. La diffusione delle conoscenze avverrà attraverso i canali standard come la pubblicazione dei risultati su riviste internazionali di forte impatto, l'invio di abstract a congressi nazionali e internazionali.

Le restrizioni alimentari dei pazienti allergici possono essere risolte da un nuovo tipo di vaccino (Progetto finanziato dal Norwegian Research Council e registrato come Progetto EUREKA con il titolo "Vaccination against food allergy")

Le allergie alimentari colpiscono circa l'1-2% della popolazione adulta. Oltre il 90% delle allergie alimentari note sono riconducibili a otto categorie di alimenti: crostacei, uova, pesce, latte, arachidi, soia, noci e cereali. L'anafilassi da allergia alimentare è attualmente la principale causa di reazioni anafilattiche osservate nei dipartimenti di emergenza dei Paesi occidentali. Al momento attuale, gli unici approcci di controllo per l'allergia alimentare sono l'allontanamento degli alimenti responsabili, e un adeguato trattamento farmacologico nel caso di ingestione accidentale. Per le patologie allergiche respiratorie sono disponibili trattamenti immunoterapeutici specifici (SIT), basati sulla somministrazione parenterale di quantità crescenti dell'allergene coinvolto, o più recentemente su protocolli iposensibilizzanti per via orale. D'altra parte, questa terapia non è priva di rischio per pazienti con una reattività elevata verso gli allergeni responsabili, quale è spesso il caso dei pazienti allergici ad alimenti. Proprio il rischio di seri effetti avversi connessi alla SIT per l'allergia alimentare ha condotto alla ricerca di nuove forme di immunoterapia vaccinale.

Il presente progetto si propone di costruire e valutare nuove forme di vaccini iposensibilizzanti per il trattamento delle allergie alimentari, con struttura di tipo anticorpale. Il concetto è basato sul promettente vaccino contro il cancro sviluppato dal Prof. Bogen

dell'Istituto di Immunologia, Università di Oslo (Norvegia), denominato *Vaccibody*. Un *Vaccibody* è una molecola di tipo anticorpale che contiene un sito antigene-specifico e una unità bersaglio-specifica. Il vaccino per l'allergia conterrà un allergene alimentare ricombinante (la tropo miosina di gambero) nella porzione antigene-specifica e una unità bersaglio-specifica associata con l'induzione di tolleranza immunologica. A questo scopo verranno valutate diverse alternative: il recettore inibitorio Fc-gamma IIB, il CD40, il DEC205 e gli oligonucleotidi CpG.

Inoltre, verrà investigato l'uso dell'allergene ricombinante in metodi analitici per la ricerca di allergeni nascosti negli alimenti, come pure la sua applicazione nei test diagnostici cutanei.

I vaccini candidati saranno valutati in studi *in vitro* sui sieri umani ottenuti da pazienti allergici e/o su cellule del sangue per saggi funzionali (saggio di degranolazione *in vitro* dei basofili e saggio di attivazione di linfociti T e B). I candidati più appropriati saranno selezionati per studi *in vivo* su modelli murini di sensibilizzazione e anafilassi verso gli allergeni selezionati per valutare i loro effetti profilattici e/o terapeutici.

Il progetto verrà svolto in stretta collaborazione con il *National Veterinary Institute* e l'Università di Oslo, oltre che una SME norvegese (*Vaccibody AS*). Gli esperimenti *in vivo* su modelli animali verranno effettuati presso il nostro gruppo all'ISS.

Risultati attesi nel triennio

Lo sviluppo di un vaccino adatto potrà indurre una situazione di tolleranza nei pazienti con allergia alimentare, con ricadute positive sui loro consumi alimentari e sullo stile di vita. Inoltre, si renderanno disponibili maggiori conoscenze sulle possibilità di trattare le allergie alimentari con vaccini allergene-specifici, sulle *cross*-reattività tra allergeni in alimenti affini, e sulle eventuali differenze tra reazioni allergiche verso allergeni naturali e ricombinanti.

Metodi più sensibili e specifici miglioreranno la sicurezza dei consumatori e l'identificazione di nuovi allergeni sul mercato, e forniranno strumenti migliori per identificare gli agenti causali delle reazioni alimentari ad elevato rischio.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto ha lo scopo di identificare prodotti *candidate* per i saggi *in vivo* in modelli animali e pronti per la valutazione preclinica.

L'obiettivo specifico è di fornire evidenze concettuali sulla capacità di un vaccino candidato, disegnato e selezionato dagli altri partecipanti al progetto, di indurre effettivamente tolleranza verso l'allergene maggiore del gambero in studi *in vivo* su modelli murini specifici per l'allergene studiato. Nel caso di risultati positivi, lo stesso approccio può essere esteso ad altri importanti allergeni alimentari, per ampliare la popolazione potenzialmente interessata.

Le compagnie farmaceutiche nel settore allergologico hanno interesse potenziale nello sviluppo di tali prodotti.

Il progetto è stato registrato come Progetto EUREKA (N. E! 4169).

Si pianificherà la produzione di pubblicazioni scientifiche e comunicazioni a congressi internazionali per la opportuna diffusione dei risultati ottenuti dal progetto.

Malattie metaboliche e salute della donna: studi di patogenesi e nuovi approcci terapeutici

Meccanismi immunologici hanno un ruolo preponderante nella patogenesi dell'aterosclerosi. È stata dimostrata una connessione bidirezionale tra i sistemi immune e neuroendocrino che coinvolge ligandi condivisi (neuropeptidi, ormoni e citochine). 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 particolarmente nella donna ed è noto che tali alterazioni sono fattori predisponenti lo sviluppo

dell'aterosclerosi. È stato suggerito per NPY un ruolo quale marcatore di rischio cardiovascolare *gender*-specifico. Obiettivo del progetto è quello di valutare il ruolo di NPY nella disfunzione endoteliale in donne con alterazioni metaboliche allo scopo di identificare biomarcatori di rischio cardiovascolare e nuovi bersagli per strategie terapeutiche *gender*-specifiche. In pazienti di entrambi i sessi e soggetti sani verranno valutati i livelli di NPY e di marcatori di rischio aterosclerotico. Cellule del sistema immunitario di soggetti sani, stimolate *in vitro* con NPY in presenza o no di ormoni androgeni (testosterone) o estrogeni (estradiolo) verranno caratterizzate fenotipicamente e funzionalmente per valutare l'effetto di NPY sul sistema immunitario in relazione al *gender*. Verrà valutato in tali sistemi l'effetto di molecole immunomodulanti.

Risultati attesi nel triennio

Il primo risultato atteso è la determinazione del ruolo di NPY quale biomcatore di rischio cardiovascolare in donne con alterazioni metaboliche. Un secondo importante risultato è la comprensione dell'effetto *gender*-specifico di NPY su cellule dell'immunità innata (monociti, cellule dendritiche) e adattativa (linfociti T). Un terzo risultato è la determinazione dell'effetto immunomodulante *gender*-specifico di ormoni con funzione metabolica e immunoregulatoria quali leptina e grelina o di altre molecole immunomodulatorie sull'azione di NPY su cellule dell'immunità innata e acquisita.

Trasferibilità dei risultati

Il trasferimento applicativo nella pratica clinica delle conoscenze acquisite consisterebbe nello sviluppo di nuovi strumenti biologici di intervento preventivo e riparativo con potenziale immunomodulatorio o anti-infiammatorio che interferiscano con i meccanismi identificati di danno vascolare allo scopo di mettere a punto nuove strategie terapeutiche di genere. Terapie innovative con immunomodulanti, con particolare riguardo ad ormoni con funzione metabolica e immunoregulatoria quali leptina e grelina, potrebbero determinare una riduzione della mortalità associata a complicazioni cardiovascolari in donne con alterazioni metaboliche.

MalSig

Il progetto MalSig è un progetto FP7 di collaborazione scientifica Europa-India. È un consorzio di ricercatori europei e indiani che intende focalizzare la propria ricerca sui meccanismi cellulari e molecolari di *signalling* nel parassita malarico nelle sue diverse fasi di sviluppo. Il progetto, coordinato dal Dr. Christian Doerig, Univ. Losanna combina *expertise* nel parassita umano *Plasmodium falciparum* e nel modello murino *P. berghei*, e conduce le proprie attività su tre livelli di indagine: i) molecole direttamente responsabili del *signalling* nel parassita, ii) molecole effettori, che trasducono il *signalling* a specifici eventi cellulari, e iii) processi biologici specifici dei diversi stadi del parassita che sono governati dai due livelli precedenti.

Quindici gruppi europei e cinque gruppi indiani partecipano a questo progetto.

Risultati attesi nel triennio

L'ampiezza del consorzio, e l'integrazione degli *expertise* esistenti fanno prevedere che una vasta mole di dati saranno ottenuti sui tre livelli di indagine delineati sopra. In particolare il progetto è atteso identificare interazioni di molecole note per il loro ruolo nel *signalling* (ad esempio proteine chinasi) con molecole effettori (ad esempio chaperonine) e proteine del parassita di cui l'assenza di omologia con proteine eucariotiche note non permette di ipotizzare una funzione molecolare o cellulare specifica.

Trasferibilità dei risultati

L'identificazione di composti capaci di interferire con la funzione di molecole legate al *signalling* (inibitori di chinasi sono già disponibili nel consorzio), ma anche di molecole effettori, aprirebbe la opportunità di sviluppare molecole con funzione antimalarica.

Men B molecular- and sero-typing research collaboration

Il progetto intende investigare a livello europeo la diversità molecolare degli isolati clinici di *Neisseria meningitidis* di sierogruppo B circolanti nei vari Paesi attraverso il sequenziamento dei geni codificanti i tre antigeni proteici che costituiranno il futuro vaccino antimeningococco sierogruppo B. Inoltre verrà standardizzata una metodica ELISA per la sierotipizzazione di ceppi di sierogruppo B relativamente agli antigeni vaccinali.

Risultati attesi nel triennio

I risultati ottenuti da questo studio collaborativo europeo permetteranno di avere: i) dati sulla omogeneità genetica degli antigeni contenuti nella formulazione vaccinale con quelli presenti nei ceppi isolati da casi di malattia; ii) una tecnica ELISA standardizzata per la sierotipizzazione di ceppi di meningococco B isolati da casi clinici relativamente agli antigeni vaccinali presenti nel vaccino antimeningococco B attualmente in sperimentazione.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questo studio europeo saranno diffusi attraverso workshop, presentazioni a congressi internazionali e pubblicazioni su riviste scientifiche *peer-reviewed*.

Microarray, microRNA e virus dell'Epatite. Resistenza alla terapia con IFN e identificazione di nuovi bersagli terapeutici

Il progetto prevede la partecipazione del Reparto Virus epatitici. L'infezione da virus dell'Epatite C (HCV) è la causa principale di malattia epatica. La terapia con Interferone (IFN) 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 (ISGs), ad azione anti-virale, è inefficace. La pre-attivazione dei geni ISGs 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 ISGs 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 ISGs. 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

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 della funzione dei linfociti T regolatori da parte di induttori di cAMP

Il ruolo del cAMP come secondo messaggero nelle cellule del sistema immunitario è stato ampiamente descritto. In un nostro precedente studio abbiamo dimostrato che la Tossina Colerica (CT) e altri agenti che inducono un aumento di cAMP intracellulare, sono in grado di *up*-regolare molecole CTLA-4 su linfociti T *resting*. Il CTLA-4 è un recettore di tipo inibitorio espresso principalmente sui linfociti T e coinvolto nell'inibizione delle risposte immunitarie e nella regolazione della tolleranza periferica. Topi *knockout* per il CTLA-4 sviluppano spontaneamente una malattia autoimmune associata a disordini linfoproliferativi. Le molecole CTLA-4 sono costitutivamente espresse su linfociti T regolatori (Treg), i quali hanno una scarsa capacità proliferativa, non producono IL-2 e sono in grado di sopprimere la proliferazione e la produzione di citochine di cellule T effettrici. Tuttavia, la funzione delle molecole CTLA-4 sui linfociti T regolatori non è stata ancora completamente chiarita. Abbiamo osservato che induttori di cAMP inducono fortemente un aumento dell'espressione di molecole CTLA-4 sui linfociti T regolatori. L'obiettivo di questo studio è quello di analizzare le funzioni dei linfociti T regolatori trattati con induttori di cAMP e di analizzare il ruolo dei linfociti T regolatori in seguito alla somministrazione di induttori di cAMP, tra cui la CT, *in vivo*.

Risultati attesi nel triennio

Questo studio permetterà di caratterizzare da un punto di vista sia fenotipico che funzionale i linfociti T trattati con analoghi o induttori di cAMP. Attraverso il trattamento di linfociti T regolatori con induttori di cAMP sarà possibile analizzare il ruolo delle molecole CTLA-4 su queste cellule e sarà possibile identificare i meccanismi cellulari e molecolari attraverso i quali essi esercitano funzioni soppressive. Inoltre, l'utilizzo di modelli sperimentali murini ci permetterà di analizzare la funzione dei linfociti T regolatori e la loro capacità di modulare la risposta immunitaria in seguito alla somministrazione di induttori di cAMP *in vivo*.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questo progetto permetteranno di identificare una nuova categoria di sostanze immunosoppressive e permetteranno di definire meccanismi utili per la modulazione della risposta immunitaria in corso di malattie autoimmuni, di trapianti o di malattie infettive nell'uomo. La pubblicazione dei risultati su riviste internazionali, l'invio di abstract a congressi nazionali e internazionali, saranno gli indicatori che si intende raggiungere. L'ottenimento di finanziamenti, anche a livello europeo, di brevetti per nuove sostanze con proprietà immunomodulanti sono punti focali della progettualità.

Modulazione di coliti sperimentali mediante l'uso di agenti biologici interferenti con il processo infiammatorio

- Obiettivi del progetto
Valutazione in modelli murini di colite sperimentale dell'effetto sull'infiammazione di trattamenti tendenti a potenziare l'attività di citochine regolatorie (antisense SMAD7) e ad inibire l'attività di citochine effettrici.
- Programma di attività e Metodi
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 in base a:
 - peso dell'animale
 - mortalità
 - aspetto macroscopico dei colon
 - grado di infiammazione istologica
 - produzione locale di citochine
 - analisi della trasmissione di segnale del TGF-beta
 - analisi delle popolazioni cellulari con attività regolatoria ed effettriceSuccessivamente, 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
 - 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.
 - Produzione locale di citochine: ELISA su omogenato di tessuto
 - Analisi della trasmissione di segnale del TGF-beta: *western blot*
 - 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.

Nanoparticelle modificate per la veicolazione di farmaci anti-*Cryptosporidium* sp

L'efficacia dimostrata dell'Indinavir (IND) sulla criptosporidiosi sperimentale (Mele, *et al.* 2003) e la mancanza di un trattamento efficace per questa infezione, suggeriscono la necessità di implementare gli studi orientati ad una maggior conoscenza dei sistemi enzimatici implicati *C. parvum*, tra cui l'aspartil proteasi, nel riconoscimento e invasione della cellula ospite e nelle diverse fasi del ciclo biologico del parassita. A questo proposito proponiamo l'uso di nano particelle (Np) biodegradabili (D, L-lactide-co-glicolide) formulate con l'IND per individuare, in un modello di coltura *in vitro*, il comparto interno del parassita target dell'Indinavir. Inoltre, l'uso di Np come dispositivi di veicolazione di farmaci, permette la protezione del principio attivo, diminuendo la tossicità e rallentando il metabolismo che potrebbe portare ad una degradazione rapida del farmaco prima ancora che la propria azione farmacologica venga

compiuta. Una strategia di veicolazione di questo tipo è particolarmente indicata nel caso del'IND, che ha un metabolismo veloce e notevole tossicità a livello renale. Per rendere il preparato selettivo verso il proprio target, le Np saranno modificate mediante legame ad un anticorpo specifico verso *C. parvum*. L'aumento dell'efficacia come anti-protozoo verrà valutata in un sistema di cultura di *C. parvum* in cellule HCT-8. In una seconda fase si studierà l'implicazione dell'attività aspartil proteasica nei diversi stadi di sviluppo del parassita.

Risultati attesi nel triennio

Ottenimento di Np caricate con IND e modificate in superficie (legate ad un anticorpo) omogenee, stabili, sin cambiamenti sostanziali nella caratteristiche fisiche (dimensioni) e fisico-chimiche (carica) con rispetto a quelle non modificate. Inoltre devono avere un rilascio controllato del farmaco.

Aumento dell'efficacia terapeutica degli inibitori dell'aspartil proteasi nell'infezione da *Cryptosporidium sp.* che potrebbe portare ulteriori elementi conoscitivi allo sviluppo di presidi terapeutici per il trattamento della criptosporidiosi.

Trasferibilità dei risultati

Si provvederà ad informare il personale dell'SSN dei risultati ottenuti mediante presentazioni a congressi e convegni scientifici e tramite l'organizzazione di workshop su temi specifici. Inoltre i principali e più significativi risultati del progetto saranno oggetto di pubblicazioni su riviste internazionali e nazionali.

In base alle indicazioni sul grado di efficacia delle nuove formulazioni degli inibitori dell'aspartil proteasi verso la infezione da *Cryptosporidium spp.*, si provvederà a valutare tale effetto in altri modelli animali.

***Neisseria gonorrhoeae* nell'ospite immunocompromesso: caratteristiche distintive dei ceppi isolati, con particolare riguardo alla diffusione di ceppi resistenti o multiresistenti agli antibiotici e valutazione di strategie terapeutiche alternative**

Il presente progetto si avvale dell'esperienza maturata negli ultimi anni durante lo studio di *Neisseria gonorrhoeae* nell'ambito del V e VI Programma nazionale di ricerca sull'AIDS dell'ISS. Un rinnovato interesse verso questo patogeno consegue ad una sempre più ampia diffusione di ceppi resistenti o multiresistenti agli antibiotici, una percentuale di soggetti immunocompromessi coinfectati, e, casi più complessi, quali la *Disseminated Gonorrhoeae Infection* (DGI) nei soggetti con deficit nel sistema del complemento. La mancanza di una memoria immunologica a seguito di infezione gonococcica facilita la possibilità di reinfezioni o di sequele. Nel tema specifico delle infezioni da gonococco nel soggetto immunocompromesso è evidente che lo stato immunologico del paziente influenzi l'acquisizione e la risoluzione dell'infezione aumentando il rischio di trasmissione tra la popolazione e una presentazione clinica con caratteristiche più severe con possibilità di diffusione extragenitale, quale la DGI, ulteriormente complicata se dovuta a ceppi resistenti o multiresistenti agli antibiotici. In questo progetto si intende studiare la diversità biomolecolare dei ceppi isolati, in termini di fenotipi o genotipi prevalenti, ma anche differenze dal punto di vista clinico e terapeutico del paziente (gravità clinica, reinfezioni, cronicizzazione); valutare la sensibilità agli antibiotici evidenziando, dalle alterazioni molecolari responsabili della resistenza, sonde geniche specifiche da utilizzare in *Real Time* PCR.

Risultati attesi nel triennio

Ottenere informazioni relative alle caratteristiche del soggetto immunocompromesso con infezione da gonococco.

Delineare le caratteristiche distintive del ceppo di gonococco che infetta un soggetto immunocompromesso in termini di fenotipi e/o genotipi prevalenti.

Caratterizzazione dei ceppi di gonococco relativamente al profilo di sensibilità agli antibiotici in uso per la terapia.

Messa a punto di un approccio in *Real time* PCR per l'individuazione rapida dei ceppi resistenti o multiresistenti, per poter scegliere una terapia antibiotica alternativa.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti da questo progetto avranno una ricaduta non solo come realizzazione di una rete di centri periferici suddivisa 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. L'analisi molecolare dei geni coinvolti nei meccanismi di resistenza del batterio permetteranno di mettere a punto metodi rapidi di indagine tramite PCR *realtime* per l'individuazione di multiresistenze in ceppi isolati da pazienti immunocompromessi.

New lentiviral VLPs incorporating HPV16-E6/E7 as therapeutic vaccine against the virus-associated neoplasia

L'infezione da papillomavirus "ad alto rischio" (HR) rappresenta il maggiore fattore di rischio per lo sviluppo del cancro della cervice uterina. Molte evidenze indicano che l'infezione persistente virale causa di lesioni cancerose è legata alla mancanza di una sufficiente risposta immune del soggetto verso il virus. Vaccini profilattici contro due tipi HR, 16 e 18, sono disponibili; essi porteranno probabilmente ad una riduzione dell'incidenza del tumore della cervice, ma soltanto tra decine di anni. Essi non sono efficaci su infezioni già stabilite e quindi non potranno aiutare il trattamento di milioni di persone già infette. È necessario quindi sviluppare trattamenti terapeutici, quali vaccini, meno invasivi e costosi di quelli attualmente disponibili. I vaccini terapeutici hanno alcuni vantaggi rispetto agli approcci convenzionali: sono specifici, ben tollerati e hanno effetti a lungo termine. Il progetto propone lo sviluppo di un vaccino terapeutico basato sulle oncoproteine virali E6 ed E7, riconosciute come "antigeni specifici tumorali" associate a *virus-like particles* lentivirali. Per lo sviluppo di un vaccino, dopo la scelta dell'antigene target, essenziale è il modo del suo trasferimento. Le VLP sono particelle molto organizzate, *self-assembling*, non contenente materiale genetico e non patogeniche. Esse possono essere ingegnerizzate per contenere antigeni esogeni, posseggono proprietà adjuvanti ed hanno ovvi vantaggi in termini di sicurezza ed efficacia.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si prefigge di:

- Produrre VLP di HIV incorporanti le oncoproteine di HPV16, E6 ed E7. La strategia usata è stata sviluppata nel nostro Istituto e prevede la fusione delle due proteine ad un mutante di Nef (Nef7) di HIV. Nef7 ha la proprietà di essere incorporata nelle VLP più efficacemente della proteina *wild type* e quindi si presta ad essere usate come molecola "carga" per il trasferimento di proteine eterologhe.
- Valutare le VLP-E6/E7 come vaccino terapeutico contro il tumore associato ad HPV16 in un modello animale. Non esistendo un modello animale specifico per i papillomavirus umani, essendo questi virus specie-specifici, tale valutazione verrà effettuata in topi,

C57Bl/6, sfruttando la possibilità di indurre in questi animali un tumore HPV16-correlato mediante l'inoculo di cellule tumorali murine esprimenti E7 ed E6. Sia la risposta umorale che cellulo-mediata sarà valutata negli animali vaccinati. L'attività antitumorale del vaccino basato sulle VLP-E6/E7 sarà valutata praticando la vaccinazione sia prima dell'induzione del tumore che sui topi già con tumore.

- Valutare la capacità delle VLP-E6/E7 di richiamare o indurre una risposta immune specifica in pazienti con lesioni-associate ad HPV16 di differente grado o in individui non infetti, rispettivamente. Ciò verrà effettuato in un sistema *ex vivo*; le APC isolate dal sangue delle persone infette e non, verranno caricate con le VLP e verranno testate per la capacità di espandere o indurre una risposta immune.

Trasferibilità dei risultati

Le finalità del progetto è la messa a punto un di sistema terapeutico contro il tumore associato a HPV. La necessità di sviluppare un vaccino terapeutico per le lesioni tumorali associate alla infezione da HPV è una priorità, data la rilevanza di questa patologia nelle donne, ma non solo, e la attuale disponibilità solo di protocolli terapeutici altamente invasivi per la sua cura.

Il successo del progetto potrà tradursi nella disponibilità di un preparato vaccinale valutato in un sistema animale ed in un sistema *ex vivo*, che potrà essere ulteriormente sviluppato fino ad arrivare ad una sperimentazione sull'uomo.

Nuove strategie di immunomodulazione per la prevenzione e terapia di patologie allergiche

La prevalenza delle malattie allergiche ha subito un drammatico aumento negli ultimi decenni, e le ragioni di questo fenomeno non sono ancora completamente comprese. La rapidità di espansione delle patologie allergiche indica che il fenomeno non è attribuibile a modificazioni genetiche della popolazione. Numerose segnalazioni nella letteratura scientifica riportano che condizioni di scarsa igiene domestica così come malattie infettive quali epatite, morbillo, tubercolosi e altre infezioni sono associate negativamente alle malattie allergiche, costituendo la base della cosiddetta "Ipotesi dell'Igiene", che suggerisce che l'aumento della prevalenza delle malattie allergiche è una conseguenza di una minore esposizione a fonti microbiche.

A supporto di tale ipotesi, vari studi hanno evidenziato che bambini cresciuti secondo uno stile di vita antroposofico (ridotto consumo di antibiotici, dieta ricca di cibi fermentati contenenti batteri vivi ecc.) mostrano un ridotto rischio di malattie allergiche. Inoltre, numerosi studi epidemiologici condotti in regioni rurali europee hanno mostrato che esiste nei bambini un'associazione positiva tra esposizione, molto precoce (primo anno di vita), o addirittura prenatale, all'ambiente di fattoria, e un minore rischio di sviluppare malattie allergiche. Infatti, bambini che vivono nelle fattorie mostrano una prevalenza delle malattie allergiche significativamente minore rispetto agli altri bambini che vivono nelle stesse aree rurali. Tra i possibili fattori, associati ad un ambiente di fattoria, che conferiscono protezione verso le malattie allergiche, sono stati individuati l'esposizione ad ambienti come granai, stalle e scuderie, e il consumo di latte non pastorizzato.

Nel loro insieme, queste osservazioni hanno suggerito che l'esposizione o l'assunzione di prodotti microbici possa essere efficace nel prevenire o inibire le risposte immunitarie di tipo allergico.

I batteri probiotici, dei quali è ampiamente riconosciuta la capacità di esercitare effetti benefici sulla salute umana, possono influenzare diverse componenti del sistema immunitario innato e adattativo. Sebbene numerosi studi sperimentali *in vitro* e *in vivo* suggeriscano che la

loro attività protettiva sia riconducibile all'induzione di risposte immuni polarizzate in senso Th1 o regolatorio, i meccanismi immunologici responsabili dell'effetto immunomodulatorio e anti-allergico indotto da batteri probiotici non sono ancora completamente definiti. Per lo studio di tali meccanismi è di fondamentale importanza sviluppare e ottimizzare modelli murini di sensibilizzazione allergica dotati delle necessarie caratteristiche che li rendono comparabili con la patologia umana, nei quali applicare protocolli di immunomodulazione *in vivo* con somministrazione di batteri probiotici. Parallele osservazioni epidemiologiche hanno evidenziato che stimoli ambientali ed esposizione ad antigeni microbici possono indirizzare un sistema immune non ancora maturo e quindi con una predisposizione ad una risposta immunologica di tipo Th2, verso un favorevole bilancio Th1/Th2/Tregolatorio. Per la verifica *in vivo* di questa ipotesi, uno degli obiettivi del progetto riguarderà la messa a punto di un protocollo sperimentale nel quale topi neonati, ottenuti e selezionati attraverso una procedura di randomizzazione, verranno sottoposti a trattamento orale con miscele di batteri probiotici prima di essere sottoposti ad un trattamento di sensibilizzazione allergica per valutare gli effetti del trattamento precoce sullo sviluppo e l'orientamento delle risposte immunitarie specifiche successivamente indotte.

Risultati attesi nel triennio

- Ottimizzazione di modelli murini attraverso la selezione del ceppo, della molecola allergenica e del suo dosaggio, dotato delle necessarie caratteristiche (sensibilizzazione orale, risposta anticorpale e anafilassi allergene-specifiche) che lo rendono comparabile con la patologia umana.
- Studio della attività immunomodulatoria esercitata da miscele di batteri probiotici vivi e in forma inattivata su diverse componenti del sistema immunitario innato e adattativo, con particolare attenzione agli effetti sul sistema immunitario immaturo.

Trasferibilità dei risultati

Conoscenze di tipo applicativo ai fini della valutazione degli effetti immunomodulatori *in vivo* di una miscela di probiotici.

Presupposti concreti per lo studio preclinico sull'attività di tali prodotti batterici nella prevenzione e terapia delle patologie allergiche IgE-mediate.

I risultati di questi studi saranno oggetto di comunicazioni a congresso, tesi di laurea e/o di Dottorato e di pubblicazioni su riviste internazionali.

Nuovi biomarker diagnostici e terapeutici in pazienti con aterosclerosi e con infezione da *Chlamydomphila pneumoniae* (CP)

Malattie dell'apparato cardio-circolatorio come l'infarto del miocardio e l'ateriosclerosi sono state associate a infezioni persistenti principalmente causate da *Chlamydomphila pneumoniae* (CP), come dimostrano numerosissimi studi, alcuni dei quali elaborati dal nostro gruppo presso l'ISS (Ciervo, *et al. Mol Cel Probes* 2003, Benagiano, *et al. PNAS* 2003, Spagnoli, *et al. Am J Pathol* 2007), in cui il microrganismo è stato direttamente isolato da vari distretti dell'apparato cardio-vascolare. Uno dei fondamenti scientifici ormai indiscussi risiede nell'assunto che l'aterosclerosi sia un processo strettamente collegato ad una infiammazione cronica, probabilmente dipendente da una iniziale *noxa* infettiva. Sono state formulate alcune ipotesi plausibili circa la causalità degli eventi che potrebbero portare all'attivazione e al mantenimento del processo arterosclerotico-infiammatorio in seguito all'infezione batterica cronica. Tuttavia, nessuna di esse è stata di fatto provata. Peraltro, non è noto se e quali approcci chemioterapici e/o vaccinali possano controllare la malattia. Il progetto di ricerca si propone di esplorare e definire in soggetti aterosclerotici infettati con CP: i) biomarker prognostici e predittivi (microbici e umani) dell'evento acuto della patologia; ii) meccanismi infiammatori specifici e

immunitari nell'eziopatogenesi dell'aterosclerosi che giocano un ruolo determinante nei vari stadi del processo aterogenetico; iii) individuazione di marcatori microbici immunodominanti per l'allestimento di vaccini *ad hoc*.

Risultati attesi nel triennio

A tale scopo saranno utilizzati campioni bioptici quali placche aterosclerotiche (stabili, instabili, infette e non infette con CP e sieri provenienti da soggetti caratterizzati dal punto di vista clinico e saranno controllati per la presenza di CP (diagnosi molecolare e sierologica). Per tali campioni sarà analizzato il proteoma che verrà poi confrontato con il proteoma del plasma dello stesso soggetto al momento dell'intervento con un approccio tipo *molecular signature* dell'intero repertorio proteico (elettroforesi 2D, spettrometria di massa tipo MALDI-tof e SELDI-TOF). Tramite la *Western array technology* e le varie banche disponibili online di proteomica e di spettrometria di massa umane e di CP, sarà possibile identificare e differenziare contemporaneamente proteine potenzialmente implicate nel processo immuno-patogenetico.

L'analisi funzionale del ruolo delle proteine di CP e dell'ospite identificate in proteomica, saranno studiate tramite il metodo del silenziamento post-trascrizionale dell'RNA *interference*. Il silenziamento genico permetterà di valutare il metabolismo cellulare nei sistemi di segnalazione intra ed extra cellulari in relazione ai processi patologici.

L'analisi del transcriptoma del batterio coadiuvata dagli studi *in silico genome sequence analysis* saranno la base per l'individuazione di candidati vaccinali con un approccio tipo *reverse vaccinology*.

Inoltre, tramite il nuovo strumento interdipartimentale di sequenziamento genico (GS FLX System) verrà valutata la *fitness* genomica dei ceppi di CP trovati nelle placche ateromasiche al fine di monitorare una putativa associazione tra tipo di ceppo batterico e gravità della malattia.

Trasferibilità dei risultati

A tutt'oggi mancano biomarcatori altamente sensibili e specifici in grado di fornire informazioni precise sulla stabilità e vulnerabilità delle lesioni aterosclerotiche. L'approccio proteomico parallelamente comparato tra lesioni e plasma potrà individuare questi marcatori in soggetti infetti e non con CP. Inoltre lo studio della risposta immune è di fondamentale importanza per identificare antigeni patogenetici del batterio o antigeni protettivi a scopo terapeutico/vaccinale. Inoltre è importante capire il ruolo di CP nell'induzione o *priming* continuo di una risposta autoimmunitaria/pro-infiammatoria causata da meccanismi di difesa dell'ospite in relazione ad antigeni batterici specifici (*cross*-reazioni e mimesi antigenica). L'individuazione e la messa a punto dei *biomarker* prognostici-predittivi (microbici e umani) permetterà di identificare soggetti altamente a rischio e questo sarà essenziale per la prevenzione. Infine questi marcatori saranno individuati direttamente in fluidi biologici come il plasma che rappresenta uno dei compartimenti biologici investigativi di facile accesso per il clinico e non invasivo per il paziente.

Nuovi meccanismi di immunoevasione messi in atto dal *Mycobacterium tuberculosis*: impatto sull'esito della malattia e sulle possibili strategie di intervento

Abbiamo recentemente osservato che un possibile meccanismo di immuno-evasione utilizzato dal *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) si basa sulla sovversione del differenziamento dei monociti in cellule dendritiche (DC). Le DC sono cellule che svolgono un ruolo cruciale nell'induzione della risposta immunitaria cellulo-mediata contro l'MTB. Pertanto, inibendo la generazione di DC funzionalmente attive l'MTB verrebbe a bloccare anche la risposta T-specifica fondamentale per l'induzione dell'attività *killing* dei macrofagi verso i patogeni intracellulari.

In questi anni i nostri studi hanno affrontato l'analisi dei meccanismi intracellulari responsabili della sovversione del differenziamento delle DC identificando un componente della parete cellulare come principale responsabile di tale effetto. Infatti la stimolazione delle colture con l'alfa glucano è in grado di riprodurre gli effetti osservati con il patogeno intero in quanto si osserva la diminuzione dell'espressione del CD1a, CD1c, CD80 e delle capacità presentanti l'antigene. Lo studio molecolare dei meccanismi coinvolti in questo fenomeno ha messo in evidenza il coinvolgimento delle MAPK attivate successivamente all'interazione dell'alfa glucano con uno specifico recettore presente sui monociti. Parallelamente sono stati condotti studi mirati a comprendere il ruolo delle citochine rilasciate dal monocita stimolato con MTB sul loro differenziamento in DC. Studi preliminari hanno evidenziato che l'espressione del CD1a è inibita dalla presenza di IL-10.

Risultati attesi nel triennio

Sulla base di queste evidenze i risultati del nostro progetto consentiranno di:

- caratterizzare ulteriormente i meccanismi molecolari che sottendono l'inibizione del differenziamento dei monociti infettati con l'MTB in DC;
- valutare il ruolo funzionale dei linfociti T indotti dalle DC derivate da monociti infettati con *Mycobacterium tuberculosis*;
- identificare possibili target molecolari per la messa a punto di strategie terapeutiche innovative mirate a contrastare la persistenza del micobatterio nell'ospite infettato.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti consentiranno di chiarire alcuni aspetti della strategia dell'MTB utilizzata per inibire gli effetti indotti dall'IFN di tipo I sul differenziamento dei monociti. Infatti, la caratterizzazione dei meccanismi molecolari che determinano la mancata o ridotta responsività agli effetti differenziativi dell'IFN di tipo I nelle cellule infettate con l'MTB consentirà di individuare e, possibilmente, correggere gli eventi del *signaling* che risultano alterati.

Inoltre, i nostri studi consentiranno di ottenere una visione ampia dell'interazione ospite-patogeno che potrà essere utilizzata per la messa a punto di nuove strategie immunologiche mirate a limitare la virulenza del tubercolare.

Nuovi meccanismi di immunoevasione messi in atto dal *Mycobacterium tuberculosis*: impatto sull'esito della malattia e sulle possibili strategie di intervento

Abbiamo recentemente osservato che un possibile meccanismo di immuno-evasione utilizzato dal *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) si basa sulla sovversione del differenziamento dei monociti in cellule dendritiche (DC). Le DC sono cellule che svolgono un ruolo cruciale nell'induzione della risposta immunitaria cellulo-mediata contro l'MTB. Pertanto, inibendo la generazione di DC funzionalmente attive l'MTB verrebbe a bloccare anche la risposta T-specifica fondamentale per l'induzione dell'attività *killig* dei macrofagi verso i patogeni intracellulari.

In questi anni i nostri studi hanno affrontato l'analisi dei meccanismi intracellulari responsabili della sovversione del differenziamento delle DC identificando un componente della parete cellulare come principale responsabile di tale effetto. Infatti la stimolazione delle colture con l'alfa glucano è in grado di riprodurre gli effetti osservati con il patogeno intero in quanto si osserva la diminuzione dell'espressione del CD1a, CD1c, CD80 e delle capacità presentanti l'antigene. Lo studio molecolare dei meccanismi coinvolti in questo fenomeno ha messo in evidenza il coinvolgimento delle MAPK attivate successivamente all'interazione dell'alfa glucano con uno specifico recettore presente sui monociti. Parallelamente sono stati condotti studi mirati a comprendere il ruolo delle citochine rilasciate dal monocita stimolato con MTB

sul loro differenziamento in DC. Studi preliminari hanno evidenziato che l'espressione del CD1a è inibita dalla presenza di IL-10.

Risultati attesi nel triennio

Sulla base di queste evidenze i risultati del nostro progetto consentiranno di:

- caratterizzare ulteriormente i meccanismi molecolari che sottendono l'inibizione del differenziamento dei monociti infettati con il MTB in DC;
- valutare il ruolo funzionale dei linfociti T indotti dalle DC derivate da monociti infettati con *Mycobacterium tuberculosis*;
- identificare possibili targets molecolari per la messa a punto di strategie terapeutiche innovative mirate a contrastare la persistenza del micobatterio nell'ospite infettato.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti consentiranno di chiarire alcuni aspetti della strategia dell'MTB utilizzata per inibire gli effetti indotti dall'IFN di tipo I sul differenziamento dei monociti. Infatti, la caratterizzazione dei meccanismi molecolari che determinano la mancata o ridotta responsività agli effetti differenziativi dell'IFN di tipo I nelle cellule infettate con l'MTB consentirà di individuare e, possibilmente, correggere gli eventi del *signaling* che risultano alterati.

Inoltre i nostri studi consentiranno di ottenere una visione ampia dell'interazione ospite-patogeno che potrà essere utilizzata per la messa a punto di nuove strategie immunologiche mirate a limitare la virulenza del tubercolare.

Nuovi strumenti per la manipolazione di cellule del sistema immune per l'immunoterapia dei tumori

L'immunoterapia dei tumori è principalmente basata su strategie biologiche che includono l'uso di cellule dendritiche generate *ex vivo*, caricate con antigeni tumorali e utilizzate come vaccini in grado di indurre una immunità antitumorale potettiva. Finora tali approcci 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 cellule dendritiche. 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. In questo contesto tra le citochine gli Interferoni sono potenti immunomodulatori che esplicano le loro funzioni attraverso la stimolazione di almeno 300 geni. Tra questi, una famiglia di fattori di trascrizione chiamati *Interferon regulatory factor*, tra i quali in particolare IRF-1 e IRF-8 sono in grado di modulare diverse funzioni immunologiche tra cui il fenotipo e l'attività delle cellule dendritiche. Su tale base entrambi questi fattori possono costituire dei potenti adiuvanti per la formulazione sia di vaccini antitumorali che antinfettivi. Oltre alla necessità di ottimizzare l'uso delle preparazioni vaccinali, è sempre più chiara anche la necessità di contrastare la presenza di cellule T regolatorie presenti nel microambiente tumorale e la deplezione di tali cellule in combinazione con l'immunoterapia aumenta le possibilità di eradicazione del tumore. Nostri studi recenti indicano che il fattore IRF-1 direttamente regola il differenziamento e il potenziale tolerogenico sia delle cellule dendritiche che T regolatorie. 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

- 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 Tregolatorie 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.

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 tumorali.

I risultati e i prodotti ottenuti potranno portare all'identificazione di nuovi adiuvanti per la formulazione di vaccini antitumorali efficaci.

Nuovi tool per la modulazione dello sviluppo di cellule T regolatorie e cellule Dendritiche tolerogeniche

Le cellule T regolatorie e le cellule Dendritiche definite tolerogeniche sono componenti essenziali dei processi alla base dell'induzione e del mantenimento della tolleranza immunologica. Nonostante i recenti progressi nella caratterizzazione di tali popolazioni i meccanismi regolatori e le molecole coinvolte nella generazione e nell'attività di tali popolazioni non sono ancora definiti. In particolare, le cellule T regolatorie conosciute da lungo tempo come mediatori della tolleranza verso auto-antigeni ma riconosciute attive anche verso antigeni estranei e agenti infettivi, solo recentemente sono state riconsiderate come possibili strumenti terapeutici per il trattamento di un crescente numero di patologie umane come la sclerosi multipla, il diabete di tipo I, l'artrite reumatoide e altre malattie autoimmuni 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 cellule T regolatorie circolanti. Recentemente sono stati, tuttavia, da un lato sviluppati metodi per l'espansione policlonale e antigene specifica di tali cellule e dall'altro 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 T regolatorie rappresenta l'indispensabile strumento per tale manipolazione.

Principale obiettivo del presente progetto è pertanto quello di sviluppare approcci sperimentali in grado di modulare lo sviluppo e l'attività di cellule T regolatorie attraverso l'uso di antagonisti e/o RNA interferenti di molecole che hanno dimostrato un'attività inibitoria sulle cellule T regolatorie e le cellule dendritiche tolerogeniche, quali il fattore di trascrizione coinvolto nel *signaling* dell'Interferon, IRF-1.

Risultati attesi nel triennio

- Caratterizzazione del fenotipo e dell'attività di cellule T regolatorie *in vivo* in topi *knock-out* per il fattore di trascrizione IRF-1
- 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^{high}
- 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*. È pertanto chiaro come il controllo dell'omeostasi immunitaria sia assolutamente speculare ad una risposta protettiva contro agenti estranei.

L'uso di cellule dendritiche e T regolatorie 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 e valutazione dell'efficacia di due sistemi di disinfezione basati rispettivamente sull'uso di biossido di cloro e perossido di idrogeno-argento nei confronti di Legionella

Nelle “Linee guida per il controllo e la prevenzione della legionellosi” pubblicate in Gazzetta Ufficiale nel maggio del 2000, sono indicati i metodi per ridurre la contaminazione da Legionella degli impianti idrici e di climatizzazione e quindi la trasmissione della legionellosi in ambito ospedaliero e comunitario. In particolare, nella sezione riguardante i metodi di disinfezione degli impianti, vengono indicati, tra i trattamenti di bonifica maggiormente applicati, lo shock termico e l'iperclorazione. Tali metodi, pur essendo efficaci a breve termine, a lungo termine non garantiscono un abbattimento costante della carica di Legionella. Inoltre, l'adozione ripetuta di queste procedure provoca una continua sollecitazione degli impianti, con danni a volte irreversibili, senza considerare la formazione dei sottoprodotti della disinfezione derivante dall'uso del cloro e suoi composti in concentrazioni elevate, con potenziale ricaduta negativa sulle caratteristiche di qualità dell'acqua destinata al consumo umano.

Altri sistemi di bonifica, tra cui il biossido di cloro e il perossido di idrogeno-Ag, vengono indicati nelle linee guida come possibile applicazione, poiché la loro efficacia a breve e lungo termine necessita di ulteriori verifiche sperimentali in condizioni reali. In questo studio pertanto si vuole valutare l'efficacia a lungo termine di trattamenti di disinfezione nei confronti di Legionella, effettuati con biossido di cloro e perossido di idrogeno-argento, in sistemi di distribuzione dell'acqua di presidi ospedalieri dell'Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari di Trento scelti come impianti pilota.

Per quanto riguarda la determinazione dell'attività del perossido di idrogeno-argento verranno effettuate delle prove *in vitro* adottando una modifica di un nuovo protocollo ancora in bozza elaborato dall'*European committee for standardisation* (CEN/TC 216 n461): “*Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity against Legionella pneumophila of chemical disinfectants for aqueous system – test method and requirements*”.

In base a questo protocollo l'attività del disinfettante verrà saggiata in un terreno di coltura idoneo per la crescita di Legionella. Il microrganismo in oggetto viene anche saggiato in

presenza di sostanze interferenti che simulano eventuali agenti che interagiscono con l'attività del disinfettante.

Risultati attesi nel triennio

Determinazione della dose minima di ciascun disinfettante (argento e perossido di idrogeno separatamente e dei due combinati) necessaria ad abbattere *Legionella* in un dato tempo, attraverso saggi di tipo dose-effetto e di misure dell'attività battericida in relazione al tempo di contatto (curve di *killing*).

Verifica in impianti reali dell'efficacia e affidabilità dei sistemi di disinfezione utilizzati nella ricerca, anche attraverso l'applicazione di dati *in vitro* ottenuti.

Trasferibilità dei risultati

Trasferimento delle conoscenze acquisite all'Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari (APSS) e alle Autorità Sanitarie preposte al controllo e monitoraggio della *Legionella*.

Supporto al Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali per l'aggiornamento e integrazione delle "Linee Guida per la prevenzione e controllo della legionellosi" (2000). Trasferimento di tali conoscenze alla comunità scientifica internazionale (pubblicazioni e comunicazioni a congressi).

***Plasmodium vivax* infection in pregnancy**

Plasmodium vivax è responsabile di circa 70-80 milioni di casi annui di malaria umana nel mondo. Nel mondo sono circa 25 milioni le donne in gravidanza che sono esposte all'infezione malarica da *P. vivax*. L'obiettivo principale del progetto PREGVAX è quello di descrivere le caratteristiche epidemiologiche e cliniche della malaria da *vivax* nella donne in gravidanza. Inoltre si cercherà di determinare se esiste una risposta immune specifica in gravidanza e di caratterizzare genotipicamente e fenotipicamente le popolazioni plasmodiali presenti nella placenta. Il progetto, della durata di quattro anni a partire dal primo marzo 2008, ha come ente finanziatore la Commissione Europea (FP7-HEALTH-2007A, Project n. 201558, acronimo PregVax), ha come coordinatore la Dr.ssa Clara Menendez, *Fundació Clinic per la Recerca Biomèdica*, Barcellona, Spagna ed è costituito dal seguente network: *Karolinska Institute*, Sweden; *Istituto Superiore di Sanità*, Italy; *PNG Institute of Medical Research*, Papua New Guinea; *Medical College*, Bikaner, India; *International center for genetic engineering and biotechnology*, India; *Gerência de Malária, Fundação de Medicina Tropical do Amazonas*, Brazil; *Universidad del Valle de Guatemala*; *Instituto de Inmunología*, Colombia.

L'ISS è il responsabile del *work-package* n. 3, che ha come obiettivo la caratterizzazione genetica attraverso l'analisi di geni polimorfici e di microsatelliti degli isolati plasmodiali provenienti dalle differenti aree endemiche incluse nel progetto.

Risultati attesi nel triennio

L'obiettivo principale del progetto PREGVAX è quello di descrivere le caratteristiche epidemiologiche e cliniche della malaria da *vivax* nella donne in gravidanza. Inoltre si cercherà di determinare se esiste una risposta immune specifica in gravidanza e di caratterizzare genotipicamente e fenotipicamente le popolazioni plasmodiali presenti nella placenta. L'obiettivo principale verrà raggiunto attraverso i seguenti obiettivi secondari: i) Descrizione della situazione epidemiologica dell'infezione da *P. vivax* nelle donne in gravidanza in diverse aree endemiche mondiali (America Latina, India, Asia) per mezzo: della stima della prevalenza della malattia prendendo in considerazione il momento della prima visita al centro di ANC (*Ante Natal Clinic*) e il momento del parto; della stima dell'incidenza della malattia. ii) Valutazione clinica dell'impatto dell'infezione da *P. vivax* nelle donne in gravidanza per mezzo: della situazione materna (anemia, complicazioni gravi); della situazione del feto (basso peso alla nascita, nascita prematura, infezioni congenite). iii) Studio degli aspetti patologici e

immunologici dell'infezione da *P. vivax* in gravidanza. iv) Analisi del *make-up* genetico delle popolazioni plasmodiali provenienti dalle regioni endemiche incluse nel network del progetto.

Trasferibilità dei risultati

Diminuzione del gap di conoscenza della malaria da *P. vivax*; messa a punto di nuovi protocolli clinici con la diminuzione dell'impatto dell'infezione sulla gravidanza; *capacity building* nella collaborazione nord-sud esistente all'interno del network del progetto; pubblicazioni scientifiche.

Potenzialità terapeutiche degli oli essenziali nella lotta alle infezioni opportunistiche e alla farmaco-resistenza

La recrudescenza di malattie infettive, che ormai si credevano risolte, i fenomeni dell'antibiotico-resistenza, la carenza di nuovi farmaci anti-infettivi e le continue emergenze infettive (SARS, HIV, influenza aviaria, malaria, infezioni opportunistiche, solo per citarne alcune) richiedono nuove capacità d'intervento, miglioramento delle diagnosi e soprattutto nuove soluzioni terapeutiche. Per quest'ultimo aspetto, il mondo scientifico è quindi sempre più rivolto a sperimentare l'ampio spettro di attività biologiche presentato dalle sostanze e/o molecole di origine naturale, con la prospettiva di integrare ed anche sostituire farmaci di sintesi.

Sulla base dei promettenti risultati già ottenuti (Mondello F, *et al. J Antimicrob Chemother* 2003;51:1223; *BMC Infect Dis* 2006;6:158; *J Microbiol Methods* 2009, *in press*), si propone 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 (*Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus*) e batteriche, con particolare riguardo ad alcune fra quelle che presentano notevoli problemi di trattamento con farmaci attualmente in uso (*Staphylococcus aureus* MRSA, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* vancomicina-resistente, *Legionella pneumophila* e altre Legionelle spp).

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,
- 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.

Prevenzione dell'infezione invasiva neonatale da streptococco di gruppo B (GBS) e valutazione dei sierotipi circolanti causa di malattia

Nonostante in molti ospedali venga praticato lo screening microbiologico tramite tampone vagino-rettale alla 35-37a settimana di gravidanza per individuare le donne portatrici da sottoporre a profilassi antibiotica al momento del parto, l'infezione invasiva da GBS sia precoce (0-6 gg) che tardiva (7-90 gg) nel neonato e lattante rimane una fra le più pericolose. Inoltre, la profilassi con ampicillina (o macrolidi in caso di allergia) *intrapartum* ha ridotto il numero di infezioni precoci ma non ha avuto particolare impatto sulla prevenzione delle infezioni tardive (soprattutto meningiti) che hanno spesso reliquati molto gravi e costi elevati sia economici che sociali.

Nei Paesi europei e negli Stati Uniti l'incidenza è intorno allo 0,5-1 per mille nati vivi. Nel nostro Paese non esistono studi attendibili di prevalenza raccolti attraverso una sorveglianza nazionale né una reale e recente valutazione dei sierotipi causa di infezioni. Non si conosce quali strutture ospedaliere abbiano programmi di sorveglianza e praticino lo screening per GBS delle gravide che purtroppo non rientra negli esami previsti in esenzione. Anche la profilassi antibiotica al momento del parto non è eseguita in tutti gli ospedali secondo gli stessi principi.

Allo scopo di conoscere i sierotipi circolanti e migliorare le misure di prevenzione, diagnosi e controllo dell'infezione è stato attivato uno studio policentrico nazionale comprendente 11 grandi strutture ospedaliere e coordinato dall'ISS.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio si propone la realizzazione dei seguenti obiettivi:

- Descrivere i modelli organizzativi in uso nei differenti ospedali partecipanti riguardanti i protocolli di intervento e profilassi dell'infezione invasiva neonatale da GBS, come anche le procedure per la raccolta e l'identificazione batterica al momento dello screening delle gravide allo scopo di armonizzare le procedure di carattere clinico e microbiologico. Tale valutazione permetterà, anche attraverso la produzione di un protocollo operativo e linee guida, di aumentare la capacità di diagnostica microbiologica e clinica degli ospedali.
- Determinare la prevalenza di portatrici di GBS tra le gravide e l'incidenza di infezione neonatale da GBS in relazione alla modalità di screening e di profilassi; determinare quali sierotipi siano preferenzialmente associati allo stato di *carrier* o causa di infezione.
- Creare un data base clinico e microbiologico sia per la raccolta delle schede cliniche riguardanti gli interventi profilattici utilizzati al parto in almeno 500 casi l'anno per ospedale sia l'inserimento delle tipizzazioni dei ceppi isolati da infezione e da mamme portatrici.
- Stimare la diffusione di ceppi resistenti ai macrolidi, antibiotici di seconda scelta nella profilassi, come anche vigilare e studiare l'entità della ridotta suscettibilità alla penicillina, sia a livello fenotipico che genotipico, che è un aspetto emergente nell'antibiotico-resistenza dello streptococco di gruppo B.

Trasferibilità dei risultati

L'indagine sulla prevalenza della malattia neonatale invasiva da GBS, la descrizione dei sierotipi circolanti sia causa di malattia che colonizzatori nelle gravide è particolarmente utile dato che nuovi vaccini, di cui uno sviluppato in Italia, sono in dirittura di arrivo e potrebbero essere in breve disponibili per il loro utilizzo nella nostra popolazione.

L'armonizzazione dei protocolli di intervento e profilassi attraverso la stesura di linee guida e protocolli operativi, come anche un miglioramento della consapevolezza e capacità di diagnostica microbiologica e clinica degli ospedali, potrà essere un efficace strumento per il controllo della malattia invasiva neonatale da GBS e quindi per la salvaguardia della salute del neonato e della mamma.

Prodotti di glicazione non enzimatica di proteine seriche e alterazioni minori del metabolismo del glucosio: ricerca di biomarcatori clinici di aumentato rischio di malattie cardiovascolari

Sebbene il diabete sia un noto fattore di rischio per la malattia aterosclerotica cardiovascolare, il rischio cardiovascolare associato ad una glicemia al di sotto della attuale soglia diabetica o all'insulino-resistenza è scarsamente definito e i meccanismi che ne sono alla base non sono chiari. Un meccanismo candidato è la glicazione non enzimatica. Obiettivi del progetto sono: i) valutare se cambiamenti del *pattern* di glicazione non enzimatica (proteine glicate, RAGE solubile, enzimi deglicanti, anticorpi specifici per le proteine glicate) nel sangue di soggetti con disturbi minori del metabolismo del glucosio (glicemia a digiuno nei limiti alti della norma o di poco superiore, ridotta tolleranza al glucosio, insulino-resistenza) possano avere un ruolo quali biomarcatori di un aumentato rischio cardiovascolare; ii) valutare se le proteine glicate possano giocare un ruolo patogenetico attivando meccanismi immunologici e vascolari rilevanti per lo sviluppo della malattia cardiovascolare; iii) verificare gli effetti della dieta mediterranea e di una dieta a basso indice glicemico sui *pattern* di glicazione non enzimatica, sul profilo pro-aterosclerotico e pro-trombotico e sulla presenza di disfunzione endoteliale o di aterosclerosi subclinica in soggetti con sindrome metabolica.

Il progetto si avvarrà di studi clinici integrati con approcci sperimentali *in vitro* ed *ex vivo* per sviluppare i diversi obiettivi.

Risultati attesi nel triennio

I risultati del progetto aggiungeranno informazioni riguardo l'associazione tra alterazioni nel *pattern* di glicazione non enzimatica e aumentato rischio di malattie cardiovascolari in soggetti con alterazioni minori del metabolismo del glucosio. In particolare, verranno aggiunte informazioni su: i) l'associazione di una glicemia a digiuno nel *range* alto della norma, minime alterazioni della glicemia a digiuno, alterata tolleranza al glucosio, insulino-resistenza con lo sviluppo della malattia cardiovascolare; ii) il *pattern* di glicazione non enzimatica e il profilo infiammatorio pro-aterosclerotico nel sangue periferico di soggetti con le alterazioni di cui sopra; iii) l'identificazione di biomarcatori di rischio cardiovascolare in grado di individuare soggetti ad alto rischio nelle distinte categorie di individui con alterazioni minori del metabolismo del glucosio; iv) il ruolo di specifiche proteine glicate nel promuovere meccanismi immunologici e disfunzione vascolare rilevanti per la patogenesi dell'aterosclerosi; v) gli effetti della dieta mediterranea e di una dieta a basso indice glicemico sul rischio cardiovascolare.

Trasferibilità dei risultati

- L'identificazione di biomarcatori di aumentato rischio cardiovascolare in soggetti con disordini minori del metabolismo del glucosio permetterà di identificare i soggetti ad alto rischio di eventi cardiovascolari. Tali biomarcatori potrebbero essere utili non solo per evitare lo sviluppo di malattie cardiovascolari, ma anche per monitorare l'efficacia della terapia.
- Comprendere le basi molecolari e cellulari dei meccanismi immunitari e infiammatori responsabili dello sviluppo di malattie cardiovascolari nei soggetti con disordini minori del metabolismo del glucosio aiuterà ad individuare nuovi target per lo sviluppo di

strategie terapeutiche che consentiranno di ridurre la morbilità e mortalità dovuta a eventi cardiovascolari in questa popolazione ad alto rischio.

- Ripristinare l'omeostasi dell'organismo mediante un adeguato controllo alimentare potrebbe ridurre il rischio di complicanze cardiovascolari in soggetti con alterazioni minori del metabolismo del glucosio.

Prodotti microbici come immunomodulatori per la prevenzione e terapia di patologie croniche (UO del Progetto di Ricerca Finalizzata "Individuazione di bersagli e strategie terapeutiche per patologie croniche e immunodisregolative ad alta prevalenza", ISS)

Evidenze derivate da studi epidemiologici e sperimentali hanno condotto all'ipotesi che la stimolazione del sistema immunitario da parte di prodotti microbici possa contribuire alla prevenzione alla terapia di patologie immunodisregolative quali le malattie allergiche e autoimmuni. Sono state studiate le proprietà immunomodulanti sia di prodotti e componenti di batteri non patogeni, sia di derivati non tossici di tossine di batteri patogeni, sia di componenti antigeniche di parassiti elminti. In questo ambito, il presente progetto si propone di valutare le proprietà immunomodulanti di questi prodotti microbici attraverso tre differenti approcci sperimentali, due dei quali prevedono lo sviluppo di modelli murini delle patologie in esame, e il terzo uno studio clinico sull'uomo.

- Nel settore delle patologie allergiche respiratorie, verrà studiata l'attività immunomodulante preventiva e terapeutica di estratti di miscele probiotiche somministrati per via mucosale in modelli murini di sensibilizzazione allergica verso allergeni inalanti di notevole rilevanza nella sensibilizzazione spontanea di pazienti allergici.
- Sulla base della recente dimostrazione da parte del gruppo proponente che la somministrazione orale della subunità B della tossina colerica (CT-B) a topi con colite sperimentale Th-1 mediata (colite da TNBS) è in grado di influenzare il decorso della malattia, ci si propone di valutare la capacità di CT-B e/o CT di indurre ed espandere cellule regolatorie per un loro possibile uso in protocolli terapeutici di prevenzione della riacutizzazione mediante somministrazione diretta (CT-B) e/o immunoterapia adottiva (cellule T regolatorie espanse *in vitro* mediante incubazione con CT). Nello stesso modello di patologia verrà valutato l'utilizzo *in vivo* a scopo terapeutico di molecole antigeniche di *Echinococcus granulosus*, parassita elminta che infesta il cane come ospite definitivo e l'uomo come ospite intermedio, capaci di interagire direttamente con il sistema immunitario umano agendo a livello dei neutrofili, delle cellule dendritiche e dei linfociti T e B.
- Nello studio clinico sull'uomo (supportato dai risultati di studi su modelli murini di colite che hanno evidenziato la capacità di batteri probiotici di attenuare il decorso di una colite successivamente reindotta), verrà valutata la capacità di batteri probiotici di espandere le cellule regolatorie della mucosa intestinale umana per la profilassi delle riaccensioni cliniche in pazienti con malattie infiammatorie croniche intestinali.

Risultati attesi nel triennio

- Approfondimento delle conoscenze sui meccanismi patogenetici del danno in corso di malattie infiammatorie croniche e autoimmuni, al fine di ottimizzare le scelte di antigeni vaccinali e di adeguati adiuvanti, e di disegnare nuove strategie terapeutiche con sostanze immunomodulatorie.
- Nuovi strumenti preventivi e terapeutici per il controllo delle patologie basate sulla infiammazione cronica e disregolazione del sistema immunitario e sulle complesse

interazioni tra sistema immunitario e stimoli da parte di agenti infettivi. Tali strumenti comprendono batteri probiotici e loro componenti, tossine e tossoidi di batteri patogeni, antigeni e prodotti di parassiti elmintici, nuove molecole ipoallergeniche.

Trasferibilità dei risultati

I seguenti risultati o prodotti originati dal progetto saranno potenzialmente trasferibili alla clinica e all'SSN a breve-medio termine: i) Conoscenze di base: sui meccanismi patogenetici di alcune malattie infiammatorie croniche da disregolazione immunitaria, prese in considerazione nel progetto, per individuare punti d'interferenza per terapie innovative; sul meccanismo d'azione di prodotti immunomodulatori già in uso o di nuove molecole, al fine di individuare target cellulari attraverso i quali bloccare o interferire con i meccanismi patogenetici di malattie croniche da disregolazione immunitaria; modelli animali per lo studio di nuove terapie per malattie croniche da disregolazione immunitaria. ii) Conoscenze di tipo applicativo: per il disegno di strategie preventive e terapeutiche innovative verso malattie croniche da disregolazione immunitaria, in associazione o in alternativa alle terapie standard. iii) Coinvolgimento di partner industriali potenzialmente interessati alla nuova applicazione dei farmaci già in uso o all'eventuale sviluppo di nuove molecole per la terapia di malattie croniche da disregolazione immunitaria. I risultati di questi studi saranno oggetto di comunicazioni a congresso e di pubblicazioni su riviste internazionali.

Profili di microRNA nei tumori associati ad infezione HBV e HCV e predizione di geni target con approcci computazionali

Al progetto partecipa il Reparto Epatiti virali.

Le infezioni croniche da virus dell'epatite B (HBV) e dell'epatite C (HCV) sono fattori di rischio per linfoma non-Hodgkin a cellule B (B-NHL), leucemia linfatica cronica (CLL) ed epatocarcinoma (HCC).

È stata riportata la possibilità di predire le caratteristiche di varie neoplasie in base ai profili di espressione dei microRNA (miR), responsabili della regolazione traduzionale degli mRNA. Poco è noto tra deregolazione dei miR nei tumori e agenti infettivi; alcuni miR sono implicati nella replicazione di HCV.

Il progetto si articola in due sottoprogetti (ad oggi finanziato il primo):

- Profili di miR in pazienti con leucemia o linfoma positivi per HBV e/o HCV
Obiettivo: ricerca di profili di espressione dei miR correlabili all'agente infettivo coinvolto in pazienti affetti da B-NHL o CLL cronici per HBV o HCV. Il progetto (finanziamento: euro 28.000 in due anni) afferisce all'Unità: *Hepatitis viruses, microRNAs and lymphoproliferative diseases*, (CNESPS, ISS), inserita nel Progetto associato al Programma Integrato di Oncologia, Area tematica 1, Proponente: ISS. Titolo: Identificazione di profili di rischio nella popolazione per lo sviluppo di interventi di prevenzione.
- Profili di miR nell'epatocarcinoma da HBV e/o HCV
Obiettivo: ricerca di profili miR in grado di classificare molecolarmente l'HCC e identificare precocemente pazienti ad alto rischio o la presenza di HCC.

Risultati attesi nel triennio

I livelli d'espressione dei miR saranno analizzati quantitativamente mediante *Real-Time* PCR da RNA totale estratto da tessuti ottenuti da pazienti suddivisi in tre gruppi: HBV-positivi, HCV-positivi, HBV-HCV negativi. Si valuterà la possibilità di utilizzare l'innovativo sistema di *Massively Parallel Sequencing* (nella variante di utilizzo per analisi degli *small RNA*) su apparecchiatura GS FLX.

Verranno impiegati anche tessuti inclusi in paraffina, di cui è già dimostrata la sovrapponibilità dei profili miR con quelli ottenibili da campioni congelati: tali tessuti rappresentano un enorme potenziale per condurre studi su più vasta scala, stante l'abbondanza presso i laboratori di anatomia patologica. Per quanto riguarda l'HCC da HBV, verranno in seguito esaminati anche campioni di HCC del modello animale di epatite B WHV/*Marmota monax*, utilizzando campioni selezionati che più verosimilmente mimano l'HCC umano perché privi di alterazioni molecolari modello-specifiche.

I profili ottenuti permetteranno di definire profili di rischio, effettuare una classificazione molecolare delle patologie, ed evidenziare differenze correlabili specificamente all'agente infettivo coinvolto. Con approcci computazionali e banche dati specifiche disponibili online, saranno predetti i potenziali geni target dei miR differenzialmente espressi, che potrebbero divenire potenziali target di terapia. Infine, i dati potranno fornire indicazioni sul ruolo di HBV ed HCV nella genesi di B-NHL, CLL, HCC.

Trasferibilità dei risultati

L'identificazione di specifici profili di espressione di miRNA associati al tipo di infezione (HBV o HCV) in B-NHL, CLL ed HCC, permettendo una miglior classificazione della patologia, ha potenziali implicazioni nella pratica clinica per quanto attiene a diagnosi, prognosi, scelta e monitoraggio di efficacia della terapia.

Singoli miR potrebbero diventare bio-marcatori sierologici precoci, indicatori di rischio in pazienti HBV ed HCV positivi, in quanto alcuni studi hanno riportato che miR specificamente *up-regolati* in determinate patologie sono rilevabili precocemente nel sangue circolante del paziente.

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: è già stato descritto che l'utilizzo di molecole denominate "antagomir" è in grado di sopprimere sperimentalmente nel topo specifici miR nel tessuto epatico.

Progetto finalizzato Ministero della sanità: Ricerca finalizzata 2006: il buon uso dell'organo. Titolo: "Effetti clinici e biologici della genetica dei trapianti" UO n. 3

La compatibilità degli antigeni HLA rimane un fattore cruciale nella selezione dei donatori nei trapianti d'organi e di cellule ematopoietiche. Nel caso di due o più donatori egualmente compatibili per l'HLA con il ricevente, il criterio di scelta diventa la compatibilità a livello di quei geni non-HLA che risultano essere in grado di influenzare l'esito del trapianto. Il polimorfismo di tali geni può, quindi, assumere rilevanza clinica nella scelta del donatore in modo da limitare le possibilità di rigetto. Questa Unità Operativa si ripropone di avviare una ricognizione sull'esistenza di studi sul polimorfismo dei geni non-HLA e, se vi sono le condizioni necessarie, di mettere a punto un protocollo per effettuare un controllo di qualità sulle analisi di biologia molecolare utilizzate per l'identificazione dei polimorfismi a carico di tali geni. L'obiettivo principale è quello di rendere omogenee le procedure metodologiche sul territorio e ottimizzarne i risultati.

Il primo passo consiste in una fase ricognitiva sui laboratori che partecipano ai controlli di qualità sulla tipizzazione HLA per conoscere lo stato attuale della esecuzione di test genetici sul polimorfismo di geni non-HLA per motivi assistenziali o di ricerca. In una fase successiva, qualora vi sia un numero adeguato di laboratori interessati a questa ricerca, la nostra unità operativa si ripropone di definire un protocollo per il controllo di qualità su queste analisi, in modo da rendere omogenee le procedure metodologiche e ottenere una ottimizzazione dei risultati, nell'interesse dei laboratori che partecipano allo studio. Questo progetto si basa

interamente sull'invio di campioni di sangue su cui effettuare le analisi, sulla raccolta dei dati per via telematica e sulla elaborazione dei dati stessi.

Risultati attesi nel triennio

Per questo è stato proposto un questionario a tutti i laboratori che già partecipano al controllo di qualità per la tipizzazione HLA organizzato dall'ISS e che afferiscono al Registro Italiano dei Donatori di Midollo Osseo. Hanno risposto 32 laboratori su 34 interpellati e da questa prima analisi si è potuto constatare che circa la metà dei laboratori che eseguono le tipizzazioni HLA per il sistema di trapianto (prevalentemente quello di staminali emopoietiche) eseguono analisi di polimorfismi genetici diversi da quelle HLA. Si è potuto però osservare che un certo numero di laboratori sono impegnati nell'analisi del microchimerismo dopo trapianto di cellule staminali emopoietiche. Si è quindi proceduto ad esplorare se vi fosse un'esigenza di standardizzazione per questa attività. La maggior parte dei laboratori eseguono questa indagine a scopo assistenziale, e il risultato di questo test può influenzare il decorso clinico del trapianto. Risulta quindi evidente la necessità di avviare un controllo di qualità (CQ) per questa analisi.

Dopo un'ulteriore ricognizione, sono stati identificati 12 laboratori che si sono dichiarati disponibili ad un CQ 2009 su microchimerismo. Il numero di laboratori è sufficiente per avviare un CQ che confronti i risultati di ciascun laboratorio con quello di riferimento condiviso da almeno il 75% dei laboratori. Si è quindi avviata la valutazione dell'organizzazione del CQ.

Trasferibilità dei risultati

La messa a punto di un controllo di qualità sul microchimerismo è un passo fondamentale per la sua possibile utilizzazione in campo clinico. L'obiettivo è quello di inserire in futuro tale controllo nell'attività istituzionale già svolta dall'ISS in collaborazione con il CNT, che prevede la gestione dei controlli di qualità in immunogenetica, secondo la legge 91/99 sui trapianti di organi e tessuti. Si intravede, infatti, la necessità di avviare programmi di qualità per la valutazione dei laboratori che impiegano – per motivi assistenziali – test di immunogenetica oltre alla tipizzazione HLA. Alcuni dei laboratori inseriti in questo studio partecipano a controlli di qualità sul microchimerismo gestiti da organizzazioni internazionali (ASHI, UKNEQAS).

Progetto nazionale di Sorveglianza delle malattie batteriche invasive

Le malattie batteriche invasive (meningiti, sepsi, polmoniti batteriemiche e altri quadri clinici con isolamento di batteri da siti normalmente sterili) rappresentano una importante causa di morbilità, e sono caratterizzate da una elevata frequenza di gravi complicanze. Dal punto di vista clinico, tali malattie presentano una sintomatologia scarsamente specifica per singolo agente eziologico. L'accertamento della loro eziologia è quindi di estrema importanza, non solo ai fini terapeutici e per la eventuale profilassi dei contatti, ma anche per quanto riguarda la loro prevenzione primaria.

Sono infatti ad oggi disponibili vaccini efficaci già nel primo anno di vita per la prevenzione delle infezioni da *Haemophilus influenzae* di tipo b (Hib), da meningococco C, e da sette sierogruppi/tipi di pneumococco. La conoscenza dei casi di malattia dovuti a questi patogeni è quindi fondamentale per stimare la quota di casi prevenibili, e l'impatto delle strategie intraprese.

Il presente progetto ha quindi il compito di attivare a livello nazionale la sorveglianza di tutte le malattie batteriche invasive causate da meningococco, pneumococco e *Haemophilus*: i) stimando la quota di queste infezioni invasive prevenibili da vaccino, ii) garantendo la caratterizzazione del fenotipo e del genotipo della maggior parte degli isolamenti, iii) indagando i casi di fallimento vaccinale e studiandone i fattori di rischio.

Risultati attesi nel triennio

Le schede trasmesse a livello nazionale (ISS) verranno archiviate su database accessibile via interfaccia web, protetto da password. I dati verranno analizzati a cadenza trimestrale, ottenendo il numero di segnalazioni per agente eziologico, inclusa la distribuzione per sierogruppo/sierotipo, sito di isolamento, quadro clinico, fascia di età e regione.

Annualmente i dati verranno confrontati e integrati con le altre fonti disponibili (in particolare, per la malattia meningococcica con le notifiche di classe II). Verranno quindi calcolate le stime di incidenza su base annuale, per agente eziologico, fascia di età e regione.

La caratterizzazione fenotipica e genotipica effettuata su tutti i ceppi inviati al laboratorio dell'ISS permetterà rispettivamente di confermare casi di fallimento vaccinale e la circolazione di specifici cloni virulenti.

Trasferibilità dei risultati

I risultati della sorveglianza saranno disponibili a cadenza trimestrale sul sito web dedicato dell'ISS in forma di tabelle e grafici con dati aggregati. È previsto inoltre un report annuale. Workshop e incontri periodici saranno organizzati con la rete dei collaboratori alla sorveglianza. La pubblicazione su riviste internazionali permetterà la diffusione dei risultati raggiunti anche a livello della comunità scientifica internazionale.

Progetto-pilota di monitoraggio della farmaco resistenza di *Plasmodium falciparum* in Tanzania e Sudan

Il progetto di ricerca è parte dell'attività del WHO *Collaborating Centre for Research and Training in Tropical Diseases Control* attivato presso il Reparto di Malattie trasmesse da vettori e sanità internazionale. Le raccomandazioni della WHO hanno indotto i Ministeri della Sanità di molti Paesi ad endemia malarica ad adottare una terapia basata sull'associazione tra farmaci antimalarici tradizionali e derivati dell'artemisinina. Tale approccio terapeutico dovrebbe impedire o ritardare la comparsa della farmacoresistenza, oltre che ad assicurare una elevata efficacia nei confronti di *P. falciparum* multiresistente. Sono stati identificati geni e punti di mutazione responsabili della resistenza ai farmaci. Due mutazioni, K76T e A220S, sono essenziali per la resistenza di *P. falciparum* alla cloroquina; mutazioni puntiformi nei geni per la diidrofolato reductasi e diidropteroato sintetasi di *P. falciparum* sono associati alla resistenza alla sulfadossina-pirimetamina. Una recente pubblicazione ha messo in luce resistenza ai derivati dell'artemisinina in Cambogia. La caratterizzazione genomica dei ceppi circolanti di *P. falciparum*, verrà effettuata su un numero significativo di campioni di sangue raccolti su carta da filtro.

Risultati attesi nel triennio

Lo screening molecolare di isolati di *P. falciparum* raccolti nei Paesi sopra menzionati e i risultati dei test *in vitro* consentiranno di contribuire alla definizione della correlazione tra l'evento molecolare e l'efficacia del farmaco e alla pianificazione degli interventi terapeutici.

Trasferibilità dei risultati

I risultati saranno messi a disposizione dell'NMCP per la valutazione della campagna antimalarica ordinaria.

Proteasi mucosali e loro inibitori nelle malattie infiammatorie croniche intestinali: dalla etiopatogenesi alle terapie innovative

Evidenze ottenute in modelli sperimentali di colite e osservazioni nei pazienti con malattie infiammatorie croniche dell'intestino, suggeriscono un ruolo cruciale della flora batterica nel mantenimento dell'infiammazione. In questi pazienti, l'esposizione alla flora intestinale sarebbe

in grado di scatenare una risposta immunitaria aberrante con conseguente instaurarsi di una infiammazione cronica. Le proteasi e i loro inibitori sono coinvolte nella risposta alla flora intestinale influenzando tutte le componenti della barriera intestinale (muco, cellule epiteliali e cellule infiltranti la lamina propria). Polimorfismi genici interessanti la loro sintesi potrebbero contribuire all'instaurarsi della malattia o a condizionarne il tipo di decorso.

Nell'ambito di un ampio progetto europeo tendente ad identificare le proteasi e i loro inibitori a rilevante impatto sulla patogenesi della malattia, questo progetto si propone lo studio della modulazione delle proteasi e dei loro inibitori durante lo sviluppo delle alterazioni infiammatorie.

A questo scopo verrà studiata l'espressione delle proteasi e dei loro inibitori in vari modelli di colite sperimentale. In particolare sarà studiata la colite acuta indotta da somministrazione intrarettale di TNBS e la sua forma cronica ricorrente. In quest'ultima forma verrà anche valutato il peso della mutazione NOD2 sulla sintesi delle proteasi e sullo sviluppo di fibrosi.

Risultati attesi nel triennio

Conoscenza delle proteasi chiave legate geneticamente e meccanicisticamente allo sviluppo delle malattie infiammatorie croniche dell'intestino.

Trasferibilità dei risultati

Interventi terapeutici di blocco e/o iperespressione selettiva delle proteasi che svolgono un ruolo chiave nella patogenesi. Possibilità di individuare soggetti a rischio di malattia per la presenza di polimorfismi genici.

Realizzazione di nuovi saggi per la tipizzazione molecolare di streptococchi beta emolitici

Sebbene l'identificazione di un batterio patogeno a livello di specie sia sufficiente nell'intervento terapeutico dell'infezione, la possibilità di risalire alla sorgente di una epidemia o l'identificazione di cloni emergenti che sfuggono alle strategie profilattiche o terapeutiche richiede ulteriori strumenti di indagine.

Gli studi epidemiologici si basano soprattutto su saggi molecolari che forniscono una differenziazione dei ceppi batterici sulla base dell'analisi delle regioni genomiche variabili. Spesso però molte tecniche non forniscono un profilo genetico codificabile e inseribile in un database per un confronto interlaboratorio oppure non sono applicabili a tutte le specie. Nel caso degli streptococchi, ad esempio, spesso lo studio della genetica di popolazione tramite PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) si è rivelata insoddisfacente ma anche l'MLST (*MultiLocus Sequence Typing*) è spesso poco discriminativa.

Esiste inoltre l'esigenza di migliorare metodiche già utilizzate per permettere l'identificazione di nuovi sierotipi oppure di sostituire tecniche troppo elaborate, difficilmente trasportabili in laboratori poco attrezzati.

A tal fine, la realizzazione di nuovi saggi per la tipizzazione molecolare degli streptococchi arricchirebbe il bagaglio strumentale a disposizione del ricercatore per poterne studiare la genetica di popolazione ed eventualmente migliorare la conoscenza delle differenze tra ceppi isolati da portatore o causa di infezione invasiva.

Risultati attesi nel triennio

L'analisi del polimorfismo di sequenze nucleotidiche ripetute in tandem (MLVA) oppure l'analisi di CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*) nei genomi disponibili di *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus agalactiae* sono in corso di studio per identificare i possibili candidati per questa metodica di tipizzazione molecolare. A tal fine è stato sviluppato un programma, in collaborazione con ricercatori del Dipartimento TES, che implementa il software *Tandem Repeats Finder* disponibile online permettendo l'analisi

contemporanea di tutti i genomi disponibili, facilitando e velocizzando la scelta dei candidati. L'analisi della variabilità delle regioni ripetitive prescelte, amplificate tramite PCR, avviene tramite elettroforesi capillare in collaborazione con ricercatori del Centro Studi e Ricerche di Sanità Medica dell'Esercito della Difesa di Roma.

I metodi di tipizzazione molecolare dell'operone della capsula di *Streptococcus agalactiae* disponibili non includono tutti i sierotipi finora identificati e possono essere non alla portata di tutti i laboratori. Lo sviluppo di una multiplex PCR di facile applicazione e lettura è in fase di elaborazione.

Trasferibilità dei risultati

La realizzazione di nuovi metodi di tipizzazione molecolare di facile e veloce applicazione, facilmente codificabili per una riproducibilità e confronto interlaboratorio possono offrire ulteriori strumenti di tipizzazione oltre quelli già disponibili e fornire una descrizione più accurata della genetica di popolazione degli streptococchi beta emolitici alla comunità scientifica interessata a distinguere tra ceppi di portatore e ceppi causa di infezione invasiva e all'identificazione e tracciabilità di particolari cloni.

Rete di cooperazione delle terme Mediterraneo: analisi delle principali componenti organiche e microbiologiche (Legionella) delle acque termali in Italia

Le strutture termali sono considerate tra i luoghi più favorevoli alla insorgenza di legionellosi per numerose ragioni:

- perché frequentate da persone a rischio di contrarre l'infezione;
- per la possibilità di esposizione diretta ad aerosol (prodotto da specifiche apparecchiature, vasche per idromassaggio, ecc.);
- per la presenza di acque, che spesso sgorgano ad una temperatura ideale per la crescita di Legionella.

Non è presente fortunatamente in Italia un elevato numero di casi ascrivibili a stabilimenti termali, tuttavia come per le strutture turistico- ricettive e i nosocomi l'approccio pragmatico è quello di fare il possibile per mettere in atto tutte le misure necessarie alla prevenzione della malattia e, quindi, alla tutela della salute pubblica.

Non sono presenti in letteratura dati che dimostrino il livello di contaminazione da Legionella negli stabilimenti termali né se questo possa essere messo in relazione alla tipologia delle acque presenti.

Risultati attesi nel triennio

- La determinazione della carica di Legionella in sei tipologie di acque presenti nelle nostre strutture termali ed eventualmente nelle altre matrici utilizzate;
- Individuazione delle principali componenti organiche e correlazione tra contaminazione da Legionella e tipo di acqua.

Trasferibilità dei risultati

Una approfondita conoscenza delle caratteristiche batteriologiche e chimiche delle acque consentirà l'adozione delle misure preventive più idonee per tutelare la salute dei pazienti cercando di rispettare allo stesso tempo le caratteristiche dell'acqua termale stessa.

Risposta immunitaria nella echinococcosi cistica: diagnosi e immunoregolazione

Il nostro gruppo di ricerca da molti anni svolge studi volti a chiarire problematiche immunologiche coinvolte nella echinococcosi cistica seguendo due direzioni: migliorare la diagnosi e chiarire il rapporto ospite-parassita. Sono state caratterizzate molecole antigeniche che interagiscono con il sistema immunitario umano a livello dei neutrofili, delle cellule

dendritiche e dei linfociti T e B. Abbiamo dimostrato che l'infezione da *Echinococcus granulosus* è associata ad una predominante risposta di tipo Th2. Studi epidemiologici hanno messo in relazione la presenza di infezioni da elminti con una minore predisposizione a malattie autoimmuni (Th1). Parassiti, o sostanze da loro derivate, possono risultare efficaci per il trattamento di malattie autoimmuni. Il presente progetto si propone di continuare lo studio dell'interazione del sistema immunitario umano con *E. granulosus* per ottimizzare la diagnosi e approfondire i meccanismi immunopatologici della parassitosi. La valutazione dell'effetto immuno-modulante delle molecole antigeniche aprirà la via a nuove strategie terapeutiche per la parassitosi stessa e per le malattie infiammatorie croniche (Th1). Obiettivi principali: i) Identificare molecole diagnostiche mediante tecniche di biologia molecolare. ii) Valutare *in vitro* l'effetto di tali molecole su cellule del sistema immunitario murino e umano e chiarire il rapporto ospite-parassita.

Risultati attesi nel triennio

Le diverse problematiche della ricerca, che vengono affrontate da molti anni nel nostro laboratorio, rappresentano nel loro insieme punti complementari tra loro, indispensabili per il raggiungimento a breve e a lungo termine degli obiettivi primari. I risultati potranno contribuire ad ampliare i dati sperimentali ed epidemiologici disponibili sulle elmintiasi e a sviluppare nuove strategie per la terapia di malattie infiammatorie croniche. L'isolamento e la caratterizzazione di molecole costitutive di *E. granulosus* e la valutazione del loro ruolo nella complessa relazione ospite-parassita costituiscono il principale obiettivo della ricerca. Tali risultati permetteranno di sviluppare nuove strategie terapeutiche manipolando selettivamente le risposte immunitarie al parassita e affiancando all'azione del chemioterapico, spesso parziale a causa di fenomeni di tossicità o di chemioresistenza, un rafforzamento delle difese immunologiche dell'ospite. Altro aspetto critico sarà la valutazione degli effetti immunomodulanti in modelli murini di malattia di Crohn e di colite ulcerosa indotta da acido trinitrobenzensulfonico allo scopo di ipotizzare possibili applicazioni terapeutiche.

Trasferibilità dei risultati

Industrie farmaceutiche.

Ruolo dei biocidi nell'induzione dell'antibiotico resistenza 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

crescituti 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*) e NF- κ B nella patogenesi dell'AIDS e nella riattivazione di HIV-1 dalla latenza

L'espressione del virus HIV-1 e i meccanismi patogenetici che determinano lo sviluppo dell'infezione e delle patologie ad essa associate, dipendono in larga misura dall'interazione tra fattori cellulari e virali la cui definizione costituisce la base per lo sviluppo di interventi volti sia a limitare la replicazione virale che la progressione della malattia. Queste interazioni determinano infatti sia i livelli di espressione virale nei diversi tessuti, che la capacità del virus di modificare la fisiologia cellulare e quindi la risposta immune. Tra i fattori cellulari coinvolti nella trascrizione del genoma di HIV-1, NF- κ B e alcuni fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia IRF, in particolare IRF-1 e IRF-8, 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 che rappresenta ad oggi l'unico regime terapeutico in grado di tenere sotto controllo l'infezione virale. Sia i macrofagi che i linfociti mantengono copie del provirus integrato e trascrizionalmente silente ma competente per la replicazione, e non vengono né riconosciute dal sistema immunitario né dalla terapia antiretrovirale. La riattivazione del virus poi da *stimuli* diversi determina il *rebound* della carica virale e la persistenza dell'infezione. 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 progetto riguarda lo sviluppo da una parte di sistemi in grado di bloccare selettivamente la sintesi e l'attività dei fattori NF- κ B e IRF nelle cellule target dell'infezione produttiva, e dall'altra di sistemi per l'attivazione costitutiva di NF- κ B attraverso l'inibizione del legame con il suo inibitore I κ B α nelle cellule latentemente infettate.

Risultati attesi nel triennio

- Produzione di vettori lentivirali inducibili esprimenti il super-repressore I κ B- α 2N Δ 4.
- Definizione del contributo relativo di IRF-1 e di NF- κ B nell'indurre la trascrizione dell'LTR e la formazione di un complesso NF- κ B / IRF-1 sulla regione *enhancer*. Questo permetterà di stabilire se la sola inibizione di NF- κ B sia in grado di eliminare anche il contributo di IRF-1 alla transattivazione del promotore virale.
- 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- κ B.
- Costruzione di vettori lentivirali in grado di esprimere tali sequenze di RNA in cellule primarie.
- Sviluppo di molecole da usare come farmaci in grado di bloccare selettivamente il legame tra NF- κ B e il suo inibitore I κ B α .

Trasferibilità dei risultati

La strategia di bloccare l'attivazione di NF- κ B in cellule primarie T CD4+ mediante un vettore lentivirale in grado di esprimere un super-repressore di NF- κ B in maniera inducibile, rappresenta un tentativo di approccio terapeutico innovativo di tipo genetico/molecolare volto a ingegnerizzare stabilmente delle cellule T primarie per renderle, una volta infettate con HIV-1, un ambiente poco adatto alla replicazione del virus e al tempo stesso favorirne l'eliminazione

mediante apoptosi, prima che queste siano in grado di produrre quantità significative di progenie virale.

Inoltre l'idea di attivare, nelle cellule latentemente infettate, il virus non con approcci classici più generici, quali citochine infiammatorie che comunque determinerebbero un generale stato di attivazione immunitaria dannoso per l'individuo o inibitori delle deacetilasi poco efficaci nel caso di promotori virali stabilmente complessati con gli istoni deacetilati, ma attraverso l'uso di molecole farmacologicamente attive in grado attivare direttamente un fattore stimolante la trascrizione virale, rappresenta un approccio innovativo nelle strategie terapeutiche di eliminazione dei *reservoir* dell'infezione.

Ruolo della differenza di genere nella patogenesi delle malattie autoimmuni

Il *Lupus* eritematoso sistemico (LES) è una malattia cronica di natura autoimmune, che può colpire diversi organi e tessuti caratterizzato da una frequenza nove volte più alta nelle donne. È ormai noto che gli estrogeni giocano un ruolo importante nella eziopatogenesi del LES potenziando la sopravvivenza e stimolando le cellule autoimmuni. La sindrome di Behcet o la malattia di Behcet (BD) è una vasculite sistemica di origine immunomediata, caratterizzata da ricorrenti ulcere orali e genitali, con un interessamento agli occhi, alle articolazioni, alla pelle, ai vasi sanguigni e al sistema nervoso. BD ha una frequenza equivalente nei due sessi, ma negli uomini presenta un decorso più severo. Il coinvolgimento degli estrogeni nella BD non è noto.

Gli estrogeni esercitano la loro funzione mediante il legame a due distinti recettori intracitoplasmatici, ERa e 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. A tutt'oggi non è ancora nota l'espressione di ERa e ERb sulla superficie di cellule del sistema immunitario e la loro funzione.

Risultati attesi nel triennio

In generale il risultato atteso di tale progetto è la comprensione del ruolo dei recettori degli estrogeni nell'attivazione/inattivazione delle cellule del sistema immunitario, valutando sia in donatori sani che in pazienti affetti da LES o BD:

- l'espressione di ERa e ERb di superficie e intracellulare in differenti sottopopolazioni linfocitarie (T, B e NK cell);
- le differenti vie di trasduzione del segnale (es. Ca⁺⁺, 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.

Ruolo delle vie di attivazione mediate *in trans* dal CD28 e IL-15R sulla immunomodulazione delle cellule T regs e Th-17 nella psoriasi

La psoriasi è probabilmente la malattia autoimmune della pelle con maggiore incidenza negli adulti. Nelle lesioni psoriasiche sia i linfociti Treg che i Th17 sono funzionalmente alterati. Ciò

suggerisce che un'alterazione delle vie biochimiche, che regola il corretto equilibrio tra Treg e Th17, potrebbe avere conseguenze sullo sviluppo della malattia. È interessante notare che le principali differenze tra TCR e CD28 sono le condizioni di legame con i rispettivi ligandi. Infatti, le interazioni CD28/B7 sono molto più veloci di quelle MHC/peptide/TCR e la loro stabilità può essere rafforzata dall'avidità. Questo suggerisce che il segnale del CD28 potrebbe essere predominante in quelle situazioni in cui l'espressione delle molecole B7, che legano il CD28, sia particolarmente elevata, come nel caso della lesione psoriasica. Pertanto lo studio degli effetti dei segnali del CD28 su Treg e Th17 nella psoriasi rappresenta un importante argomento che potrebbe contribuire a chiarire la relazione tra l'attivazione delle Treg e quella dei Th17. Tra le molte citochine sovraesprese nella lesione psoriasica, si ritiene che l'IL-15 espliciti un ruolo cruciale. Essa possiede la peculiare caratteristica di essere presentata *in trans* dalle APC ai linfociti T effettori. Dati controversi in letteratura suggerirebbero un coinvolgimento dell'IL-15 nell'induzione di cellule Treg e nell'espansione di Th17. La comprensione, quindi, dei precisi effetti dell'IL-15 sull'attivazione dei linfociti Th17 e Treg è un'interessante problematica da affrontare.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si propone di studiare l'effetto della stimolazione del CD28 e del *pathway* dell'IL-15 sulla induzione/espansione dei linfociti Th17 e Treg in una situazione infiammatoria caratterizzata dall'alto livello di espressione delle molecole costimolatorie. A tale scopo sarà analizzato l'effetto del *triggering* del CD28 e dell'IL-15R sui linfociti T in termini di espressione di FOXP3 e IL-17, analisi molecolare delle vie biochimiche coinvolte (ROR- γ , STAT5), eventuale differenza tra gli effetti dell'IL-15 solubile o presentata *in trans* dalle APC (monociti, granulociti e cellule dendritiche).

Trasferibilità dei risultati

La conoscenza approfondita dei meccanismi che, a partire dai *pathway* del CD28 e dell'IL-15, influenzano l'attivazione dei linfociti T regolatori e/o Th17 consentiranno di identificare nuovi target terapeutici per contrastare l'induzione e/o la cronicizzazione dell'infiammazione tipica della psoriasi e altre patologie autoimmuni.

Ruolo di autoanticorpi specifici per ATP sintasi nella patogenesi della malattia di Alzheimer

I meccanismi patogenetici alla base della malattia di Alzheimer sono essenzialmente correlati con l'accumulo di proteine ripiegate in modo anormale in specifiche aree del cervello, con conseguente morte neuronale. Recentemente, è stata evidenziato che meccanismi infiammatori ed autoimmuni sono coinvolti nella patogenesi della malattia di Alzheimer. In esperimenti preliminari, mediante un approccio di immunoproteomica, abbiamo individuato la presenza autoanticorpi specifici per la subunità beta dell'ATP sintasi nel siero di pazienti con malattia di Alzheimer. L'ATP sintasi è un complesso enzimatico responsabile della sintesi di ATP ed è espresso sulla membrana delle cellule neuronali. Scopo di questo progetto sarà quello di valutare il ruolo patogenetico di questi autoanticorpi nella malattia di Alzheimer studiando la loro capacità di modulare o bloccare l'attività enzimatica dell'ATP sintasi. Valuteremo l'effetto degli autoanticorpi *in vitro* su cellule neuronali e *in vivo* in un modello murino di Alzheimer familiare (Tg2576 APPsw). Inoltre, valuteremo la correlazione tra il titolo anticorpale nel siero, il grado di demenza dei pazienti e il polimorfismo dei geni APOE e del precursore della proteina amiloide.

Risultati attesi nel triennio

- Comprendere il ruolo degli anticorpi anti-ATP sintasi nella sintesi e/o idrolisi dell'ATP, nella variazione del pH intracellulare, nella modulazione dell'*uptake* dell'HDL e

nell'induzione di apoptosi/autofagia cellulare. Le linee cellulari utilizzate saranno la linea di neuroblastoma SH-SY5Y e i neuroni dell'ippocampo di ratto.

- Comprendere il ruolo degli anticorpi anti-ATP sintasi nell'induzione di degenerazione e morte neuronale e nell'alterazione della memoria mediante inoculo intracerebroventricolare degli anticorpi in modelli di topo di malattia di Alzheimer familiare che sviluppano amiloidosi severa (Tg2576 APPsw) e in topi *wild type* come controllo.
- Valutare la correlazione tra i livelli di IgG specifiche per ATP sintasi nel siero e il grado di demenza dei pazienti e i polimorfismi dei geni APOE e del precursore della proteina amiloide.

Trasferibilità dei risultati

La comprensione del ruolo patogenetico degli autoanticorpi specifici per l'ATP sintasi potrebbe portare a nuove prospettive per lo sviluppo di terapie mirate alla modulazione o al blocco della risposta immunitaria specifica.

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 virus di Epstein-Barr, virus parainfluenzali di tipo uno, due e tre, adenovirus e 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:

- comprendere la vera epidemiologia di queste malattie
- 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 della resistenza ai farmaci antitubercolari in Italia (progetto CCM)

La tubercolosi (TB) rappresenta un importante problema di sanità pubblica soprattutto per l'aumentata circolazione di ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) farmacoresistenti. Tra le forme più difficili da trattare vanno ricordati i ceppi MDR (*MultiDrug-Resistant*: resistenti

almeno a isoniazide e rifampicina), e XDR (*eXtensively Drug-Resistant*: MDR resistenti anche a un fluorochinolone e ad un farmaco iniettabile, kanamicina, capreomicina o amikacina). La diffusione degli stipiti farmaco-resistenti è in aumento nei Paesi dell'ex Unione Sovietica, dell'Africa e dell'Asia. Il fenomeno della crescente immigrazione da questi e altri Paesi crea i presupposti per l'aumento della circolazione di questi ceppi anche in Italia sia nei nuovi casi che nei ritrattamenti (pazienti trattati per ≤ 1 mese e > 1 mese, rispettivamente). Con i fondi del Progetto CCM 2007-2008 (Ministero della Salute) l'ISS ha arruolato 30 laboratori in 18 Regioni e ha eseguito: i) il controllo di qualità dell'antibiogramma per i farmaci di prima scelta, ii) il calcolo delle percentuali di resistenza ai farmaci singoli e in combinazione in 1.227 pazienti nel 2006 e in 1.698 pazienti nel 2007, iii) l'allestimento di una ceppoteca e l'avvio di studi di tipizzazione molecolare e mappatura delle resistenze.

L'obiettivo generale è di mantenere e sviluppare nel 2009-2011 questo sistema di sorveglianza allo scopo di seguire l'andamento della TB farmaco-resistente in Italia mediante i finanziamenti CCM.

Risultati attesi nel triennio

- Aumento della copertura territoriale e della rappresentatività dei laboratori che partecipano alle attività di controllo di qualità e alla determinazione della farmaco-resistenza nei nuovi casi/ritrattamenti e negli italiani/immigrati nel nostro Paese.
- Studi microbiologici sui ceppi raccolti allo scopo di confermare la resistenza ai farmaci di prima linea (streptomina, isoniazide, rifampicina, etambutolo), in particolare per i ceppi MDR, ed eseguire saggi di resistenza ai farmaci di seconda linea (ofloxacina, kanamicina, capreomicina, amikacina, etionamide, PAS) per quantificare l'entità della TB MDR e XDR nel nostro Paese. In collaborazione con l'Istituto San Raffaele di Milano verranno inoltre proseguiti gli studi di tipizzazione molecolare e mappatura delle resistenze.

I dati della sorveglianza della TB farmaco-resistente in Italia verranno inviati annualmente al Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali il quale li invierà a sua volta all'*European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) a Stoccolma.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di queste attività saranno presentati in comunicazioni a congresso e in pubblicazioni scientifiche. I laboratori regionali 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 del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali/ISS.

Sorveglianza dell'antibiotico-resistenza in comunità, nelle infezioni trasmesse dagli alimenti e in quelle di origine zoonosica: Sorveglianza di cloni batterici di *Salmonella Typhimurium* con resistenza multipla agli antibiotici nelle infezioni trasmesse da alimenti

Ad oggi quasi tutti i microrganismi hanno sviluppato una forma di resistenza ad almeno un chemioterapico; tuttavia la valutazione sull'impatto che l'antibiotico-resistenza ha 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.

L'intensivo uso di antibiotici, in medicina umana e veterinaria, ha portato ad un notevole incremento dei ceppi multiresistenti anche verso antibiotici di elezione nella terapia della salmonellosi extraintestinale, quali cefalosporine e fluorochinoloni. *S. Typhimurium* rappresenta

la causa prevalente di infezioni umane in Italia. L'importanza delle infezioni sostenute da *S. Typhimurium* è ulteriormente aumentato per l'elevato tasso di resistenza agli antibiotici associato a questo sierotipo. Negli ultimi anni una linea clonale di *S. Typhimurium* fagotipo DT104 è emersa e si è diffusa in tutto il mondo. Questo clone è caratterizzato da un profilo di multi resistenza che include ampicillina, cloramfenicolo, streptomina, sulfonamide, e tetraciclina, definito R-ACSSuT.

Recentemente un nuovo profilo di multi resistenza caratterizzato dall'assenza della resistenza al cloramfenicolo (R-ASSuT) è emerso in Italia, attualmente rappresenta quasi il 50% di tutti i ceppi multi resistenti di *S. Typhimurium* isolati da infezioni umane e viene frequentemente osservato anche in ceppi isolati da animali in particolare suini.

Risultati attesi nel triennio

Realizzazione di una sorveglianza mirata al monitoraggio di ceppi di *S. Typhimurium* responsabili di infezioni trasmesse da alimenti con resistenza multipla agli antibiotici:

- Caratterizzazione fenotipica e genotipica di isolati di origine umana raccolti mediante il sistema di sorveglianza di laboratorio
- Caratterizzazione e localizzazione dei geni di resistenza
- Individuazione dei principali genotipi di *S. Typhimurium* multiresistenti, isolati da infezioni umane e dalle principali specie di animali da reddito, elaborazione di strumenti diagnostici per rafforzare e implementare i sistemi di sorveglianza esistenti nel nostro Paese.

Partecipazione a network europei con l'obiettivo di condividere strumenti di epidemiologia molecolare atti a valutare l'emergenza di nuovi cloni pandemici di *S. Typhimurium* in Europa.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti saranno trasferiti al Sistema sanitario nazionale 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 delle forme cliniche neurologiche associate a virus trasmessi da artropodi e studio dei focolai naturali

I virus trasmessi da artropodi sostengono un importante ruolo nell'ambito delle malattie infettive emergenti. L'epidemiologia multifattoriale, che favorisce l'emergenza di varianti virali e la particolare nicchia ecologica, influenzata da fattori ambientali e climatici li rendono potenzialmente fonte di epidemie.

Recentemente, i cambiamenti climatici dovuti all'aumento della temperatura ambientale hanno provocato un aumentata densità delle popolazioni di vettori con conseguente diffusione dei virus da essi trasmessi. In Italia settentrionale si registra un notevole aumento di casi di encefalite trasmessa da zecche causata dal virus TBE. Aumento di casi malattia neurologica da virus Toscana sono riportati in varie Regioni anche in turisti in vacanza in zone con presenza di flebotomi vettori. Una epizoozia da *West Nile* è riportata in Toscana nel 1998. Recentemente (2008) la malattia si è ripresentata nelle Regioni Emilia Romagna e Veneto, manifestandosi principalmente negli equini. Tuttavia sono stati individuati anche alcuni casi umani.

Altra causa di "emergenza" è l'incremento degli scambi commerciali e del turismo che facilitano l'introduzione di nuove specie di artropodi vettori e di nuove patologie.

Obiettivi di questo studio:

- Valutazione del ruolo dei virus trasmessi da artropodi nei casi di malattia neurologica.
- Caratterizzazione dei focolai naturali e analisi molecolare degli isolati.

- Studio dei meccanismi patogenetici nell'infezione da *Phlebovirus*: valutazione del ruolo dell'apoptosi e delle particelle difettive interferenti.
- Studio delle relazioni virus/vettore: valutazione della competenza vettoriale e dei meccanismi di trasmissione virale.

Risultati attesi nel triennio

Incremento della percentuale di diagnosi di casi di malattia neurologica causata da virus trasmessi da artropodi e in particolare virus TBE, *West Nile* e 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 ruolo della apoptosi e delle particelle difettive interferenti nell'infezione da *Phlebovirus* in cellule di mammifero e di artropode.
- 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

- Disponibilità di metodi di 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.

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 *West Nile*, il virus dell'encefalite giapponese, il virus dell'encefalite di St. Louis) 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.

Anche in Italia, come altrove, si è rilevato un costante aumento del numero dei casi di Dengue segnalati tra i viaggiatori italiani che per motivi di turismo o di lavoro si sono recati in zone endemiche. 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.

Nel 2007 una epidemia di virus Chikungunya (un altro arbovirus trasmesso da zanzare) si è verificata in Emilia Romagna. L'attività del Reparto ha permesso di individuare la causa eziologica e di effettuare la diagnosi in tutti i casi che si sono verificati in provincia di Ravenna.

Attualmente il Reparto agisce da Laboratorio Nazionale di Riferimento per Dengue, Chikungunya e *West Nile*.

Risultati attesi nel triennio

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).

Incremento della percentuale di diagnosi delle malattie infettive dei viaggiatori.

Valutazione dell'incidenza della malattia da Dengue e di altre malattie da virus trasmessi da artropodi in soggetti a rischio provenienti da zone endemiche. Sorveglianza dei casi autoctoni.

Trasferibilità dei risultati

Miglioramento della capacità di diagnosi delle malattie infettive dei viaggiatori.

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 interrompere la trasmissione indigena dell'infezione entro il 2007, e certificare l'eliminazione entro il 2010. 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 possibile valutare l'impatto della vaccinazione sulla circolazione di ceppi selvaggi.
- Sarà possibile 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

Sostegno al potenziamento delle capacità laboratoristiche locali per approntare la diagnosi microbiologica di legionellosi

L'aumento di dieci volte del numero casi di legionellosi notificati al Registro nazionale di sorveglianza dell'ISS nell'ultimo decennio, ha sollecitato le istituzioni sanitarie del nostro Paese a porre una maggiore attenzione verso questa malattia infettiva, in termini di aggiornamento delle linee guida diffuse nel 2000 e progetti dedicati al potenziamento delle capacità laboratoristiche.

Tuttavia, nonostante le numerose azioni intraprese e l'attività del sistema di sorveglianza, la distribuzione di questo microrganismo nell'ambiente presenta punti ancora oscuri, come risulta dal rapporto annuale della legionellosi, in cui viene riportato che nel 70% circa dei casi non è nota l'origine dell'infezione.

Questo *gap* informativo è ascrivibile principalmente al metodo diagnostico utilizzato per la legionellosi che, nella maggior parte dei laboratori, è rappresentato solo dalla ricerca dell'antigene urinario.

Ciò ha ridotto pesantemente il numero di ceppi isolati dall'uomo, ostacolando la possibilità di individuare la fonte di infezione ambientale relativa al caso di malattia attraverso il *matching* molecolare tra il ceppo umano e i ceppi ambientali.

Si propone pertanto di creare una solida rete per la diagnosi microbiologica di legionellosi, migliorando le conoscenze sull'origine dell'infezione, sull'incidenza di casi di legionellosi dovuti ai diversi sierogruppi e specie di legionella e, in ultimo, contribuire a ridurre la sottostima di casi notificati.

Risultati attesi nel triennio

Il programma d'azione prevede, in primo luogo, una fase di formazione rivolta ai medici, e un training teorico pratico verrà impartito ai microbiologi laboratoristi, cui verranno distribuite procedure operative validate dall'ISS per l'analisi dei campioni.

Tra i laboratori selezionati verrà individuato un singolo ospedale nel quale sarà condotto uno studio pilota per massimizzare la diagnosi di legionellosi da secrezioni respiratorie su tutte i casi di polmonite ricoverati, saggiando, mediante *Real-time* PCR, sia le secrezioni respiratorie che i sieri dei pazienti.

Complementare alla ricerca di legionella su campioni clinici, verranno raccolti i dati che deriveranno dalle analisi su campioni ambientali, effettuati dai competenti laboratori, relativi ai casi umani presi in esame, al fine di ottenere i ceppi ambientali da confrontare con quelli isolati dall'uomo.

Il Laboratorio nazionale di riferimento per le legionelle dell'ISS, inoltre, fornirà, ove le caratteristiche epidemiche lo richiedano, in accordo con le Autorità regionali e su mandato del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, diretto supporto tecnico alle indagini microbiologiche in caso di epidemie a livello locale.

È prevista inoltre la formazione di un gruppo di lavoro per la revisione delle Linee Guida per la prevenzione e il controllo della Legionellosi del 4 aprile 2000.

Trasferibilità dei risultati

Diffusione delle informazioni ottenute ai datori di lavoro e ai lavoratori che svolgono attività in tali specifiche strutture o strutture simili e modalità di prevenzione del rischio di acquisizione della Malattia del legionario.

Il supporto tecnico in caso di epidemie ha già dimostrato (vedi epidemia di Cesano Maderno) la sua utilità per gli enti sanitari periferici regionali.

Staphylococcus aureus come agente di infezioni nosocomiali e comunitarie: diversità di cloni e di fattori di virulenza

Staphylococcus aureus è noto da anni come il principale agente di infezioni nosocomiali, soprattutto legate a ceppi resistenti alla meticillina (MRSA). In Italia la frequenza di diffusione di MRSA acquisiti in ambito ospedaliero (HA-MRSA), è tra le più elevate in Europa. Negli ultimi anni importanti cambiamenti si sono verificati nell'epidemiologia delle infezioni da *S. aureus*. Ceppi MRSA sono stati riconosciuti come responsabili di infezioni spesso gravi acquisite in comunità in soggetti giovani e senza fattori di rischio. Questi ceppi comunitari (CA-MRSA) si differenziano dai ceppi HA-MRSA sia dal punto di vista epidemiologico che microbiologico, in quanto posseggono marcatori genotipici e fattori di virulenza diversi. Inoltre, un particolare clone MRSA, che colonizza i maiali di allevamento ha mostrato capacità di colonizzare e/o infettare operatori del settore suggerendo che l'infezione da *S. aureus* possa in taluni casi configurarsi come una zoonosi.

Lo scopo del progetto è quello di studiare i cloni circolanti di ceppi HA-MRSA (batteriemie e sepsi) e di ceppi CA-MRSA (infezioni della cute e dei tessuti molli gravi o recidivanti e polmoniti necrotizzanti) mediante tecniche fenotipiche e genotipiche. In particolare sarà rilevata la sensibilità agli antibiotici, la presenza del gene *mecA*, e la genotipizzazione sarà effettuata mediante *mec typing*, *spa typing* e MLST, metodiche di riferimento che permettono una descrizione confrontabile dei cloni circolanti.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio renderà possibile seguire il trend epidemiologico dei cloni di *S. aureus* circolanti in Italia con particolare riguardo ai cloni MRSA responsabili di infezioni gravi, quali batteriemie o sepsi in ambito ospedaliero e infezioni della cute e dei tessuti molli e polmoniti necrotizzanti in ambito comunitario. Risultati specifici saranno:

- 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 *S. aureus* (ad esempio soggetti dimessi dall'ospedale, anziani in casa di riposo che vengono ricoverati in ospedale, soggetti residenti in comunità che vengono assistiti in regime di day hospital ecc.).
- Confronto con la circolazione di cloni in Europa e a livello globale. È noto che, soprattutto per MRSA esiste un numero limitato di cloni diffusi a livello globale. D'altra parte, relativamente ai CA-MRSA esistono notevoli differenze tra gli Stati Uniti e l'Europa.
- 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 sito web o pubblicazioni dell'ISS o report *ad hoc*. La conoscenza della circolazione di questo importante patogeno, spesso multi-resistente e comunque facilmente trasmissibile è fondamentale per implementare protocolli e linee guida per il controllo delle infezioni da *S. aureus* in generale e da MRSA in particolare 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 ed infettivologia.

Strategie favorevoli la cross-presentazione di immunogeni non replicanti

Questa ricerca finanziata nell'ambito del Progetto CEE-FP7 "IMECS", dedicato ad uno studio dei correlati di protezione nelle infezioni da virus influenzali, prende in esame la *cross*-presentazione di vaccini virali inattivati con l'obiettivo di definire potenziali vie di regolazione che siano suscettibili a trattamento con possibili farmaci in grado di favorire la presentazione degli antigeni. L'interesse ad individuare modalità ed eventuali potenziali farmaci in grado di favorire la *cross*-presentazione degli antigeni durante l'immunizzazione è richiamato dalle ridotte capacità degli attuali vaccini inattivati nell'indurre una risposta dei linfociti T CD8+ specifica. Oltre ad ottimizzare l'efficacia dei vaccini, la possibilità di richiamare questa componente immunitaria è di particolare interesse nella vaccinazione antinfluenzale delle persone anziane, dove si assiste ad un naturale declino delle capacità di risposta cellulo-mediata. Definire condizioni di immunizzazione con vaccini inattivati in grado di stimolare al meglio sulle mucose respiratorie sia una risposta anticorpale che linfociti T citotossici verso proteine interne conservate del virus dell'influenza può comportare un incremento della *cross*-reattività tra ceppi influenzali e risultare di importanza critica nella profilassi vaccinale contro eventuali ceppi influenzali pandemici.

Risultati attesi nel triennio

Nostri studi preliminari nel topo, condotti in collaborazione con altri Laboratori, dimostrano una efficace stimolazione di linfociti T CD8+ in seguito ad immunizzazione con proteine

solubili combinata al trattamento con un farmaco capace di favorire la *cross*-presentazione di antigeni. L'azione del farmaco preserva l'antigene dalla degradazione da parte di proteasi endosomali come pure ne facilita il passaggio nel citoplasma dove viene processato. Oltre all'indicazione di un primo farmaco da valutare nel contesto di immunizzazione con virus interi inattivati, i nostri dati preliminari destano interesse in quanto attestano la fondatezza di un principio con il quale direzionare lo studio e la ricerca di ulteriori sostanze utili in tal senso. Nelle attese, questo studio tende a definire le relazioni che intercorrono tra *cross*-presentazione degli antigeni e risposta immune condizionata da fattori immunomodulanti la presentazione antigenica, e come tutto questo possa influire sulla qualità della risposta immune in termini di distribuzione tissutale, ampiezza e mantenimento delle popolazioni di cellule effettrici della memoria nel topo. L'analisi della risposta immune verso virus inattivati potrà inoltre trarre vantaggio dall'impiego di virus influenzali ricombinanti esprimenti epitopi di antigeni modello verso i quali sono reperibili animali transgenici e altri agenti patogeni ricombinanti utili nell'analisi di risposte secondarie e studi di protezione.

Trasferibilità dei risultati

Gli studi sopra descritti riprendono aspetti rilevanti nella comprensione dei meccanismi che intervengono nella *cross*-presentazione degli antigeni non replicanti e di una loro possibile manipolazione con farmaci immunomodulanti per meglio garantire l'induzione di una immunità protettiva. L'esigenza di perseguire nuove ed efficaci strategie vaccinali riveste grande importanza nella medicina preventiva come pure in possibili forme di immunoterapia riguardanti malattie infettive e non. L'indagine proposta può offrire ricadute sia in termini di nuove conoscenze sulla *cross*-presentazione degli antigeni che di natura applicativa. L'individuazione di eventuali farmaci favorevoli la risposta immune in seguito alla somministrazione di virus inattivati dell'influenza, 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.

Studi sulla variabilità genetica di ceppi di meningococco di sierogruppo C e di sierogruppo B

Nell'ambito del Progetto CCM "Malattie batteriche invasive", si intende studiare, come attività di ricerca, la variabilità genetica dei ceppi di siero gruppo C e di siero gruppo B attualmente responsabili della maggior parte dei casi di infezione da meningococco in Italia.

L'introduzione del vaccino coniugato antimeningococco C ha diminuito l'incidenza dei casi nella fascia di età più suscettibile alla malattia, bambini al di sotto dei cinque anni di età. Tuttavia, è importante caratterizzare i ceppi a livello molecolare utilizzando saggi quali MLST, VNTR e PFGE al fine di evidenziare la presenza di cloni e/o *lineage* prevalenti nel nostro Paese. Per quanto riguarda i ceppi di meningococco di siero gruppo 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

Da questa ricerca si intende 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.

Lo studio sulla conservazione dei geni codificanti 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.

Trasferibilità dei risultati

I dati ottenuti da questo studio permetteranno, in primo luogo, di ottenere informazioni nuove sulle caratteristiche molecolari dei ceppi di meningococco di gruppo C circolanti in Italia 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.

Studi su nuove tipologie di espressione di antigeni del papillomavirus umano (HPV)

L'infezione da papillomavirus "ad alto rischio" (HR) rappresenta il maggiore fattore di rischio per lo sviluppo di lesioni precancerose e del cancro della cervice uterina. Molti evidenze indicano che l'infezione persistente virale con il conseguente sviluppo di lesioni cancerose è legata alla mancanza di una sufficiente risposta immune del soggetto verso il virus. Vaccini profilattici contro due tipi HR, 16 e 18, sono ora disponibili; essi porteranno probabilmente ad una riduzione dell'incidenza del tumore della cervice, ma soltanto tra decine di anni. Inoltre essi non sono efficaci su infezioni già stabilite e quindi non potranno aiutare il trattamento di milioni di persone già infette. Per questi motivi è necessario sviluppare trattamenti terapeutici, quali vaccini, meno invasivi e costosi di quelli attualmente disponibili.

Un approccio immunoterapico deve stimolare il sistema immune contro antigeni target virali presenti nelle cellule tumorali. Un candidato ottimale per l'eradicazione dell'infezione è ancora materia di investigazione. Inoltre bisogna considerare che il virus colpisce attivamente il sistema immunitario interagendo con molecole coinvolte nell'immuno sorveglianza. In questo scenario un vaccino terapeutico ideale contro HPV dovrebbe avere caratteristiche che non si riscontrano nell'infezione naturale. Per questi motivi vie alternative di induzione di presentazione dell'antigene insieme con l'uso di nuovi adiuvanti debbono essere esplorate.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si propone di studiare strategie originali per il trasferimento di antigeni virali in vista di un possibile sviluppo di un vaccino terapeutico. Gli antigeni virali scelti sono le due oncoproteine virali, E6 ed E7, riconosciute "antigeni specifici tumorali. Le strategie proposte sono:

- un approccio immunoterapico basato sull'uso di cellule dendritiche pulsate con estratti foliari contenenti la proteina E7 espressa nelle foglie stesse;
- il trasferimento di E6 ed E7 mediante VLPs retro- o lentivirali. Per ottenere queste particelle le oncoproteine saranno fuse ad un mutante della proteina Nef di HIV, Nef7, che viene incorporata nelle VLP in maggiore quantità rispetto al tipo selvaggio;
- trasferimento delle oncoproteine legate a microsfele polimeriche biocompatibili.

Ci aspettiamo che gli antigeni trasferiti in questi differenti modi siano presentati al sistema immunitario in modo differente. La capacità di indurre una risposta citotossica sarà valutata per tutti i sistemi, sia *in vitro* che in sistema animale, e le risposte saranno confrontate con l'obiettivo finale di un possibile uso per lo sviluppo di un vaccino terapeutico contro lesioni associate ad HPV.

Trasferibilità dei risultati

Le finalità del progetto è la messa a punto un di sistema terapeutico contro il tumore associato a HPV. La necessità di sviluppare un vaccino terapeutico per le lesioni tumorali associate alla infezione da HPV è una priorità, data la rilevanza di questa patologia nelle donne, ma non solo, e la attuale disponibilità solo di protocolli terapeutici altamente invasivi per la sua cura.

Questi studi sono necessari per la messa a punto di un preparato vaccinale che sia effettivamente in grado di stimolare il sistema immunitario dell'ospite per contrastare l'infezione virale.

Il successo del progetto potrà tradursi quindi in futuro nella disponibilità di un preparato vaccinale valutato *in vitro* e in un sistema animale, che potrà essere ulteriormente sviluppato.

Studio dei Fattori di Regolazione dell'Interferone (IRF) coinvolti nel differenziamento delle cellule TH17 e T regolatorie umane

Gli Interferoni (IFN) oltre alla loro più nota attività antivirale, sono citochine con una riconosciuta attività immunomodulatoria e antitumorale. Recentemente è stato riconosciuto loro un ruolo come potenti adiuvanti per la generazione di una risposta immune protettiva. Tra i geni effettori delle risposte agli IFN, il Fattore di Regolazione dell'Interferone (IRF) -1 è un fattore di trascrizione pleiotropico in grado di regolare diverse risposte cellulari attraverso la modulazione di diversi set di geni, a seconda del tipo cellulare in cui è espresso e della natura dello stimolo da cui è indotto, e svolge un ruolo essenziale nella regolazione della risposta immune attraverso anche la regolazione del differenziamento e attività di cellule dendritiche e T regolatorie. Queste cellule rappresentano una popolazione di cellule altamente specializzata nella soppressione della risposta immune e nell'induzione e mantenimento della tolleranza immunitaria, caratterizzate univocamente dall'espressione del fattore di trascrizione Foxp3. Dati recenti hanno evidenziato un ruolo cruciale di IRF-1 nello sviluppo delle cellule T regolatorie CD4+CD25+ (TReg) naturali e periferiche. In particolare, è stato descritto un ruolo diretto di IRF-1 sull'inibizione della trascrizione del gene Foxp3. Le cellule CD4+ T *Helper* secernenti IL-17 (TH17) sono state definite come unica sottopopolazione di cellule proinfiammatorie il cui sviluppo dipende dal segnale iniziato da IL-6, TGF- β , IL-21, attivazione di STAT3, e dal fattore di trascrizione ROR- α . Benché sia stato proposto che le cellule TReg e TH17 siano reciprocamente regolate durante il differenziamento, dati recenti hanno messo in luce un antagonismo molecolare e una plasticità nei programmi di differenziamento di TReg e TH17 nel modello murino. Di particolare interesse, sono state identificate anche nel sangue periferico umano cellule T CD4+ che coesprimono marcatori delle cellule TReg e TH17, suggerendo che ci sia una correlazione ontogenica tra i due *lineage*. Obiettivo del progetto è pertanto lo studio del possibile coinvolgimento e del ruolo di IRF-1 e di altri IRF nel differenziamento delle cellule TH17 in relazione al suo ruolo esercitato sulle TReg nel sangue periferico umano.

Risultati attesi nel triennio

- Definizione dei meccanismi di regolazione dell'espressione dei *marker* genetici di cellule T regolatorie e Th17
- Sviluppo di reagenti quali RNA interferenti e vettori virali esprimenti fattori di trascrizione in grado di dirigere e/o modulare il differenziamento dei due *lineage*

Trasferibilità dei risultati

L'uso di cellule TH17 e TReg manipolate *in vitro* rappresenta uno strumento potenzialmente molto efficace per la terapia di diverse patologie. Gli studi proposti tendono a stabilire se un fattore di trascrizione quale IRF-1 possa essere efficacemente utilizzato come un bersaglio molecolare e strumento per modulare simultaneamente l'attività delle cellule TReg e di cellule

TH17. In particolare l'espressione ectopica di IRF-1 in cellule T CD4+ differenziate in vitro a TReg dovrebbe portare ad un decremento della loro attività tollerogena, e nello stesso tempo potenziare l'attività proinfiammatoria delle TH17. Dall'altra parte, il silenziamento dello stesso fattore con RNA interferenti dovrebbe aumentare l'attività tollerogena delle TReg.

Lo studio proposto permetterà di sviluppare reagenti specifici in grado di modulare un eccessivo o indesiderato sviluppo di cellule T reattive e/o cellule immunogeniche.

Studio del meccanismo di azione di adiuvanti mucosali *in vitro*

I vaccini somministrati per via mucosale sono pratici, non invasivi ed efficaci nell'indurre risposte immuni sia mucosali che sistemiche. L'immunizzazione mucosale con antigeni purificati o ricombinanti necessita dell'uso di adiuvanti che amplifichino le risposte immuni. I più potenti adiuvanti mucosali ad oggi conosciuti e descritti nei modelli sperimentali preclinici sono le tossine batteriche, quali la tossina colerica (CT) e l'enterotossina termo-labile di *E. Coli* (LT). L'elevata tossicità di queste sostanze preclude il loro utilizzo nell'uomo e per questo sono stati generati dei mutanti con ridotta attività enzimatica. Alcuni di questi mutanti hanno dato ottimi risultati nei modelli preclinici murini e diversi studi sono stati effettuati per valutare la loro azione *in vitro* direttamente su cellule presentanti l'antigene (APC) come le cellule dendritiche sia umane che murine. È stato dimostrato che i linfociti B hanno un ruolo molto importante nell'indurre una risposta ottimale ai vaccini, non solo per la loro capacità di produrre anticorpi, ma anche come APC. Ci proponiamo di valutare gli effetti di tali adiuvanti sulla capacità dei linfociti B umani di presentare l'antigene e sulla produzione di anticorpi *in vitro* studiando approfonditamente il meccanismo d'azione dal punto di vista molecolare e di *signaling*, in particolare nelle diverse sottopopolazioni dei linfociti B (*naïve, memory*).

Risultati attesi nel triennio

In base a nostri recenti risultati, le tossine batteriche, ma non i mutanti non enzimatici, sono in grado di indurre cambiamenti funzionali nei linfociti B umani che risultano in una migliorata capacità di presentare l'antigene. Ci aspettiamo che le tossine batteriche, tramite l'aumento di cAMP intracellulare, inducano una cascata di eventi responsabili della loro attività adiuvante. Sarà interessante capire se anche i mutanti con diminuita o nulla attività enzimatica sono in grado di indurre un *signaling*, dovuto all'interazione con il recettore espresso sulle cellule, ma che non produce alcun effetto sulla capacità presentante dei linfociti B. La stessa analisi verrà effettuata valutando la capacità di produrre anticorpi *in vitro* in presenza dei diversi adiuvanti e costimoli.

Trasferibilità dei risultati

Lo studio degli effetti e del meccanismo di azione dei diversi adiuvanti mucosali sulle cellule del sistema immunitario è molto importante nell'ambito della comprensione dell'efficacia dei vaccini mucosali e dello studio della sicurezza dei vaccini stessi. La comprensione dei meccanismi di azione degli adiuvanti efficaci è quindi fondamentale per selezionare nuovi adiuvanti sicuri e altrettanto efficaci.

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.

Studio della patogenesi di *Toxoplasma gondii*: cistogenicità dei ceppi, rapporto ospite/parassita e vie di trasmissione, nella casistica italiana

Sulla base delle acquisizioni ottenute nel triennio passato con la tipizzazione tramite PCR-RFLP e Microsatelliti, degli isolati di *Toxoplasma gondii* da noi collezionati in Italia a seguito di diagnosi di trasmissione in corso di gravidanza, si è evidenziata una frequenza genotipica

molto più simile a quella riscontrata in Spagna che in Francia e nel resto d'Europa. La ricorrenza del genotipo I e del genotipo III (seppur raro), oltre che del genotipo II e di alcuni ibridi ricombinanti differenzia Italia e Spagna dal Centro e Nord Europa dove, con analisi condotte nello stesso modo, si identifica il genotipo II come l'unico agente della toxoplasmosi. Poiché tale frequenza è simile anche a quella trovata in Nord Africa, Grecia, e Turchia, ci si è chiesti se questa distribuzione non sia dovuta alla tipicità della risposta immunitaria dei popoli mediterranei.

Essendo l'HLA il sistema genico umano con elevato grado di polimorfismo e implicato nella risposta immunitaria di tipo infiammatorio si è pensato di: i) tipizzare l'HLA nel sangue periferico delle madri (ottenuto in sede di amniocentesi) nei casi studiati, ii) studiare la sequenza dell'allotipo che codifica per la regolazione delle cellule T CD8+ e quindi con l'infezione da *Toxoplasma*, iii) tipizzare un maggior numero di isolati anche d'origine animale in Italia, per vedere se la frequenza dei genotipi osservata nei casi di trasmissione non dipenda dalla via di trasmissione dell'infezione e dai fattori di rischio.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi sono: i) identificare nel gruppo di studio delle donne in corso di gravidanza la presenza della famiglia B27 per l'HLA di classe I, ii) identificare un'elevata frequenza dell'allele HLAB2702 che in Italia è fortemente correlato con l'artrite reumatoide ed è tipico della popolazione del Bacino del Mediterraneo e della fascia equatoriale in quanto selezionato dalla ricorrenza dell'infezione malarica, iii) Correlare positivamente questa frequenza con quella del genotipo I di *Toxoplasma*, virulento, nel medesimo campione umano, come effetto della regolazione della virulenza del parassita da parte della risposta infiammatoria. Le sequenze codificanti per gli aminoacidi 60-84 in questo allele, infatti, agiscono bloccando la funzione delle cellule T CD8+ e inducendo l'artrite reumatoide e l'uveite e potrebbero aumentare la virulenza del parassita come succede nei casi di immunodepressione.

Il risultato finale di questo progetto sarà quello di mettere in discussione se l'evento patogenetico della toxoplasmosi sia davvero dovuto al genoma del parassita o anche alla risposta immunitaria sia in termini di selettività che di suscettibilità dell'ospite.

Un risultato parallelo di questo progetto è la conoscenza delle frequenze genotipiche di un maggior numero d'isolati di *Toxoplasma* in Italia per valutare se, sempre tramite l'analisi delle corrispondenze, la tipizzazione può dare informazione sulle vie di trasmissioni del parassita e i fattori di rischio dell'infezione.

Trasferibilità dei risultati

La trasferibilità dei risultati prodotti consiste nel diffonderli alla comunità scientifica tramite comunicazione a convegni specifici sulla Toxoplasmosi, più generici in campo microbiologico e soprattutto con la pubblicazione dei dati su riviste internazionali con IF.

Studio della regolazione dell'espressione di geni coinvolti nell'immunità adattativa: modulazione dell'attività di cellule dendritiche mieloidi attraverso modificazione dell'immunoproteosoma

Le cellule dendritiche (*Dendritic Cell*, DC) sono le più importanti cellule presentanti l'antigene, essenziali nell'iniziare l'immunità innata e guidare poi la successiva immunità adattativa. Le DC catturano e processano l'antigene presentandolo sulle molecole MHC e secernono citochine in grado di determinare la seguente risposta adattativa. La sintesi di interferon di tipo I, in particolare, è mediata dall'attivazione di fattori della famiglia *Interferon Regulatory Factor* che a loro volta vengono poi ristimolati amplificando da un lato la sintesi di Interferon stesso e dall'altro inducendo un certo numero di geni Interferon indotti. Gli IRF giocano pertanto un ruolo chiave nelle attività delle DC modulando sia la risposta innata che

adattativa. Durante la risposta immune ai patogeni, le citochine pro-infiammatorie prodotte, inducono la sostituzione delle subunità attive del proteosoma costitutivamente espresse (beta1i, beta2i, beta5i) con le forme alternative indotte (LMP2, MECL-1, LMP7). Tale proteosoma, detto immunoproteosoma, aumenta l'efficienza della presentazione antigenica ed è costitutivamente presente nelle cellule dendritiche. La regolazione di alcune subunità dell'immunoproteosoma è stata studiata in cellule non del sistema immune ed è sotto il controllo trascrizionale del fattore IRF-1. Principale obiettivo del presente progetto è pertanto quello di studiare la regolazione di alcuni geni dell'immunoproteosoma nelle cellule dendritiche mieloidi allo scopo di sviluppare approcci sperimentali in grado di modulare la composizione del proteosoma stesso e modificando quindi la capacità di presentazione dell'antigene.

Risultati attesi nel triennio

- Determinazione del profilo di espressione di alcuni geni del proteosoma nelle cellule dendritiche umane a seguito di stimoli diversi quali infezioni virali e ligandi dei recettori PRR.
- Definizione dei fattori trascrizionali implicati nell'espressione di tali geni
- Modulazione dell'attività del proteosoma attraverso overespressione o silenziamento con RNA interferenti dei fattori di trascrizione coinvolti.

Trasferibilità dei risultati

L'uso di cellule dendritiche 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 una modulazione della composizione dell'immunoproteosoma possa essere utilizzato come uno strumento per modulare l'attività di presentazione dell'antigene di cellule dendritiche. I risultati ottenuti permetteranno di sviluppare reagenti specifici in grado di modificare la specificità antigenica di una popolazione di cellule dendritiche e/o funzionare come adiuvanti nell'evocare una duratura risposta immune contro diversi antigeni.

Studio della risposta anticorpale umana dopo infezione da HPV16 e dopo la vaccinazione. Validazione di un test diagnostico e messa a punto di un saggio di neutralizzazione per HPV basato su pseudovirioni

L'infezione da papillomavirus non sempre è correlata con la sierconversione. Il 50% delle persone infettate sviluppa anticorpi contro la proteina del capsido L1. Se si utilizzano più antigeni virali la percentuale di persone sieropositive aumenta fino al 80%. Cinque proteine di HPV16 L1, L2, E4, E6 ed E7 sono state espresse in *E. coli* e utilizzate per mettere a punto un ELISA per rivelare anticorpi HPV16 specifici. Tale metodo è stato utilizzato in uno studio di corte (Di Bonito, *et al. Infect Agent Cancer* 2006;1:6; Giorgi, *et al. Infect Agent Cancer* 2008;3(1):9) dimostrandosi utile per individuare anticorpi in persone infettate non solo con il genotipo 16 ma anche con altri genotipi, come 18, 6 e 11, in virtù della elevata percentuale di identità delle proteine virali. In collaborazione con il Prof. Paul K.S. Chan intendiamo validare il nostro test utilizzandolo con sieri di persone vaccinate in Cina con il Gardasil. Non essendo disponibili kit commerciali per la valutazione della risposta umorale anti-HPV dopo la vaccinazione, la WHO invita i paesi che hanno introdotto la vaccinazione di mettere a punto saggi *in house* e di avviare la sorveglianza sierologica di specifiche coorti. Per poter meglio valutare l'efficacia del vaccino HPV metteremo anche a punto il saggio di neutralizzazione basato su pseudovirioni fluorescenti, sviluppato dal Dott. JT Schiller dei *National Institutes of Health*, che richiede specifiche competenze di virologia. Come sieri di controllo useremo quelli messi a disposizione dal WHO-HPV-Labnetwork. I test sierologici messi a punto nel nostro

laboratorio saranno usati per analizzare la risposta anticorpale di una coorte di bambini HIV-sieropositivi sottoposti alla vaccinazione HPV all'Ospedale Bambino Gesù.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio in collaborazione con il Prof. Paul K.S. Chan (*Department of Microbiology, The Chinese University of Hong Kong*) ci consentirà di utilizzare il nostro test ELISA basato sulla proteina del capsido L1 per monitorare gli anticorpi anti-HPV indotti dopo la vaccinazione di un gruppo di ragazze arruolate per uno studio clinico in Cina. Studi preliminari indicano che il saggio con la nostra proteina L1 funziona in modo simile al saggio che utilizza le *Virus like Particle*, costituenti del vaccino. Verrà quindi valutato se il test è sensibile e specifico per monitorare la risposta anticorpale dopo la vaccinazione.

I nostri test sierologici, una volta validati, verranno utilizzati in uno studio in collaborazione con l'UO Infettivologia dell'Ospedale Bambino Gesù di Roma. Lo studio prevede la vaccinazione con il vaccino quadrivalente Gardasil di una coorte di bambini e adolescenti sieropositivi seguiti dall'Unità pediatrica da alcuni anni. La risposta anticorpale anti-L1 saggiata mediante ELISA con la proteina ricombinante verrà confrontata con il saggio di neutralizzazione che utilizza pseudovirioni ricombinanti.

Trasferibilità dei risultati

Cinque proteine di HPV16 L1, L2, E4, E6 ed E7 sono state espresse in *E. coli* e utilizzate in un saggio ELISA per rivelare anticorpi HPV16 specifici. Tale saggio si è mostrato utile per monitorare la risposta anticorpale in uno studio di popolazione volto a studiare l'infezione dei papillomavirus genitali associati alle lesioni genitali e al cancro della cervice. Anche se l'infezione non è sempre correlata alla sieroconversione la disponibilità di un kit commerciale favorirebbe lo studio su larga scala della risposta anticorpale dopo l'infezione da HPV16 e la comprensione del ruolo degli anticorpi nella protezione e nella guarigione dall'infezione.

Inoltre il saggio ELISA basato sulla proteina L1 potrebbe essere usato per monitorare la risposta anticorpale dopo vaccinazione con il vaccino quadrivalente Gardasil.

Studio della risposta della memoria immunologica nell'ambito della farmacovigilanza dell'efficacia della vaccinazione primaria contro malattie prevenibili

Il nostro Paese ha adottato una strategia vaccinale per l'infanzia basata su vaccini esavalenti che hanno contribuito ad aumentare grandemente la *compliance* nei confronti di tutte le vaccinazioni. Questo comporta la necessità di una maggiore farmacovigilanza sull'efficacia vaccinale di ciascuna componente vaccinale. In quest'ottica, recentemente l'EMEA ha verificato che il vaccino combinato Hexavac per la prevenzione di sei malattie (tetano, difterite, pertosse, poliomielite, infezioni invasive da *Hemophilus influenzae* b ed epatite virale B), usato per vaccinare bambini nel primo anno di vita, induce una ridotta risposta anticorpale verso l'epatite B e, di conseguenza, ne ha raccomandato la sospensione della distribuzione e il ritiro dal mercato. Infatti, sebbene a distanza di un mese dalla terza dose, oltre il 95% dei bambini vaccinati presentavano titoli anticorpali superiori alla soglia considerata protettiva (anti-HBsAg >10 UI/l), una quota variabile dal 5 al 20% dei vaccinati superava di poco tale soglia (con titoli anticorpali >10 UI/l e < 100 UI/l). Sebbene il significato clinico di questa osservazione non sia ancora noto, è possibile che la durata della protezione non sia ottimale nel tempo, e i bambini vaccinati, pur essendo protetti durante l'infanzia, potrebbero non esserlo adeguatamente durante l'adolescenza e l'età adulta. Da qui sorge la necessità di approfondire il grado di protezione indotta in questi bambini dalla vaccinazione, valutando oltre alla presenza di una risposta protettiva, il grado d'induzione di una risposta T e B della memoria specifica per i componenti vaccinali e in particolare per la componente dell'epatite.

Risultati attesi nel triennio

- Identificare il saggio più adatto (in termini di specificità e di facilità di esecuzione e volume di prelievo di sangue periferico) per la valutazione della risposta T antigene specifica indotta dagli antigeni presenti nel vaccino e in particolare dalla componente dell'epatite, tenuto conto che i soggetti in studio sono bambini dai quali è possibile prelevare una piccola quantità di sangue. Questo studio è stato approvato dall'AIFA con finanziamenti 2006 ma i fondi sono effettivamente arrivati a novembre 2007 e la durata è prevista essere di 24 mesi (18 + 6). In un campione pilota, abbiamo confrontato i saggi di risposta T da linfociti isolati (PBMC) con quelli ottenuti da sangue intero (WB) su campioni ottenuti da donatori adulti e da bambini appartenenti alle due coorti in studio riceventi come prime dose il vaccino esavalente Hexavac (ora sospeso) o Infanrix. Sono attualmente in corso le analisi statistiche di validazione dei saggi eseguiti su PBMC o su WB.
- Identificare il saggio per l'identificazione dei linfociti T della memoria centrale e della memoria effettrice. Le metodiche sono ormai a punto e siamo in grado di eseguire lo studio della memoria T sia su PBMC che su WB. Anche qui stiamo confrontando i risultati ottenuti con i due tipi di campioni nello stesso soggetto.
- pianificazione dell'arruolamento dei soggetti nei quali si deve eseguire lo studio e delle dimensioni del campione (40 bambini per gruppo vaccinale della coorte di età del 2001). Particolare attenzione è stata posta alla logistica della raccolta dei campioni è infatti importante che i prelievi arrivino nel nostro laboratorio entro due ore dal prelievo.

Il primo e il secondo punto del piano sperimentale sono stati espletati ed è attualmente in attuazione l'arruolamento e i saggi sui prelievi ematici dei bambini.

Trasferibilità dei risultati

L'ottenimento degli obiettivi permette l'individuazione di nuovi strumenti atti a valutare la risposta protettiva indotta dalla vaccinazione nella prima infanzia. Permetterà inoltre di applicare questa strategia allo studio della risposta immune verso altre malattie prevenibili, e in particolare ai patogeni intracellulari che necessitano dell'induzione di risposte T protettive. Tali risposte sono scarsamente analizzate soprattutto negli studi clinici di vaste proporzioni. L'introduzione di saggi di risposta T direttamente dal sangue intero, o comunque da piccoli campioni di materiale, permetterà di introdurre tali analisi su più vasta scala.

**Studio dell'interazione tra allergeni e prodotti microbici:
caratterizzazione dell'induzione e della modulazione della risposta allergica
con particolare riferimento a *Parietaria judaica* (Par j1)**

Riconoscendo gli allergeni e stimolando le cellule T *naïve*, le cellule dendritiche sono responsabili per la sensibilizzazione agli allergeni inalanti. Attraverso l'alto livello di espressione dei *Pattern Recognition Receptor* (PRR) come i TLR, queste cellule sono tra le principali ad essere sensibili ai prodotti microbici. Molte evidenze legano l'esposizione all'LPS, tipico ligando dei TLR, con la regolazione dello sviluppo delle patologie allergiche così come l'esacerbazione di quelle già in corso. Abbiamo già osservato che Par j1, l'allergene maggiore di *Parietaria judaica*, e i suoi derivati da bioingegneria possono avere effetti su cellule miste del sistema immunitario sia umane (PBMC) che murine (splenociti) e sulla modulazione della risposta allergica in modelli murini. In particolare, Par j1 può indurre produzione di IFN-gamma da parte di cellule NK umane e murine da soggetti non allergici. Questo fenomeno sembrerebbe legato alla porzione N-terminale della molecola che presenterebbe un'alta omologia con i peptidi antimicrobici (AMP) e una conseguente alta affinità per LPS. Questo progetto si propone quindi di proseguire gli studi sugli effetti di Par j1, sia attraverso studi *in vitro* sulle

cellule coinvolte nella risposta allergica sia mediante l'utilizzo di modelli murini di sensibilizzazione allergica. L'ipotesi centrale è che l'allergene Par j1 e i suoi derivati portino ad un diverso programma di differenziazione funzionale delle cellule del sistema immunitario coinvolte nella risposta allergica nei soggetti normali o allergici, dovuto probabilmente all'affinità LPS.

Risultati attesi nel triennio

Dopo un più fine studio degli effetti di Par j1 e dei suoi derivati in vitro su cellule miste del sistema immunitario e sulle singole sottopopolazioni, si potrà caratterizzare la reale correlazione del Par j1 con i prodotti microbici anche attraverso l'utilizzo di cellule derivate da topi mutanti o deficitari per i vari PRR (es. C3H/HeJ, MyD88 KO ecc.). In più, in collaborazione con l'Istituto di Biomedicina ed immunologia molecolare Alberto Monroy del CNR di Palermo, gli studi *in vitro* saranno condotti utilizzando cellule umane da soggetti allergici e/o normali su sottopopolazioni distinte quali DC (derivate dal sangue periferico), NK e T cell. Tutti i punti su citati si baseranno sull'utilizzo di metodiche di immunobiologia cellulare, immunobiochimica e biologia molecolare volte a caratterizzare il fenotipo e la funzionalità delle singole popolazioni cellulari.

In parallelo si proseguirà lo studio della risposta *in vivo* attraverso l'utilizzo di un modello murino di allergia a Parietaria, messo a punto nel nostro laboratorio, e alla modulazione della risposta allergica con l'utilizzo di Par j1 e dei suoi derivati. Gli studi saranno condotti analizzando sia a livello sistemico, valutando la modulazione della risposta umorale, sia caratterizzando cellule presentanti o effettrici prelevate da siti periferici coinvolti nel riconoscimento allergenico quali mucose, polmoni e linfonodi provenienti da topi preimmuni o immunizzati con Par j1.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti potranno essere oggetto di pubblicazioni su periodici specialistici di immunologia e allergologia per la comprensione dei meccanismi che regolano gli eventi precoci del differenziamento e dell'attivazione cellulare coinvolti nei fenomeni allergici e alla conoscenza delle interazioni tra proteine vegetali (allergeni pollinici), dotate di attività antimicrobica, e cellule del sistema immunitario coinvolte nei meccanismi della immunità innata. La comprensione di questi meccanismi potrebbe essere utile in futuro nell'impiego della modulazione della risposta allergica nella strategia vaccinale.

Studio di campo sull'efficacia e sicurezza di un vaccino innovativo per la protezione dall'infezione da *Leishmania* nel cane

- Obiettivi generali e specifici
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.
- Programma di attività e metodi
Il vaccino sarà costituito da un vettore virale modificato con un inserto di un gene di *Leishmania infantum*. Il prodotto, confezionato secondo GMP dalla Merial, verrà somministrato per tre volte, ad un mese di distanza, prima della stagione di trasmissione 2009. 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 (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 di meccanismi patogenetici autoimmuni nell'aterosclerosi e nel lupus eritematoso sistemico

L'identificazione di molecole *self* bersaglio di risposte autoimmuni e dei meccanismi responsabili della loro antigenicità rappresenta un obiettivo primario per la messa a punto di approcci terapeutici in patologie infiammatorie croniche caratterizzate da disregolazione immunitaria. Tra queste sono incluse l'aterosclerosi e il *lupus* eritematoso sistemico (LES), caratterizzate da disfunzione endoteliale. Gli obiettivi del progetto sono: i) l'identificazione di nuove molecole *self* target di fenomeni autoimmuni coinvolti nella patogenesi dell'aterosclerosi e del LES e l'individuazione dei meccanismi responsabili dell'antigenicità di tali molecole (in particolare le modificazioni strutturali dovute a ossidazione e glicazione). Tale obiettivo verrà perseguito mediante: a) screening di librerie di espressione di linee cellulari, in particolare endoteliali, con IgG dei pazienti; preparazione di proteine ricombinanti; b) preparazione di omogenati di placche aterosclerotiche, loro caratterizzazione mediante elettroforesi mono e bidimensionale, immunoblotting con IgG dei pazienti con aterosclerosi. Le bande o gli spot individuati verranno sottoposti a spettrometria di massa. ii) la valutazione dell'interazione degli autoantigeni identificati con cellule del sistema immunitario e cellule endoteliali mediante tecniche citofluorimetriche, immunochimiche ed immunoenzimatiche. Nei pazienti verrà valutata la presenza di una risposta cellulare e umorale verso gli autoantigeni identificati.

Risultati attesi nel triennio

Il primo risultato atteso è l'individuazione di molecole *self* bersaglio di reazioni autoimmuni implicate nella patogenesi dell'aterosclerosi carotidea e del *lupus* eritematoso sistemico e la caratterizzazione dei meccanismi responsabili dell'antigenicità di tali molecole. Un secondo risultato è la preparazione di proteine ricombinanti o modificate in seguito a fenomeni di ossidazione o glicazione da utilizzare per gli studi cellulari *in vitro* e per i test sierologici. Un terzo importante risultato è l'acquisizione di nuove conoscenze fisiopatologiche riguardo specifici meccanismi immunologici che intervengono nel danno vascolare, soprattutto per quanto concerne i meccanismi immunoregolatori e quelli legati all'instabilità della placca. In particolare si otterrà la caratterizzazione dell'interazione delle cellule dendritiche con gli autoantigeni identificati e sarà valutata la capacità di tali cellule di orientare la risposta dei linfociti T specifici. Si avranno inoltre informazioni sulla presenza di una risposta immunitaria specifica umorale e cellulare verso gli autoantigeni identificati in entrambe le categorie di pazienti e in soggetti sani di controllo.

Trasferibilità dei risultati

Le conoscenze acquisite potranno essere utilizzate per la messa a punto di terapie immunologiche cellulari e molecolari basate sull'immunomodulazione e sull'utilizzo di peptidi bloccanti allo scopo di prevenire la disfunzione endoteliale caratteristica dell'aterosclerosi e del LES o di arrestare la progressione della patologia aterosclerotica.

Studio di modelli sperimentali in vivo e in vitro per le ricerche sulla replicazione e patogenesi di virus dell'epatite e per la valutazione di antivirali e terapie combinate con vaccini

Le infezioni da virus dell'epatite di tipo B e di tipo C (HBV, HCV) hanno una diffusione globale e rappresentano la principale causa di malattia epatica nel mondo. Sono caratterizzate dallo stabilirsi di fasi di persistenza virale in un'elevata percentuale di soggetti infetti (10-30% dipendendo dall'età di infezione per HBV e >80% per HCV). L'infezione cronica induce lo sviluppo di cirrosi e la comparsa di carcinoma epatico (HCC).

La capacità del virus di interagire con i meccanismi molecolari cellulari orientando la cellula verso la morte o verso la persistenza rappresenta un argomento di studio fondamentale per la comprensione dei meccanismi di patogenesi in generale e per l'identificazione di processi e molecole che possono costituire il bersaglio dei farmaci antivirali e il punto di attacco per terapie combinate anche con vaccini.

I modelli di studio indispensabili anche per le fasi di ricerca preclinica hanno avuto uno sviluppo lento negli ultimi 10-15 anni per l'impossibilità di applicazione dei classici sistemi di coltivazione virale e per la scarsità di modelli animali.

Risultati attesi nel triennio

Il nostro gruppo ha sviluppato gli strumenti di base per l'utilizzazione del modello WHV/*Marmota monax* che costituisce il modello di elezione per lo studio dell'infezione da virus dell'epatite B e che meglio rappresenta il ciclo biologico dell'agente infettivo umano. Il modello viene in modo particolare applicato per studi sull'efficacia di prodotti antivirali, di nuove formulazioni vaccinali e di protocolli di vaccino-terapia e immunoterapia.

Nel caso dell'infezione da HCV, le capacità del virus di interagire con meccanismi molecolari cellulari orientando la cellula verso la morte o la persistenza può essere analizzata in sistemi di espressione delle proteine. Gli sviluppi più recenti e futuri sono rivolti a sistemi complessi quali linee cellulari tetraciclina-inducibili esprimenti più proteine strutturali e repliconi di HCV a genoma intero in linee cellulari di origine epatica. Nuovi sistemi promettenti sono rappresentati da sistemi di produzione di particelle *virus-like* e dall'utilizzazione del clone infettivo JFH-1 in cellule epatiche Huh-7.

Il piano di ricerca include:

- Sviluppo di terapie antivirali e vaccinali combinate per il controllo e l'eradicazione dell'infezione cronica da hepadnavirus e virus Delta anche attraverso il modello animale della *Marmota monax*.
- Valutazione di sostanze o composti antivirali, possibili candidati per la cura dell'infezione cronica da virus dell'epatite C, con la messa a punto di nuovi sistemi di replicazione *in vitro*.

Trasferibilità dei risultati

La trasferibilità dei risultati è relativa all'identificazione di nuovi protocolli e metodologie terapeutiche sia per quel che riguarda le specifiche sostanze che le loro combinazioni. L'incremento delle conoscenze sugli specifici meccanismi virali e di risposta cellulare e cellulomediata è propedeutico ed indispensabile per lo sviluppo di approcci mirati ed eventualmente combinati nel settore della vaccino-terapia nell'infezione cronica da virus epatitici.

Sviluppo di approcci terapeutici innovativi, contro l'infezione da virus influenzali, basati sull'uso di RNA interferenti diretti verso il gene virale NS-1 con attività anti-interferone: la realizzazione di una nuova arma contro la minaccia di una pandemia influenzale

I virus influenzali sono responsabili ancora oggi di una delle infezioni più diffuse su scala mondiale. Esiste inoltre il rischio che il virus dell'influenza aviaria H5N1 possa causare la prossima pandemia, contro cui la maggior parte della popolazione può risultare suscettibile. Nel caso di pandemia è probabile che la prima linea di difesa per l'uomo nei confronti del virus sia rappresentata dagli antivirali. Tuttavia la recente emergenza, nei virus influenzali circolanti, di resistenza verso entrambe le classi di antinfluenzali attualmente commercializzati, ha sottolineato la necessità di sviluppare al più presto nuove strategie antivirali, utili sia per l'influenza stagionale sia in caso di pandemia. I virus influenzali hanno la capacità di evadere il sistema Interferon (IFN) esprimendo proteine che ne inibiscono la produzione. La proteina NS1 in particolare, espressa sia dai virus influenzali umani che aviari, funziona come antagonista della produzione di IFN, permettendo così un'efficiente replicazione virale. Gli RNA interferenti, potente strumento usato in studi di base per silenziare l'espressione di singoli geni, sono già in fase di sviluppo come farmaci per il trattamento di diverse malattie virali umane e rappresentano un nuovo approccio terapeutico anche per l'influenza. Obiettivo del presente progetto è di produrre RNA interferenti in grado di silenziare l'NS1 virale, e di saggiarne, sia *in vitro* che *in vivo*, la capacità di ridurre l'infezione e la patogenicità.

Risultati attesi nel triennio

La finalità del progetto è quella di produrre e testare RNA interferenti specifici, in grado di abolire l'espressione delle proteine a funzione anti-IFN, espresse da virus influenzali umani e aviari e di ridurre la patogenicità dei suddetti virus in sistemi cellulari e in modelli animali. Ci proponiamo di inibire l'espressione dell'NS1, proteina estremamente conservata fra i diversi sottotipi di virus influenzali umani e aviari, con funzione chiave per la loro replicazione, risolvendo così il problema delle differenze fra i diversi ceppi dello stesso virus. RNA interferenti specifici saranno progettati ed espressi mediante vettori e ne verrà verificata l'efficacia nell'inibire la proteina virale bersaglio in modelli cellulari, nel contesto dell'infezione rispettivamente con virus influenzali umani e aviari. Verrà poi verificata la capacità dei suddetti RNA interferenti di inibire replicazione e la patogenicità di virus influenzali umani e aviari in topi Balb/c, attraverso misurazione dei parametri vitali, della produzione di virus nei tessuti e della produzione di IFN.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto è rilevante perché applicativo: produrre una nuova tipologia di farmaci efficaci nella profilassi e nella terapia contro virus influenzali umani e aviari, che pongono una minaccia alla salute pubblica. RNA interferenti specifici possono essere "progettati" e prodotti con estrema facilità e rapidità, fatto rilevante nel caso in cui insorgessero fenomeni di resistenza. Inoltre, gli RNA interferenti determinano l'inibizione dell'espressione di specifiche proteine virali, riducendo così il rischio di avere effetti collaterali indesiderati. Avendo come bersaglio la proteina NS1, dalla sequenza aminoacidica estremamente conservata, gli RNA interferenti specifici sono in grado di funzionare contro diversi ceppi dello stesso virus. La ricerca di base, limitata alla sola progettazione e verifica del funzionamento degli RNA interferenti specifici, rende i risultati che si otterrebbero dal progetto trasferibili in tempi brevi all'SSN.

Sviluppo di attività di sorveglianza di laboratorio per la pertosse

L'esperienza maturata da oltre dieci anni nell'ambito della problematica di ricerca relativa a *Bordetella pertussis* e basata sulla realizzazione del *trial* clinico per la valutazione dell'efficacia

dei vaccini acellulari antipertosse e coordinato dall'ISS dal 1992 al 1999, ha permesso di partecipare ad un network di 13 Laboratori di riferimento e di ricerca appartenenti a nove Paesi europei. Questo network coordinato dal Dott. H. Quishi e dal Prof. J. Mertsola del *National Public Health Institute*, Turku, Finlandia, avrà come compito di sviluppare e rafforzare le attività di laboratorio per la sorveglianza della pertosse. Il network ha lo scopo di individuare laboratori di riferimento per la pertosse in ogni Paese europeo e di definire criteri univoci per la diagnosi di pertosse (clinica e/o microbiologica), di validare protocolli per l'identificazione da campioni clinici di *Bordetella pertussis* e altre Bordetelle anche con metodi molecolari, come la *realtime* PCR, standardizzare metodi per la tipizzazione molecolare dei ceppi isolati.

Risultati attesi nel triennio

Questo network è la continuazione ed espansione di un network europeo preesistente, Eupertstrain, che ha come obiettivi principali quelli di aumentare le conoscenze relative a *B. pertussis* oltre ad implementare la sorveglianza e la collezione di ceppi di isolamento clinico. Lo studio interattivo, tra i vari partecipanti sulle diverse tematiche inserite nel progetto, permetterà di armonizzare i criteri e i metodi per la diagnosi di laboratorio e la tipizzazione dei ceppi isolati da casi di pertosse.

Trasferibilità dei risultati

La natura di questa attività fornisce uniche opportunità per armonizzare, tra i diversi Paesi europei partecipanti, i criteri e i metodi per la diagnosi di laboratorio e la tipizzazione dei ceppi isolati da casi di pertosse. Specifici training e meeting verranno organizzati per lo scambio di dati e per la discussione degli argomenti di interesse che verranno evidenziati durante il corso del progetto.

Sviluppo di nuovi farmaci contro l'infezione da HIV-1. Trattamento del virus farmaco-resistente ed eradicazione dell'infezione dall'organismo

La latenza virale è il principale ostacolo al conseguimento dell'eradicazione di HIV-1 dall'organismo, e quindi alla guarigione dall'infezione. Inoltre, nonostante la terapia antiretrovirale di combinazione (ART) abbia prodotto notevoli risultati per quanto riguarda l'allungamento e la qualità della vita dei soggetti con HIV/AIDS, una certa quota di virus circolante presenta mutazioni di farmaco-resistenza che compromettono l'efficacia della ART.

Una possibile via verso la soluzione del problema HIV-1/AIDS potrebbe passare attraverso tre fasi successive:

- indurre le cellule latentemente infettate ad esprimere antigeni virali che ne facilitino il riconoscimento;
- intensificare il regime della terapia antiretrovirale;
- uccidere selettivamente le cellule latentemente infettate sfruttando specifici farmaci.

A tale proposito verranno sintetizzate appropriate molecole in grado di:

- riattivare epigeneticamente HIV-1 attraverso l'inibizione specifica dell'istone deacetilasi 2 (HDAC2), un enzima coinvolto nel mantenimento della latenza;
- inibire le proteasi di virus farmaco-resistenti e non, attraverso legami specifici con lo scheletro proteico piuttosto che con catene laterali (prone a mutazioni);
- uccidere selettivamente le cellule infettate potenziando lo stress ossidativo virus-indotto dopo la riattivazione.

Risultati attesi nel triennio

- Per quanto riguarda la riattivazione di HIV-1, ci attendiamo: i) una migliore caratterizzazione dell'efficacia degli inibitori delle HDAC già in nostro possesso e coperti da richiesta di brevetto ISS (Savarino, Mai, Palamara, Garaci/UK); ii) l'identificazione di inibitori delle HDAC di seconda generazione con aumentata efficacia contro HDAC2; iii)

l'identificazione di nuovi target farmacologici attraverso la caratterizzazione molecolare di cellule linfoidi durante la fuoriuscita del virus dalla fase di latenza.

- Per quanto riguarda l'intensificazione della ART, ci attendiamo di identificare, attraverso studi di *molecular docking*, e screening di *library* di inibitori delle proteasi messi a punto dal gruppo del Prof. Guarna (Università Firenze), composti-guida per il successivo sviluppo di inibitori della proteasi di HIV-1 efficaci su ceppi farmaco-resistenti. Saranno inoltre pubblicati i risultati di analisi comparate dell'efficacia dei composti della suddetta *library* su proteasi di HIV-1 farmaco-resistenti e non, e su proteasi aspartiche secretorie di *Candida albicans*. Questi ultimi dati saranno messi a disposizione dal nostro gruppo e permetteranno ulteriori cicli di ottimizzazione della specificità dei composti.
- Verrà effettuata un'ulteriore caratterizzazione degli effetti della butionina sulfossimina (BSO), un inibitore della sintesi di glutatione i cui effetti tossici selettivi per le cellule infettate sono stati brevettati dall'Istituto.

Trasferibilità dei risultati

Si prevede di ottenere nuovi brevetti (e di valorizzare brevetti esistenti). Questi si prevede che possano essere di grande interesse per l'industria farmaceutica. In particolare:

- gli inibitori delle proteasi di HIV-1 farmaco-resistenti sono oggetto di intensa ricerca per via dell'enorme impatto delle farmacoresistenze su prognosi e successo terapeutico del paziente con HIV-1.
- Strategie potenzialmente in grado di eliminare il virus dall'organismo 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-1.

Sviluppo di un vaccino sperimentale contro il virus dell'Epatite C (HCV): produzione di *virus like particle* retrovirali contenenti antigeni HCV

Il progetto prevede la partecipazione del Reparto Virus epatitici. L'infezione da virus dell'Epatite C è la principale causa di malattia epatica cronica nel mondo. Lo sviluppo di un vaccino preventivo rappresenta uno dei principali traguardi attuali. Il controllo dell'infezione sembra essere influenzato in maniera significativa da una risposta immune mediata da cellule T CD8+ infatti questo tipo di cellule T è rilevabile in soggetti guariti dall'infezione acuta. Il progetto prevede la produzione di tre differenti *Virus Like Particle* (VLP) retrovirali incorporanti ognuna il prodotto di fusione fra la proteina Nef7 di HIV-1 e una di tre differenti proteine (E1, E2, NS3) di HCV. Nef7 è una forma mutata della proteina Nef di HIV-1 che ha la capacità di incorporarsi in particelle retro- o lentivirali in grandi quantità, fino a cento volte in più rispetto a Nef *wild-type*. Inoltre, Nef7 è in grado di veicolare nelle particelle virali proteine eterologhe sotto forma di prodotti di fusione con un'efficienza praticamente immodificata. L'obiettivo generale del progetto è quello di impiegare il sistema delle VLP a base retro-lentivirale e incorporanti elevate quantità di antigeni HCV, per studiare la presentazione di tali antigeni da parte di cellule dendritiche (DC) umane nella prospettiva di proporre una strategia vaccinale innovativa per il controllo dell'infezione da HCV.

Risultati attesi nel triennio

A questo riguardo, sono già state prodotte e caratterizzate significative quantità di VLP su base HIV-1 e pseudotipizzate con la proteina G del virus della stomatite vescicolare (VSV-G), che incorporano rilevanti quantità dei rispettivi prodotti di fusione (Nef7-E1, Nef7-E2 e Nef7-NS3).

Le diverse preparazioni di VLP sono state già valutate per la loro capacità di essere incorporate da DC isolate dalle cellule del sangue (PBMC) di pazienti HCV e per la loro

capacità di stimolare l'attivazione di linfociti *memory* dello stesso paziente rilevata con saggi ELISPOT per IFN- γ e IL-4.

L'induzione di immunità contro ciascuno dei prodotti HCV verrà monitorata dopo inoculazione di adeguate quantità di VLP in topi C57/Black o Balb/c sia mediante saggi ELISA sui sieri (immunità umorale) che con ELISPOT sugli splenociti incubati con appropriati peptidi derivati dagli antigeni di HCV (immunità cellulare).

Trasferibilità dei risultati

La produzione di VLP contenenti elevate quantità di antigeni di HCV rappresenta uno strumento per studiare la presentazione degli antigeni HCV da parte delle cellule dendritiche umane nella prospettiva di nuove strategie vaccinali anti-HCV.

Il sistema delle VLP proposto può essere considerato come una piattaforma biotecnologica per produrre reagenti immunogenici capaci di indurre una risposta CD8 specifica verso antigeni di HCV.

Sviluppo e validazione di tecniche sierologiche per la diagnosi di zoonosi parassitarie nell'uomo, e per la sorveglianza epidemiologica nella fauna selvatica

Nell'uomo, uno dei rischi più gravi collegati all'infezione cronica da *Opisthorchis sp.*, parassitosi emergente dovuta al consumo di pesce (*familia Cyprinidae*) crudo infestato con questo trematode, è l'elevata suscettibilità a certe patologie delle vie biliari, ad esempio, la colelitiasi, la colecistite, la colangite e il colangiocarcinoma. Ne consegue l'importanza di stabilire una diagnosi definitiva precocemente, per potere iniziare in tempi brevi un trattamento specifico. Scopo del presente progetto è lo sviluppo di un ELISA per la ricerca di anticorpi anti-*Opisthorchis* in siero e urina di persone con sospetta infezione, usando antigeni di escrezione/secrezione del parassita. Il test sviluppato dovrà avere una sensibilità diagnostica superiore a quelli usati attualmente, tanto diretti (esame di campioni fecali) o indiretti (ricerca di anticorpi anti-*Opisthorchis* mediante test che utilizzano antigeni crudi provenienti del parassita adulto). Inoltre il nuovo test dovrà identificare correttamente gli individui che non presentano anticorpi anti-*Opisthorchis* ma che invece presentano anticorpi verso altri parassiti filogenicamente affini.

Nel controllo dell'infestazione per *Trichinella*, è fondamentale lo studio della presenza del parassita nella fauna selvatica (fondamentalmente costituita da cinghiali e volpi) presente in prossimità agli allevamenti di suini. A questo proposito, necessita lo sviluppo di test diagnostici per la sorveglianza epidemiologica della trichinellosi selvatica in aree ad alto rischio. I test dovranno garantire un livello alto di specificità, in quanto la maggior parte della fauna selvatica è parassitata con elminti e in particolare con nematodi, che condividono antigeni di *Trichinella spp.*

Risultati attesi nel triennio

Dal punto di vista diagnostico, la capacità dei test di identificare correttamente l'infezione parassitaria oggetto di studio (sensibilità) o di confermare l'assenza di infezione (specificità), anche in presenza di altre infezioni, non dovrà essere inferiore al 90%.

Dal punto di vista del controllo epidemiologico, i test dovranno controllare l'assenza di infezione nell'area sotto studio.

Trasferibilità dei risultati

Si provvederà ad informare il personale dell'SSN dei risultati ottenuti mediante presentazioni a congressi e convegni scientifici e tramite l'organizzazione di workshop su temi specifici. Inoltre i principali e più significativi risultati del progetto saranno oggetto di pubblicazioni su riviste internazionali e nazionali.

In base alle caratteristiche prestazionali dei test raggiunte si procederà alla loro applicazione su larga scala.

The physiological basis of hypervirulence in *Clostridium difficile*: a prerequisite for effective infection control

Il progetto finanziato dalla Commissione Europea (HEALTH-F3-2008-223585) si propone di comprendere i fattori fisiologici che determinano la ipervirulenza del clone mondiale epidemico *C. difficile* 027 raggiungendo i seguenti obiettivi: i) determinare la correlazione tra ipervirulenza e qualità/quantità di tossine prodotte; ii) determinare e caratterizzare gli epitopi immunogenici della tossina B del ceppo 027; iii) studiare la correlazione tra ipervirulenza e fattori di colonizzazione del ceppo, in particolare caratterizzare il ruolo delle proteine costituenti l'*S-layer* nei processi di immunomodulazione; iv) definire il ruolo di elementi genetici mobili e in particolare trasposoni coniugativi nell'aumento della virulenza del ceppo 027; v) mediante studi di epidemiologia molecolare, determinare la prevalenza di ceppi ipervirulenti nella popolazione umana e in quella animale.

Risultati attesi nel triennio

Mappe di epitopi di tossina B del ceppo ipervirulento; collezione di *pattern* di proteine dell'*S-layer* e identificazione dei *marker* di maturazione delle cellule dendritiche; profili di citochine proinfiammatorie prodotte da proteine dell'*S-layer* del ceppo ipervirulento; elementi genetici mobili che conferiscono caratteri di ipervirulenza; selezione di candidati vaccinali tra le proteine coinvolte nella colonizzazione; collezione rappresentativa di ceppi ipervirulenti isolati nell'uomo e negli animali

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti alla fine del progetto saranno trasferiti alla comunità internazionale mediante gli strumenti propri della Comunità Europea e dunque tramite pubblicazioni su riviste scientifiche *peer-review*, sito web dedicato, incontri con i responsabili dello sviluppo di vaccini, brevetti di kit diagnostici per una diagnosi molecolare.

Tipizzazione genetica dei ceppi di *Giardia duodenalis* che infettano l'uomo

Giardia duodenalis è un parassita intestinale ubiquitario che infetta molte specie animali e con un'alta prevalenza anche l'uomo. In particolare, l'uomo è infettato da due varianti genetiche del parassita definite assemblaggio A e assemblaggio B che sono indistinguibili morfologicamente tra di loro. Per questa ragione la correlazione tra gli effetti patologici, molto variabili, e il ceppo del parassita è rimasta indeterminata.

Lo scopo di questo progetto è l'identificazione di marcatori genetici specifici che permettano la distinzione tra i due genotipi in modo rapido per affrontare l'epidemiologia molecolare di questo parassita.

Risultati attesi nel triennio

Test molecolare basato su un saggio di PCR per la distinzione dei due assemblaggi di *G. duodenalis*.

Trasferibilità dei risultati

Si provvederà ad informare il personale dell'SSN dei risultati ottenuti mediante presentazioni a congressi e convegni scientifici e tramite l'organizzazione di workshop su temi specifici. Inoltre i principali e più significativi risultati del progetto saranno oggetto di pubblicazioni su riviste internazionali e nazionali.

Tossina della pertosse geneticamente detossificata come adiuvante in grado di indurre risposte protettive contro patogeni infettivi

Sebbene la ricerca di adiuvanti in grado di potenziare l'immunogenicità di un vaccino sia stata perseguita assiduamente negli ultimi 70 anni, soltanto per pochi di essi ne è stato autorizzato l'utilizzo nell'uomo, e l'individuazione di molecole in grado di promuovere e potenziare risposte protettive verso una serie di malattie infettive e non nocive alla salute umana è al momento una priorità per la ricerca bio-medica.

La tossina della pertosse geneticamente detossificata (dPT) è stata inizialmente prodotta come componente essenziale dei vaccini contro la pertosse (Pizza, *et al. Science* 1989) e il suo utilizzo nell'uomo è stato di conseguenza testato ampiamente e approvato.

Il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che la dPT è un adiuvante in grado di polarizzare in senso Th1 le funzioni di cellule dendritiche (DC) umane stimolandone la maturazione, aumentandone la capacità di presentazione antigenica e inducendo preferenzialmente citochine Th1, quali l'interleuchina (IL)-12 (Ausiello, *et al. JID* 2002). Più recentemente abbiamo ottenuto risultati che suggeriscono la capacità della dPT di promuovere una polarizzazione mista di tipo Th1/Th17, potenzialmente efficace nel proteggere contro patogeni sia fungini che batterici.

Risultati attesi nel triennio

Date queste premesse si intende caratterizzare in maniera più approfondita l'azione adiuvante della dPT, sia utilizzando un modello *ex vivo* di DC umane, sia analizzandola *in vivo*.

Per quanto riguarda gli studi su DC umane, queste verranno differenziate *ex vivo* da precursori CD14 in presenza di GM-CSF e IL-4. L'attività di adjuvanza sarà studiata analizzando i parametri di attivazione indotti dalla dPT 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, e dell'asse Th17, quali IL-23, IL-1 β e IL-6. Intendiamo inoltre identificare il recettore specifico nell'ambito della famiglia dei recettori TLR.

Una volta caratterizzati i meccanismi alla base della attività adiuvante della dPT, sarà possibile saggiarne gli effetti.

Ci proponiamo di valutare l'efficacia della dPT nel modulare e potenziare le risposte indotte *in vitro* da diversi vaccini anti-influenzali (a subunità o inattivati) in termini di maturazione di DC, profilo citochinico indotto e capacità di polarizzare linfociti T-helper.

Intendiamo, inoltre, utilizzare la dPT *in vivo* in associazione con un vaccino sperimentale diretto contro *C. albicans* (Torosantucci A, *et al. JEM* 2005). Topi vaccinati in presenza o assenza di dPT saranno infettati con *C. albicans* e verranno valutati il tasso di sopravvivenza all'infezione, così come i profili della risposta immune indotta.

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 stimulate con dPT. 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 (*C. albicans*) o batteriche (*M. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *M. tuberculosis*, *B. pertussis*), scarsamente potenziate dagli adiuvanti attualmente in uso.

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, e di brevetti di protocolli diagnostici sono punti focali della progettualità.

Il progetto è parzialmente finanziato nell'ambito della collaborazione scientifica Italia-USA.

Towards the establishment of a permanent European Virtual Institute dedicated to Malaria Research (EVIMalaR). Network of Excellence

La rete di eccellenza EVIMalaR, proposta nell'ambito di FP7 con la durata di cinque anni, si avvale di 42 gruppi attivi nella ricerca in malaria provenienti da 27 istituzioni europee, quattro istituzioni africane, il Centro Internazionale di Ingegneria Genetica e Biotecnologia (ICGEB) di Nuova Delhi e gruppi rappresentativi dell'*Australian Malaria Research Network*. Attività chiave del Network proposto saranno: la formazione di una scuola stabile di Dottorato in malaria, la creazione di risorse condivise come database, banche di reagenti. Le attività di ricerca proposte e condotte in collaborazione dalle istituzioni partecipanti saranno organizzate in *cluster*. *Cluster 1: "Immunobiology and Pathophysiology"*, dedicato allo studio delle interazioni ospite/parassita; *Cluster 2: "Parasite Molecular And Cell Biology"* incentrato sullo studio dell'espressione genica, delle interazioni proteina-proteina e sui meccanismi di invasione; *Cluster 3: "Vector Biology"*, dedicato alle interazioni vettore/parassita; *Cluster 4: "Genetics and Population Biology"*, incentrato sullo studio di *loci* di *Anopheles* e dell'ospite umano importanti per l'infezione del parassita e per la trasmissione; *Cluster 5: "Modelling and Systems Biology"*, dedicato al miglioramento dell'annotazione del genoma del parassita, e all'applicazione dei nuovi approcci della "*systems biology*" all'analisi di data sets prodotti nel corso del progetto.

Risultati attesi nel triennio

Le attività che coinvolgono l'ISS (*Cluster 2 e 5*) saranno incentrate sulla caratterizzazione del proteoma dei domini funzionali di membrana *lipid raft* nel corso dello sviluppo sessuale del parassita. Si prevede che nel corso del progetto saranno identificate e caratterizzate molecole chiave coinvolte nel *trafficking* e *signaling*. Saranno inoltre caratterizzate funzionalmente membri di famiglie di proteine esportate nel citoplasma della cellula ospite e coinvolte nel suo rimodellamento. L'ISS sarà inoltre coinvolto nell'organizzazione di meeting e nella condivisione di piattaforme tecnologiche (proteomica, *cell sorting*).

Trasferibilità dei risultati

Principali obiettivi di EVIMalaR saranno la realizzazione di una Scuola europea di dottorato in malaria e la organizzazione di un Istituto europeo virtuale che si occupi di ricerca avanzata in Malaria.

Tubercolosi latente: nuovi strumenti per la diagnosi e l'eradicazione di *Mycobacterium tuberculosis* dormiente (progetto europeo StopLatent-TB)

Si stima che due miliardi di persone siano infettate in maniera latente con *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). In questi pazienti Mtb può trovarsi in uno stato di persistenza non replicativa (dormienza) in lesioni poco ossigenate dei polmoni (tubercolomi). In tali condizioni i bacilli sono difficili da mettere in evidenza nei tessuti e refrattari ai farmaci, rendendo possibile la riattivazione del 10% dei casi da tubercolosi (TB) latente a TB attiva. Abbiamo approntato un modello per la produzione di Mtb dormiente mediante diminuzione graduale dell'ossigeno (modello di Wayne) che ci permette di avere bacilli in fase aerobia, microaerofila e anaerobia. Con tale approccio è possibile studiare l'espressione genica delle varie fasi di Mtb *in vitro* ed *ex vivo* allo scopo di comprendere meglio i meccanismi molecolari che determinano l'entrata, il mantenimento e l'uscita dallo stato di dormienza. Viene inoltre studiata l'attività di farmaci antitubercolari, già in commercio e di nuova sintesi, sia da soli che in combinazione. Nel triennio 2008-2010 questi studi sono finanziati dal progetto europeo StopLatent TB che comprende sette partner e sei *Workpackage* (1. Modelli *in vitro*; 2. Infezioni cellulari con Mtb dormiente; 3. Infezioni nell'animale; 4. Attività dei farmaci; 5. Distribuzione del dormiente nei tessuti; 6. Management. Le nostre attività si inscrivono in particolare nel *workpackage 2* (infezioni di cellule THP-1 con Mtb dormiente) e 4 (attività di combinazioni di farmaci).

Risultati attesi nel triennio

- Acquisizione di nuove conoscenze microbiologiche e molecolari (mediante *real-time* PCR e *microarray*) sull'entrata, il mantenimento e l'uscita di Mtb dallo stato di dormienza *in vitro* e all'interno di cellule monocitarie (THP-1). Caratterizzazione ultrastrutturale dei bacilli tubercolari all'interno dei fagociti.
- Identificazione di nuove combinazioni di farmaci (già in commercio e/o di nuova sintesi) inibenti e/o sterilizzanti Mtb dormiente. Studio dell'attività delle combinazioni di farmaci *in vitro* e all'interno di cellule THP-1. Le migliori combinazioni *in vitro* e/o *ex vivo* potranno venire saggiate in modelli animali nell'ambito del *workpackage* 3 del progetto StopLatent-TB.
- Gli sviluppi futuri di questi studi mirano a confrontare le caratteristiche biologiche dei bacilli tubercolari aerobi, microaerofili, anaerobi, e dei *persisters*, ovvero di cellule fenotipicamente resistenti (ma genotipicamente sensibili) ai farmaci che sopravvivono in presenza di elevate concentrazioni di farmaci e che rappresentano l'ostacolo maggiore all'eradicazione della TB.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di queste attività saranno presentati in comunicazioni a congresso e in pubblicazioni scientifiche e potranno essere di utilità per diminuire la durata della terapia della TB attiva e latente.

Un approccio multidisciplinare per lo studio dei meccanismi di protezione verso la pertosse: identificazione del ruolo dei fattori di virulenza nell'interazione con il sistema immune dell'ospite

Bordetella pertussis è l'agente eziologico della pertosse, una delle principali cause di malattia e mortalità infantile nel mondo, anche in Paesi con ampia copertura vaccinale. La diffusione della malattia è spiegata dal progressivo diminuire dell'immunità indotta dalla vaccinazione. I meccanismi immunitari che mediano la protezione conferita dai vaccini anti-pertosse non sono stati ancora completamente chiariti, né i correlati di protezione identificati. È necessario quindi avere una migliore comprensione delle basi immunologiche della risposta verso *B. pertussis*. È importante comprendere il ruolo che i fattori di virulenza, tossine e adesine, giocano nell'interazione con il sistema immune dell'ospite, questo anche per deciderne l'eventuale loro inserimento o eliminazione dai vaccini acellulari di nuova generazione.

Considerando il ruolo centrale che le cellule dendritiche (DC) hanno nella regolazione della risposta immunitaria, comprendere i meccanismi che influenzano le funzioni delle DC ha un'importanza fondamentale, quindi punto focale è approfondire l'interazione tra DC umane e *B. pertussis*. Parallelamente, intendiamo sviluppare nuovi saggi per misurare la risposta immunitaria indotta dai fattori di virulenza in termini di risposta anticorpale e di risposta T, identificando la presenza di cellule della memoria centrale ed effettrice.

Risultati attesi nel triennio

Obiettivi:

- Stabilire se il batterio e i singoli fattori di virulenza purificati siano in grado di indurre la transizione fenotipica e funzionale delle DC e nel promuovere risposte polarizzate verso un di tipo Th-1, Th-2, Th-17 o, al contrario, T-reg che permettano al batterio di sfuggire alla risposta immunitaria dell'ospite.
- Analizzare la capacità dei diversi fattori di virulenza di esercitare effetti positivi o negativi sull'immunità anti-pertosse e valutare se possano contribuire o meno a rendere un vaccino più efficace.

- Analizzare l'espressione di specifici recettori di membrana e la produzione di citochine immunoregatorie, per definirne meglio il loro contributo al tipo di risposta immunitaria che si evidenzierà.
- Saggi *in vitro* su sangue intero con lo scopo di avere a disposizione una metodica semplice che richiede limitate quantità di sangue, utilizzabile quindi anche nei neonati, che permetta di meglio definire i correlati di protezione verso la pertosse in studi di popolazione.

Trasferibilità dei risultati

Individuazione dei meccanismi dell'immunità anti-pertosse. L'analisi degli effetti mediati dai fattori di virulenza permetterà di stabilire un loro utilizzo come nuovi antigeni vaccinali e/o adiuvanti.

L'introduzione di saggi di risposta T direttamente dal sangue intero permetterà di introdurre tali analisi in campioni di più vasta scala. Sarà possibile identificare correlati di protezione che permetteranno di valutare la reale efficacia di nuovi componenti vaccinali o adiuvanti.

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 per nuovi adiuvanti, antigeni vaccinali e/o protocolli terapeutici sono punti focali della progettualità.

Questo è la prosecuzione di uno studio già approvato nello scorso triennio e le pubblicazioni recenti più importanti ottenute sono: Fedele G, Nasso M, *et al. J Immunol* 2008;181:208-16; Palazzo R, Spensieri F, *et al. Clin Vaccine Immunol* 2008;15:327-37; Fedele G, *et al. Microbes Infect* 2007;9:855-63; Spensieri F, Fedele G, *et al. Infect Immun* 2006;74:2831-8.

Utilizzo dei tamponi congiuntivali come target d'infezione nella diagnosi molecolare della Leishmaniosi canina

La leishmaniosi viscerale zoonotica (LVZ) causata da *Leishmania infantum* rappresenta un importante problema di sanità pubblica nel Bacino del Mediterraneo. Il serbatoio principale della malattia è il cane, ospite molto sensibile che può svolgere il ruolo di sentinella della malattia. L'emergente espansione della LVZ dai territori storicamente endemici in aree ritenute indenni, ha portato negli ultimi anni a una continua ricerca e valutazione di metodiche sensibili e poco invasive da applicare sul cane. Tali metodiche hanno due obiettivi principali la diagnosi precoce della leishmaniosi canina (LCan) e la valutazione del suo decorso dopo terapia. In questi anni le tecniche PCR sono evolute come le procedure più sensibili fornendo un fondamentale contributo alla diagnosi della LVZ; una considerevole varietà di tessuti canini sono stati perciò utilizzati e valutati a tale scopo. Nel presente progetto si è voluta analizzare la fattibilità dell'associazione del campione non invasivo (tampone congiuntivale) con una procedura molecolare di provata ed elevata sensibilità e specificità (*nested-PCR*). Cani residenti in Italia Centrale, provenienti da zone endemiche e non della LVZ saranno sottoposti ad analisi cliniche, sierologiche, parassitologiche e molecolari per il raggiungimento di due obiettivi: i) Validazione del campione tampone congiuntivale nella diagnosi molecolare della LCan; ii) Validazione della *nested-PCR* su tampone congiuntivale nel follow up terapeutico della LCan.

Risultati attesi nel triennio

- Elaborazione di un database sulla distribuzione della LCan in Italia Centrale;
- Elaborazione di un database sull'impatto della LCan sul personale sanitario locale;
- Identificazione di casi di Leishmaniosi Viscerale e Leishmaniosi Cutanea umana autoctoni e/o di importazione nel territorio sotto studio;
- Identificazione di casi di LCan autoctoni e/o d'importazione nel territorio sotto studio;

- Valutazione del tampone congiuntivale come campione non invasivo utile nella diagnosi molecolare precoce della LCan e della sua efficacia nel tempo;
- Valutazione della diagnosi molecolare tramite *nested*-PCR su tampone congiuntivale su cani affetti dal LCan e in corso di trattamento terapeutico.

Trasferibilità dei risultati

- Sorveglianza e controllo della leishmaniosi canina in Italia.
- Sorveglianza e controllo dell'espansione della leishmaniosi viscerale zoonotica umana in Italia.
- Diagnosi precoce della leishmaniosi canina.
- Valutazione dello stadio della malattia in cani affetti dalla leishmaniosi canina e sottoposti a terapia.
- Valutazione della *nested*-PCR specifica per *Leishmania* su tamponi congiuntivali in studi di farmacovigilanza.

Vaccinazione per via nasale contro infezioni respiratorie in neonati – Child-INNOVAC

Nonostante i grandi progressi fatti nella prevenzione e trattamento delle malattie infettive, le infezioni respiratorie rappresentano un rischio importante per i neonati. In particolare la pertosse e l'infezione da virus sinciziale respiratorio (RSV). Benché verso la pertosse esistano vaccini efficaci, l'infezione nei primi mesi (2-3) di vita è responsabile di alti livelli di mortalità. A tutto oggi non ci sono disponibili vaccini contro l'infezione da RSV, anch'essa causa di mortalità e morbilità nei primi mesi di vita del neonato. Il progetto finanziato dalla comunità europea si basa sulla necessità di indurre già nei primi mesi una risposta protettiva.

Il vaccino proposto dal progetto *Child-INNOVAC* è un nuovo vaccino da somministrare per via nasale contro i due più importanti patogeni delle vie respiratorie dei neonati e consiste in una *Bordetella* attenuata che è in grado già dopo un primo inoculo di proteggere dall'infezione in un modello sperimentale. Il razionale si basa sul fatto che i neonati sono in grado di indurre una forte risposta immunitaria in seguito all'infezione naturale. Durante il progetto sarà verificato l'innocuità del vaccino in volontari adulti e quindi il suo possibile uso anche come dose di richiamo in soggetti già vaccinati nell'infanzia/adolescenza. 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. Il progetto prevede inoltre la creazione un vaccino attivo contro la bronchiolite, altra affezione respiratoria particolarmente grave nei neonati.

Risultati attesi nel triennio

B. pertussis BPZE1 attenuata è già a disposizione di partner europei e si è vista essere protettiva in un modello murino d'infezione quando somministrato per via nasale. Noi in ISS ci dobbiamo occupare dello studio dell'immunità indotta da BPZE1 in un modello umano *ex vivo* di cellule dendritiche monocita-derivate (MDDC), valutando il profilo di citochine che il vaccino è in grado di indurre nelle MDDC e quale tipo di polarizzazione siano in grado di indurre nei Th, a loro volta, le MDDC trattate con BPZE1. Parallelamente la risposta immune della memoria immunologia sia B che T indotta dall'infezione, nel primo anno di vita, e dalla vaccinazione, confrontando i vari tipi di vaccini (cellulari e acellulari), verrà studiata in bambini appartenenti a diverse classi di età. Quest'analisi servirà come base per la valutazione immunogenica del nuovo vaccino BPZE1. Infine BPZE1 sarà anche sviluppato come vettore per la presentazione di antigeni di RSV alla mucosa respiratoria. In questo ambito valuteremo l'immunità indotta da RSV-BPZE1 nel nostro modello sperimentale di MDDC.

Trasferibilità dei risultati

Il raggiungimento dei risultati previsti dal progetto porterà all'allestimento di ulteriori *trial* clinici con BPZE1 e allo sviluppo di vaccini multivalenti da somministrare per via nasale per indurre una protezione contro differenti patogeni respiratori simultaneamente. La via per arrivare all'uso clinico di questo nuovo vaccino è ancora lunga ma, considerato anche il minor costo per la produzione di questi tipi di vaccini, la sua realizzazione potrà sicuramente contribuire alla diminuzione delle morti per affezioni respiratorie anche nei Paesi in via di sviluppo dove questa malattia miete il maggior numero di vittime. Le pubblicazioni dei risultati su riviste internazionali di forte impatto, l'invio di abstract a congressi nazionali e internazionali, sono gli indicatori che si intende raggiungere.

Vaccini e immunomodulatori: caratterizzazione e regolazione dell'immunità protettiva e non-protettiva nell'infezione da *Mycobacterium tuberculosis*

Sebbene si attribuisca un ruolo essenziale alla risposta Th1 nella protezione verso infezione da *M. tuberculosis* (MTB), è ancora ignoto cosa sia realmente necessario per la protezione, perché risposte Th1 protettive perdano d'efficacia in corso d'infezione e cosa differenzia la risposta protettiva dall'infiammazione IFN-g mediata responsabile del danno polmonare. Caratterizzeremo i meccanismi (molecolari e cellulari) che inducono e regolano la risposta Th1 protettiva e non, utilizzando un modello murino di tubercolosi (TB) messo a punto in precedenza. In tale modello, il *boosting* con la proteina Ag85B, antigene immunodominante di MTB, induce un eccessivo aumento di IFN-g da cellule T CD4 e causa la perdita della protezione indotta da immunizzazione con solo Ag85-DNA. Topi *wilde type*, B cell-/-, depleti per alcune sub-popolazioni di T CD4 o CD8, verranno immunizzati s.c, i.n, i.m. con Ag85B (varie combinazioni DNA e proteina), in associazione con altri antigeni di MTB o BCG e in presenza di nuovi adiuvanti e/o ligandi per molecole costimolatorie dei T. I topi verranno poi infettati con MTB. Caratterizzeremo, con studi funzionali e analisi del fenotipo *in vitro* e *in vivo*, le risposte Ag85B-specifiche (Th1, Th2, Th17, CD4 e CD8 Treg, cellule dendritiche, linfociti B) nella milza, nei linfonodi e nel polmone di topi prima e durante l'infezione con MTB. L'analisi immunologica sarà associata alla valutazione della carica batterica e del danno tissutale nei polmoni.

Risultati attesi nel triennio

Questi studi sono volti a: i) caratterizzare la risposta Ag85 specifica Th1 protettiva e non protettiva durante l'infezione *in vivo* con MTB e il suo evolversi in corso d'infezione; ii) valutare il ruolo delle cellule B, anticorpi, sottopopolazioni di cellule dendritiche e di cellule T CD8 nell'induzione/polarizzazione della risposta Ag85 specifica Th1 protettiva e non protettiva; iii) identificare il ruolo di cellule T regolatorie, CD4 e CD8, nella modulazione della risposta protettiva *in vitro* e *in vivo* e caratterizzare i loro meccanismi d'azione; iv) identificare le citochine e chemochine coinvolte nella risposta antigenica, loro interazioni e loro modulazione in corso d'infezione; v) identificare gli epitopi di Ag85B associati con la protezione e quelli che inducono risposte non-protettive; vi) identificare nuovi adiuvanti sistemici e mucosali che migliorino la protezione verso Ag85B; vii) identificare molecole co-stimolatorie dei T (TNF-R family) in grado di modulare *in vivo* e *in vitro* le risposte Ag85B-specifiche protettive e non-protettive. Tutto ciò permetterà di identificare correlati di protezione, di individuare nuovi target capaci di aumentare e mantenere nel tempo la risposta Th1 protettiva, e/o di identificare nuovi target che, de-regolando la risposta infiammatoria non-protettiva, riducano il danno polmonare e la capacità di antagonizzare la risposta protettiva. Le informazioni ottenute nel topo verranno poi verificate nell'uomo.

Trasferibilità dei risultati

La caratterizzazione fenotipica e funzionale delle sottopopolazioni di cellule T CD4 e delle citochine/chemochine coinvolte nella protezione ci permetterà di individuare correlati di protezione, ancora poco noti nella TB. L'identificazione dei meccanismi cellulari e molecolari che in corso d'infezione regolano la risposta IFN-g CD4 mediata, permetterà di identificare nuovi target terapeutici per mantenere la corretta attivazione della risposta Th1 protettiva e spegnere l'infiammazione dannosa. L'identificazione di nuovi adiuvanti, immunomodulatori e protocolli vaccinali con Ag85B potrà favorire il perdurare della risposta protettiva vaccinale e lo sviluppo di nuovi vaccini. I risultati di queste ricerche verranno trasferiti alla comunità scientifica nazionale e internazionale attraverso seminari, congressi e pubblicazioni su riviste scientifiche *peer-reviewed*.

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" ci si propone di attuare uno studio preclinico che confermi la validità dell'approccio.

Risultati attesi nel triennio

L'espressione intracellulare di anticorpi selezionati contro antigeni associati a tumore come la E6 e la E7, e caratterizzati *in vitro* per la loro attività antiproliferativa, è una metodica vantaggiosa rispetto ad altre (siRNA). Gli anticorpi saranno utilizzati sia direttamente, in forma purificata, che tramite un sistema retrovirale. Le sequenze codificanti per gli anticorpi che si intendono saggiare, comprensive dei segnali per la localizzazione in diversi compartimenti cellulari, saranno clonate in vettori retrovirali. I retrovirus ricombinanti saranno prodotti e usati per infettare colture di cellule TC-1 (murine, esprimenti stabilmente 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 la crescita di tumore e di metastasi nel modello murino. I diversi anticorpi anti-E6 ed anti-E7 potranno essere saggiati in associazione tra loro e in diverse combinazioni allo scopo di individuare la più efficace. Il modello animale che ci si propone di utilizzare è basato su topi C57 Black/6.

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 si applicano ovviamente a questa popolazione. 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: messa a punto di modelli animali di sensibilizzazione allergica e individuazione di nuove componenti ad azione immunomodulante associate ai pollini

I pollini rappresentano la fonte prevalente di allergeni aerodispersi per quantità, varietà e diffusione, ed è anche per questo probabilmente che le pollinosi sono tra le più frequenti malattie allergiche.

La diagnosi e il trattamento delle malattie allergiche respiratorie prevedono rispettivamente esami *in vivo* e *in vitro* e trattamenti di immunoterapia specifica che utilizzano estratti allergenici da pollini.

Tali estratti consistono in miscele complesse di diverse componenti molecolari, alcune allergeniche in senso proprio, altre per le quali sono state individuate proprietà immunomodulanti che sembrano contribuire alla induzione della sensibilizzazione allergica e alla cronicizzazione dello stato infiammatorio a polarizzazione Th2, tipico delle patologie allergiche respiratorie.

Tali componenti potrebbero costituire da una parte l'oggetto di nuove analisi volte alla determinazione della sicurezza e/o appropriatezza ed efficacia degli estratti pollinici per uso diagnostico e terapeutico, e dall'altra costituire il bersaglio di nuovi interventi terapeutici.

Sostanze inquinanti, stress biotici o abiotici e modifiche genetiche mirate al potenziamento delle difese naturali delle piante, possono inoltre influenzare l'espressione delle componenti allergeniche dei pollini. Lo studio del potenziale allergenico dei pollini può essere quindi utile anche in studi di impatto ambientale e per la prevenzione del rischio allergico respiratorio.

Ci si propone quindi la messa a punto e caratterizzazione di modelli murini di sensibilizzazione allergica ad estratti pollinici per la valutazione del potenziale allergenico dei pollini. Ci si propone inoltre lo sviluppo di nuovi metodi *in vitro* per la caratterizzazione e l'analisi della attività biologica degli estratti pollinici volto particolarmente alle componenti non-allergeniche in senso proprio tra cui componenti carboidratiche.

Risultati attesi nel triennio

Disponibilità di un protocollo di immunizzazione e di sensibilizzazione allergica a livello dell'apparato respiratorio, di saggi per la valutazione della risposta umorale, cellulare e dello stato infiammatorio a livello polmonare, nel modello murino.

Individuazione di componenti associate ai pollini con probabile attività immunomodulante.

Trasferibilità dei risultati

Istituti pubblici di ricerca monitoraggio e controllo 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 GM (*genetically modified*) e/o geneticamente selezionate e da piante sottoposte a fattori stressogeni, e per studi di meccanismo.
- Disponibilità di anticorpi IgE policlonali allergene-specifici, da utilizzare come "reagenti" in saggi *in vitro* per la valutazione dell'attività biologica di estratti e/o

molecole allergeniche nell'ambito di studi di standardizzazione, di meccanismo e, di valutazione del potenziale allergenico di ipoallergeni.

- Miglioramento della caratterizzazione degli estratti allergenici con particolare riferimento alle componenti non-allergeniche ad attività immunomodulante.

Valutazione della capacità biofilmogena di microrganismi di rilevanza clinica: ruolo nella patogenesi e impatto sulla terapia

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. Questo è stato suggerito e/o dimostrato per numerosi patogeni (cioè *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *S. aureus*) e ipotizzato per molti altri microrganismi. Obiettivo di questo studio è quello di valutare la capacità biofilmogena di ceppi batterici di rilevanza clinica (es. *S. pneumoniae*, *S. suis*, C-MRSA, ecc.), identificandone il ruolo nella patogenesi e l'impatto sulla terapia antibiotica. Il progetto si propone, inoltre, di valutare l'azione di molecole, con provata od ipotizzata attività inibente la produzione di biofilm, nel trattamento di queste infezioni come alternativa, o in associazione, alla terapia antibiotica.

Risultati attesi nel triennio

I dati ottenuti consentiranno di ampliare le conoscenze nel campo dei fattori di virulenza di microrganismi importanti in ambito clinico, con particolare riferimento alla formazione di biofilm e alle condizioni di sviluppo e regolazione dello stesso. Questa caratteristica verrà messa in relazione con altre caratteristiche dei microrganismi analizzati (tipo clonale, sierotipo, antibiotico-resistenza, ecc.). Saranno inoltre valutate strategie di controllo delle infezioni da microrganismi biofilmogeni alternative alla terapia antibiotica.

Trasferibilità dei risultati

I risultati prodotti saranno trasferiti alla comunità scientifica tramite pubblicazioni e, ove possibile, mediante saranno fornite linee guida con indicazioni per il trattamento delle infezioni da microrganismi biofilmogeni.

Valutazione della contaminazione da Legionella nei manufatti sotterranei Telecom e analisi del rischio di esposizione per i lavoratori Telecom Italia che svolgono attività di manutenzione/installazione di impianti di telecomunicazione in tali strutture

Nell'ottobre del 2002 un caso di legionellosi ad esito fatale si è verificato in un operaio che aveva effettuato lavori in una cameretta per telefonia situata nel territorio della regione Piemonte. Indagini ambientali su tali strutture hanno confermato la presenza di *Legionella pneumophila* sierogruppi 1,8 e 14, *Legionella gormanii* e altre *Legionella spp* in concentrazioni variabili tra 9×10^3 e $9,4 \times 10^5$ CFU/L.

L'assenza di dati in letteratura in merito al rischio di esposizione a Legionella nei manufatti sotterranei ci ha indotto ad effettuare uno studio *ad hoc* su tali strutture per conoscerne la reale contaminazione da parte di questo microrganismo e il titolo anticorpale anti-Legionella dei lavoratori che svolgono la loro attività in queste strutture. Questo studio, in parte già espletato nel territorio della regione Piemonte, ha previsto il campionamento e l'analisi di campioni d'acqua, aria, biofilm e sedimenti, in un certo numero di manufatti sotterranei Telecom.

Allo stesso tempo al fine di conoscere il livello di esposizione nei confronti di Legionella in un campione rappresentativo del personale che svolge la propria attività lavorativa nei manufatti

sotterranei, è stato determinato, a cura del nostro Dipartimento, il titolo degli anticorpi anti-Legionella, rispetto ad un equivalente gruppo di popolazione preso come controllo.

I risultati ottenuti hanno evidenziato una contaminazione di tali strutture nelle varie matrici esaminate, ma con maggior frequenza nella matrice acquosa (28%). Per quanto riguarda l'esposizione al rischio Legionella da parte di lavoratori, l'analisi statistica univariata ha evidenziato un possibile fattore di rischio per gli operatori che effettuano l'attività lavorativa in tali strutture. Tuttavia, l'analisi statistica multivariata, ha dimostrato che altri fattori concorrono alla determinazione del titolo anticorpale e quindi all'esposizione di Legionella. Questi fattori sono l'età del soggetto e la pratica di sport acquatici (piscine, ecc.).

Risultati attesi nel triennio

Al fine di dare un maggiore significato ai dati ottenuti in precedenza, si vuole analizzare un campione più ampio, sia di camerette che di personale addetto rispetto ad una popolazione di controllo. Altre camerette verranno pertanto campionate nella regione Lazio, e altri lavoratori verranno esaminati per determinare il livello di esposizione nei confronti di Legionella.

Trasferibilità dei risultati

Diffusione delle informazioni ottenute e modalità di prevenzione del rischio di acquisizione della Malattia del Legionario sia ai datori di lavoro che ai lavoratori che operano in tali specifiche strutture o strutture simili.

Valutazione della prevalenza della circolazione di virus influenzali aviari e suini in allevatori e in animali

I virus influenzali di tipo A sono in grado di infettare numerose specie animali, oltre l'uomo, come le specie aviarie e suine. Il rischio principale, che fa temere l'avvento di una nuova pandemia, è la coinfezione in uno stesso ospite, da parte di virus influenzali aviari e umani, evento che consentirebbe il riassortimento genetico, notoriamente coinvolto nelle passate pandemie. La specie suina può svolgere il ruolo di "contenitore" per il riassortimento genetico, poiché tali animali spresentano nel tratto respiratorio cellule dotate di recettori specifici sia per i virus umani che aviari. I lavoratori professionalmente a contatto con suini sono esposti al contagio da parte di virus suini e rappresentano, per tale motivo, una importante popolazione sentinella per valutare l'emergenza di nuovi virus a potenziale pandemico. Lo studio si propone di analizzare la presenza di anticorpi specifici verso virus suini in categorie diverse di lavoratori del comparto suinicolo. La ricerca di anticorpi specifici nei sieri umani sarà eseguita mediante il test di inibizione dell'emoagglutinazione (HI), utilizzando come antigeni virus precedentemente isolati dal suino e tipizzati. Saranno anche utilizzate ulteriori analisi sierologiche in via di standardizzazione.

Risultati attesi nel triennio

A seguito delle indagini epidemiologiche e virologiche che saranno condotte nell'ambito del progetto e che sono già in parte in via di espletamento verranno identificati gli allevamenti suinicoli periodicamente e ripetutamente interessati da circolazione di virus influenzali appartenenti in particolare ai sottotipi H1N1, H3N2 e H1N2. Questo permetterà una mappatura degli allevamenti da monitorare sul territorio, ponendo particolare attenzione alle condizioni ambientali circostanti che possano essere considerate come fattori favorenti l'insorgenza di epizootie. Sarà inoltre valutato il livello di rischio infettivo associato al diverso grado di esposizione e quindi alle diverse categorie professionali. Sarà valutata la capacità di trasmissione all'uomo di virus influenzali animali ed il loro potenziale zoonotico.

Trasferibilità dei risultati

Le metodiche sviluppate e validate verranno trasferite ai laboratori della rete periferica, attraverso attività di training e formazione tecnico/laboratoristica degli operatori sanitari operanti sul territorio. Il raggiungimento degli obiettivi proposti contribuirà ad una migliore pianificazione degli interventi preventivi, sia in ambito veterinario che di sanità pubblica.

Valutazione dell'analisi di tamponi congiuntivali per la diagnosi precoce dei contatti *Leishmania/cane* in condizioni di campo, e correlazione con i parametri entomologici della popolazione locale di flebotomi.

La leishmaniosi è l'infezione protozoaria più diffusa nel cane in Italia. La diagnosi precoce dei contatti *Leishmania/cane* è necessaria per valutare l'efficacia di misure di controllo quali biocidi topici o vaccini. Attualmente la valutazione viene condotta monitorando i cani trattati mediante pratiche tradizionali invasive (aspirati midollari e linfonodali), con un follow-up può richiedere 6-12 mesi a causa dei lunghi periodi di pre-patenza. Recentemente abbiamo dimostrato che l'analisi di materiale da un tampone congiuntivale rivela la presenza di *Leishmania* in diverse forme cliniche d'infezione, inclusi soggetti asintomatici. Questo dato richiede una validazione su campioni longitudinali a partire da soggetti sani esposti all'infezione. Il progetto prevede di monitorare una popolazione canina selezionata ospitata in un canile sanitario, durante il periodo di attività dei flebotomi vettori, mediante l'effettuazione periodica di tamponi congiuntivali. La selezione sarà operata escludendo i soggetti sieropositivi e quelli sieronegativi ma con tampone positivo. I cani che mostreranno una conversione a tampone-positivo verranno monitorati nel tempo per stabilire se il riscontro sia associabile ad una infezione progressiva. Nello stesso canile verranno condotte catture di flebotomi con medesima periodicità del campionamento congiuntivale, per caratterizzare la popolazione vettoriale e rilevare infezioni da *Leishmania*.

Risultati attesi nel triennio

L'outcome del progetto sarà una accurata e rigorosa valutazione dell'efficacia diagnostica precoce dell'infezione da *Leishmania* nel cane, ottenuta mediante un metodo non invasivo e di semplice attuazione.

Il materiale esfoliativo congiuntivale potrebbe rappresentare un sito preferenziale e precoce dell'infezione, dal momento che la puntura dei flebotomi avviene, nel cane, preferenzialmente nell'area perioculare in quanto priva di pelo folto.

Trasferibilità dei risultati

La ricerca e la valutazione di metodi innovativi per la diagnosi di leishmaniosi del cane, serbatoio della leishmaniosi viscerale umana, costituiscono una priorità per il controllo della malattia in aree endemiche italiane. Qualora risultasse efficace, il metodo proposto andrebbe ad integrare le misure attualmente impiegate per il controllo della zoonosi nel territorio.

Valutazione delle proprietà immunomodulanti di peptidi derivati dal grano duro nelle malattie autoimmuni

In studi recenti, è stata evidenziata la capacità di un decapeptide derivato dal grano duro (p10mer, QQPQDAVQPF) di prevenire l'attivazione da gliadina di linfociti T isolati da pazienti con malattia celiaca. In particolare è stata osservata la capacità del peptide di ridurre la produzione di IFN-gamma e aumentare quella di IL-10. Lo sviluppo di autoimmunità è legata ad un'alterata comunicazione fra immunità innata e adattativa e negli ultimi anni è stato attribuito alle cellule dell'immunità innata un ruolo rilevante nella patogenesi delle malattie autoimmuni. L'effetto del decapeptide sulla risposta alla gliadina potrebbe essere mediato anche da un'azione del peptide sulle cellule presentanti l'antigene con conseguente effetto immunomodulatorio più generale e indipendente dalla gliadina. In quest'ottica il presente

progetto valuta le capacità immunomodulanti del peptide p10mer e di altri due peptidi derivati dal grano duro (GTRVAPGQQ e ASVGVAPGQQ) in modelli sperimentali *in vitro* e *in vivo* di malattie autoimmuni. Saranno presi in esame l'effetto dei peptidi in studio su colture *in vitro* di linfociti estratti da biopsie intestinali di pazienti con malattia celiaca, su modelli sperimentali di colite acuta e cronica indotti dalla somministrazione di DSS o TNBS, sul modello murino di diabete indotto dalla somministrazione cronica a basse dosi di streptozotocina e sul modello di artrite reumatoide. Parallelamente, verrà sviluppato un programma di studio con la finalità di ottenere la selezione di varietà di frumento duro contenenti i peptidi protettivi e/o la sovra-espressione del gene codificante per la gliadina contenente i peptidi protettivi in piante di orzo e frumento duro. Lo studio prevede il contributo di diverse unità operative di seguito elencate con il dettaglio dei singoli obiettivi:

- Malattia celiaca (Reparto di Alimentazione, nutrizione e salute; Istituto Sperimentale per la Cerealcoltura, Roma)
 - Valutazione dell'attività antagonista nei confronti dei peptidi della gliadina del peptide 10mer, sia nella forma di sintesi artificiale che nelle forme naturalmente presenti in natura (cereali e legumi) su: modelli cellulari *in vitro* (K562 e cellule epiteliali intestinali Caco-2) e su modelli *ex vivo* (linfociti periferici e mucosali) provenienti da soggetti celiaci.
 - Individuazione del *pathway* della risposta immune con il quale il peptide 10mer interferisce.
 - Identificazione di ulteriori sequenze protettive naturalmente presenti in altre classi di proteine vegetali e relativi test sulla loro attività.
- Malattie infiammatorie croniche dell'intestino, diabete autoimmune e artrite reumatoide. (Reparto Malattie immuno-mediate; Reparto Metabolismo ed endocrinologia molecolare e cellulare, Dipartimento BCN; Reparto di Microbiologia, Dipartimento di Medicina sperimentale e scienze biochimiche, Università di Perugia).
 - Valutazione della capacità del peptide p10mer di modulare altre malattie autoimmuni, quali le malattie infiammatorie croniche dell'intestino, il diabete autoimmune e l'artrite reumatoide.

La scelta di queste malattie permetterà la valutazione dell'effetto sia locale (intestinale) che sistemico (artrite reumatoide e diabete) della somministrazione del peptide. Lo studio verrà effettuato su modelli preclinici di malattia, in particolare:

 - Modelli murini di colite sperimentale sia acuta che cronica indotta con DSS o TNBS
 - I fase: valutazione dell'effetto del peptide, somministrato *per os* a diverse concentrazioni e a diversi tempi rispetto alla induzione di colite, sulla prevenzione della colite e/o la terapia di colite consolidata.
 - II fase: caratterizzazione delle cellule coinvolte mediante studi *in vitro* e studi *in vivo* di trasferimento adottivo delle diverse popolazioni cellulari.
 - Modello di diabete sperimentale da somministrazione ripetuta di basse dosi di streptozotocina
 - Modello di artrite sperimentale:
 - esperimenti *in vivo* su modelli preclinici di artrite sperimentale (fase 1)
 - esperimenti *in vitro* sulle componenti cellulari effettrici della risposta innata (fase 2).
- Studi sui cereali (Centro di Ricerca per la Cerealcoltura, Foggia).
 - Isolamento e clonaggio del genecodificante per la gliadina contenente il/i peptide/i protettivo/i.

- Programma di breeding per la selezione di varietà di frumento duro contenenti i peptidi protettivi.
- Trasformazione genica mediante *Agrobacterium* per la sovra-espressione dei geni codificanti per la gliadina contenente il peptide protettivo in piante di orzo e frumento duro.

Risultati attesi nel triennio

Definizione dell'attività antagonista nei confronti dei peptidi della gliadina dei peptidi in studio con caratterizzazione delle popolazioni cellulari coinvolte.

Definizione della capacità della somministrazione orale/parenterale del peptide di migliorare la colite sperimentale, il diabete autoimmune e l'artrite sperimentale e definizione della finestra temporale di intervento.

Disponibilità di piante di cereali con iperespressione de peptidi protettivi.

Trasferibilità dei risultati

Possibile impiego del peptide nei pazienti con malattie autoimmuni.

Valutazione di strutture superficiali (*pili*) di *Streptococcus agalactiae* quali possibili candidati per lo sviluppo di un vaccino

S. agalactiae (streptococco di gruppo B, GBS) può colonizzare le vie genitali e l'ultima parte del tratto gastro-enterico delle donne. Trasmesso al neonato al momento del parto, GBS si è rivelato negli ultimi anni come uno più importanti agenti di infezioni neonatali, in particolare di infezioni respiratorie, sepsi e meningiti, secondo in frequenza solo a *Escherichia coli*. La profilassi antibiotica al momento del parto può contribuire a prevenire lo sviluppo della malattia precoce (entro tre gg dal parto) ma non ha effetto su quella a sviluppo tardivo (fino a tre mesi) che presenta un'elevata mortalità e, anche in presenza di guarigione, può dar luogo a gravi reliquati neurologici. Alcune strutture superficiali di GBS (*pili*) si sono recentemente dimostrate in grado di fornire immunità protettiva nel topo neonato dopo vaccinazione della madre; nell'ottica dello sviluppo di un vaccino da utilizzare nelle donne in gravidanza il presente progetto ha coinvolto otto Paesi europei allo scopo di valutare l'incidenza della malattia, i sierotipi circolanti e il pattern di pili espresso dai ceppi causa di malattia.

Risultati attesi nel triennio

- Implementazione delle conoscenze sull'incidenza della malattia da GBS in Italia e in Europa.
- Caratterizzazione dei ceppi causa di malattia e identificazione di possibile bersagli vaccinali.

Trasferibilità dei risultati

Le conoscenze acquisite con il presente progetto saranno trasferite alla comunità scientifica mediante pubblicazioni. Inoltre, i dati ottenuti forniranno la base per il design di un vaccino.

Valutazione *in vitro* di nuove molecole anti-ossidanti e di inibitori della istone deacetilasi (HDAC) per il trattamento dell'infezione da HCV

Lo stress ossidativo è importante nello sviluppo e nella progressione di molte patologie virali, inclusa quella epatica indotta dall'infezione cronica da HCV. Un ambiente cellulare ossidato può favorire l'infezione da HCV che spesso induce aumentata produzione delle specie di ossigeno reattivo (ROS) e ossidazione del *pool* cellulare di glutatione (GSH) con conseguente diminuzione del suo livello intracellulare. Lo stress ossidativo e l'induzione di ROS attivano anche l'enzima HDAC, che provoca espressione di epcidina e conseguente accumulo di ferro nel fegato, con richiamo di citochine infiammatorie responsabili del danno epatico indotto

dall'infezione cronica da HCV. Lo scopo del progetto si basa sull'ipotesi emergente di bersagliare componenti della cellula ospite essenziali per la replicazione virale, quali quelli *redox*-sensibili, e target epigenetici, quali HDAC, per ridurre il danno patogenetico dell'infezione ed evitare così la selezione di mutanti virali resistenti. Ci si propone: i) di ripristinare lo stato *redox* fisiologico di cellule infettate con HCV *in vitro*, trattandole con derivati idrofobici del GSH (GSH-C4) ad aumentata permeabilità; ii) di ridurre la risposta infiammatoria e regolare l'acetilazione di proteine cellulari coinvolte nella replicazione virale trattando le colture infettate con analoghi pirrolici degli inibitori delle HDAC di classe II, espresse in un ristretto numero di tipi cellulari, fra cui gli epatociti; iii) studiare i meccanismi coinvolti.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto descritto fornirà utili informazioni sull'effetto del GSH-C4 e degli inibitori di HDAC di classe II sulla replicazione del virus HCV *in vitro*. Ci si attende che il ripristino dello stato *redox* della cellula attraverso il riequilibrio del livello di GSH endocellulare induca una ridotta efficienza della replicazione/infezione virale. Inoltre sarà valutato l'effetto del trattamento con GSH-C4 e con gli inibitori di HDAC su target virali, quali ad esempio il *pattern* di glicosilazione delle glicoproteine dell'*envelope* di HCV.

Trasferibilità dei risultati

I risultati dello studio saranno pubblicati su riviste internazionali sottoposte a *peer-review*.

I risultati sull'effetto del trattamento con GSH-C4 in colture cellulari infettate con HCV costituirà il punto di partenza per valutarne l'utilizzo nel trattamento dell'infezione da HCV, da solo o in associazione alla terapia convenzionale.

Analogamente, i risultati ottenuti con il trattamento con inibitori selettivi di HDAC di tipo II, serviranno alla valutazione per un potenziale approccio terapeutico. In entrambi i casi di trattamento i risultati dell'indagine sui meccanismi coinvolti darà un contributo all'identificazione di target molecolari di patogenesi.

VI Progetto integrato dell'Unione Europea. Programme for research, technological development and demonstration. Sub-Priority: Global changes and Ecosystems, EDEN (Emerging Diseases European Network). Progetto quinquennale EDEN MALARIA

EDEN (*Emerging Diseases in a changing European environment*) è un progetto integrato pluriennale della comunità europea, composto da sei sottoprogetti, che si prefigge di identificare le condizioni eco-ambientali che, in Europa, possono influenzare la distribuzione spazio-temporale di alcuni tra i potenziali vettori di agenti patogeni umani. EDEN vede coinvolti 24 Paesi europei e 47 istituti di ricerca con esperienza e caratteristiche tali da permettere il raggiungimento degli obiettivi del progetto.

Il sottoprogetto EDEN/Malaria si propone di valutare il rischio di reintroduzione della malaria in 13 Paesi dell'area mediterranea attraverso lo studio dell'ecologia e biologia delle zanzare vettrici del genere *Anopheles* e di tutti i fattori naturali e/o antropici associabili all'evento.

L'Istituto partecipa al progetto come unico partner italiano, con il *team* di entomologia medica che fa capo al Reparto di Malattie trasmesse da vettori e sanità internazionale.

L'area di studio assegnata all'Italia è la Maremma, pianura costiera che si estende dall'alto Lazio alla bassa Toscana, dove la malaria, trasmessa da *Anopheles labranchiae*, è stata endemica fino alla metà del secolo scorso. Nell'area sono state individuate cinque stazioni di studio, corrispondenti ad altrettante aziende agricole a conduzione familiare. Due delle stazioni sono situate nei dintorni di Tarquinia (VT), limite meridionale dell'areale di distribuzione del

vettore, due nei pressi di Grosseto e una in provincia di Siena, limite nord dell'area. Le stazioni vengono visitate due volte al mese per tutto il periodo primavera-autunno, con raccolte di larve e adulti di anofelini con diverse modalità e tecniche. Lo studio entomologico sarà integrato con dati climatici, ambientali e socio-economici che potrebbero contribuire a determinare il rischio di reintroduzione della malaria in Italia.

Risultati attesi nel triennio

Definizione degli effetti che i cambiamenti ambientali e climatici previsti per il prossimo decennio potrebbero avere sulla reintroduzione e diffusione della malaria nei Paesi che affacciano sul mare Mediterraneo. Definizione del potenziale malariogenico dell'area di studio e di altri siti a rischio (infettabilità e vulnerabilità).

Presenza e abbondanza delle popolazioni di *Anopheles* nelle aree a rischio.

Infezione sperimentale del principale vettore indigeno *Anopheles labranchiae* (zanzara) con *Plasmodium falciparum* di origine afro-tropicale. Produzione di mappe di rischio.

Entomologia: identificazione delle specie presenti nelle aree di studio; dinamica stagionale calcolo della capacità vettoriale.

Identificazione di *marker* molecolari informativi per studi di popolazioni anofeliche.

Trasferibilità dei risultati

Definizione delle aree a rischio di introduzione del virus in Italia.

Trasferibilità all'SSN dei risultati prodotti.

Definizione delle aree a rischio di reintroduzione della malaria in Italia.

Linee guida per la diagnostica della malaria e per la gestione dei dati epidemiologici.

Virus influenzali ricombinanti nello studio di strategie innovative di immunizzazione

Antigeni HIV-1 veicolati mediante virus influenzali ricombinanti mostrano una elevata immunogenicità. Oltre ad essere un utile strumento di analisi della risposta immune in modelli animali e nello sviluppo di nuove strategie di immunizzazione, questi virus sono anche di interesse come immunogeni in relazione a possibili loro derivati come *virus like particle* o virusomi. Nell'ambito di studi finanziati dall'“Azione Concertata Italiana per lo sviluppo di un vaccino contro HIV/AIDS”, abbiamo definito le condizioni per una immunizzazione per via vaginale con virus influenzale nel topo e stabilito così alcune proprietà della risposta associata a questa mucosa quale sito induttivo e sul *cross-talk* esistente con la mucosa respiratoria. L'interesse a perseguire tali studi è ora diretto a stabilire:

- L'ampiezza e qualità della risposta immune specifica nei vari compartimenti mucosali dell'ospite in seguito ad immunizzazione con virus ricombinanti contenenti un polipeptido sintetico di HIV-1 o l'intera proteina Tat, somministrati sia come virus vivi attenuati o inattivati, sia come virusomi.
- Il *cross-talk* conseguente l'infezione della mucosa vaginale rispetto a tessuti linfoidi del tratto gastro-intestinale anche in condizioni di pre-immunità non-neutralizzante l'infettività del vettore.
- La costruzione di virus influenzali ricombinanti contenenti piccole proteine antigeniche derivate da altri patogeni, tra cui HPV, e la valutazione della loro immunogenicità.

Risultati attesi nel triennio

I virusomi costituiscono una tecnologia collaudata sia per l'immunogenicità che la sicurezza, e l'impiego di virus influenzali ricombinanti in grado di veicolare HA chimeriche con piccole proteine antigeniche offre un ulteriore interessante approccio di sviluppo per questi prodotti. Oltre ad antigeni HIV-1 verranno presi in considerazione antigeni di interesse per lo sviluppo di nuovi immunogeni per profilassi vaccinale verso le infezioni da HPV e altri patogeni endemici

in aree di sottosviluppo. Le speranze di successo riguardanti lo sviluppo e l'applicazione di questi immunogeni è legato ad una verifica delle capacità induttive di uno stato di immunità specifica e alla conoscenza del traffico e mantenimento di cellule della memoria immunitaria nei diversi siti mucosali del topo in seguito a specifiche modalità di immunizzazione. Ciò deve inoltre essere messo in relazione ad una pre-esistente immunità dell'ospite nei riguardi del virus influenzale. Nostri dati preliminari mostrano che in condizioni di pre-immunità l'infezione secondaria con virus ricombinanti consente ugualmente un priming e l'induzione di una risposta protettiva da challenge. Tali studi necessitano di ulteriori indagini riguardo i prodotti virosomali insieme ad un'analisi più approfondita su alcune proprietà degli antigeni da veicolare e un adeguato e significativo rilevamento dei correlati di protezione inducibili in siti mucosali distinti.

Trasferibilità dei risultati

Gli studi descritti si incentrano su tematiche riguardanti la comprensione delle diverse modalità di immunizzazione e dei meccanismi effettori associati in particolare a caratteristiche di qualità della risposta immune che possano maggiormente offrire garanzie di una immunità protettiva. L'esigenza di perseguire nuove ed efficaci strategie vaccinali riveste un grande interesse nella medicina preventiva, come pure in possibili applicazioni di immunoterapia riguardanti malattie infettive e non. La linea di studio proposta si focalizza inoltre su analisi concernenti le proprietà del virus influenzale quale vettore di antigeni estranei, o prodotti da essi derivati, che possono avere ricadute pratiche in termini di effettiva utilizzazione come vaccini e come strumento di studio dell'immunità in relazione alle differenti vie di somministrazione e capacità di *cross-talk* tra sito induttivo e siti di infezione.

Zoonosi e infezioni virali esotiche: fronteggiare le emergenze attraverso un approccio integrato tra medicina umana e veterinaria

L'insediamento e la diffusione della zanzara tigre in Italia e in altri Paesi europei, insieme all'aumento dei casi importati di arbovirus trasmessi in particolare da zanzare del genere *Aedes*, aumentano il rischio che queste malattie tropicali, già in espansione nel mondo, possano diventare stabili e diffondersi anche in Europa.

Aedes aegypti, il vettore principale di Dengue e di Febbre Gialla, non è stabilmente presente in Europa dalla fine degli anni '40, mentre *Ae. albopictus*, introdotta in Italia e in Albania all'inizio degli anni '90, si è poi diffusa in altri Paesi, soprattutto del bacino del Mediterraneo. Da prove di laboratorio questa specie è risultata competente per diversi arbovirus, alcuni dei quali sono in espansione geografica grazie all'aumento degli scambi internazionali. Ad avvalorare la tesi di un rischio reale per l'Europa, l'evento epidemico da Chikungunya occorso tra luglio e ottobre 2007 in Emilia-Romagna. Sin dalla sua introduzione nel nostro Paese, *Ae. albopictus* ha rappresentato la specie più molesta soprattutto per gli abitanti dei centri urbani, per le sue peculiari caratteristiche biologiche ed ecologiche. Con l'episodio di Chikungunya in provincia di Ravenna, in cui è stata comprovata la trasmissione ad opera di questa specie, la zanzara tigre è diventata responsabile della prima epidemia di un'arbovirus tropicale in Europa, trasformando il suo ruolo da semplice insetto molesto a pericoloso vettore. Recentemente (estate 2008) anche la zanzara comune *Culex pipiens* ha dimostrato le sue potenziali capacità come vettore di arbovirus: focolai di *West Nile Virus*, una zoonosi con ospite definitivo il cavallo ma trasmissibile anche all'uomo, si sono accesi in Emilia Romagna e in Veneto, con anche i primi due casi umani mai prima registrati in Italia.

Risultati attesi nel triennio

La nostra UO contribuirà al progetto valutando il rischio di introduzione di arbovirus esotici emergenti in Italia, in collaborazione con il Reparto arbovirus dello stesso Dipartimento MIPI.

Popolazioni italiane di zanzara tigre saranno inettate sperimentalmente con virus della Dengue e di Chikungunya, accertando, in particolare, l'eventuale trasmissione verticale dei virus dalle femmine infette alle seguenti generazioni. Sarà inoltre valutata sul campo l'idoneità e l'efficacia dei prodotti insetticidi, adulticidi e larvicidi, attualmente disponibili sul mercato, dopo la drastica riduzione di principi attivi disponibili operata dalla direttiva europea sui biocidi.

Trasferibilità dei risultati prodotti:

Saranno prodotti strumenti di supporto tecnico-scientifico per le strutture periferiche dell'SSN (manuali e linee guida) sulle metodiche e le strategie per affrontare la sorveglianza e i trattamenti, sia di routine che di emergenza, nei confronti di *Ae. albopictus* e *Cx. Pipiens*.

Zoonosi e infezioni virali esotiche: fronteggiare le emergenze attraverso un approccio integrato fra medicina umana e veterinaria

Il contributo di questa Unità Operativa riguarda i virus influenzali, notoriamente responsabili ancora oggi di una delle infezioni più diffuse su scala mondiale e tuttora associato al rischio di pandemia, soprattutto in relazione all'emergenza di virus aviari H5N1. In caso di pandemia, in attesa dello sviluppo di un efficace vaccino specifico in sufficienti quantità, la prima linea di difesa per l'uomo è rappresentata dall'uso di antivirali. Per tale motivo, diversi Paesi europei, inclusa l'Italia, hanno già provveduto a fare ampie scorte di Oseltamivir, uno dei farmaci antinfluenzali più recentemente immessi nel commercio, in grado di inibire la neuraminidasi virale. Tuttavia, la recente emergenza di resistenza proprio nei confronti dell'Oseltamivir, nei virus influenzali di sottotipo H1N1 circolanti nella popolazione, ha causato grande preoccupazione riguardo alla effettiva utilità di tali farmaci in caso di pandemia. Tutto ciò sottolinea l'importanza di un continuo monitoraggio, sia nei virus influenzali umani che animali, della suscettibilità virale agli inibitori della neuraminidasi (IN). Principale obiettivo di questo studio sarà pertanto quello di raccogliere dati e di ampliare le conoscenze sulla problematica della sensibilità/resistenza degli isolati di campo agli antivirali, aggiungendo dati relativi ai virus italiani.

Risultati attesi nel triennio

Le analisi sugli isolati clinici di virus influenzale, raccolti sul territorio nazionale, nell'ambito delle attività di sorveglianza che il nostro laboratorio svolge in qualità di Centro di riferimento WHO, permetteranno di monitorare sia il potenziale sviluppo del fenotipo di resistenza, sia ogni eventuale diminuzione della suscettibilità degli isolati virali agli IN. Il nostro principale contributo al progetto sarà quello di fornire tutti gli strumenti e l'esperienza necessaria ad eseguire studi di monitoraggio della farmacoresistenza nei virus influenzali sia umani che aviari. Il progetto sperimentale prevede di analizzare con il saggio enzimatico di inibizione dell'attività della neuraminidasi, un numero significativo di isolati clinici virali raccolti in diverse stagioni influenzali, più o meno recenti. Nello studio saranno inclusi virus umani di tipo A (sottotipo H1 e H3) e B e virus aviari di sottotipo N1, isolati in Italia da uccelli domestici e selvatici, insieme ad un certo numero di virus suini appartenenti allo stesso sottotipo.

Saranno, inoltre, effettuate analisi di caratterizzazione molecolare sui geni codificanti le proteine virali di superficie per ogni eventuale isolato virale resistente, al fine di rilevare potenziali nuove posizioni aminoacidiche correlabili con il fenotipo resistente/sensibile e, conseguentemente, per contribuire al chiarimento delle basi molecolari del diverso comportamento dei ceppi resistenti o sensibili.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti attraverso questo studio contribuiranno ad aumentare le conoscenze relative all'emergenza di varianti virali resistenti agli IN, al fine di definire la dimensione

epidemiologica di questo fenomeno e di contribuire in maniera significativa alla preparazione del nostro Paese ad una eventuale pandemia influenzale. Tutti i Piani pandemici elaborati in questi anni dalle diverse sanità pubbliche hanno inserito l'acquisto di un certo quantitativo di farmaci antinfluenzali, in particolare l'Oseltamivir. L'Italia dispone attualmente di circa 180.000 cicli di farmaci antivirali (oseltamivir e zanamivir) per la gestione di un primo focolaio epidemico. I risultati dello studio proposto permetteranno di valutare l'efficacia delle misure già adottate ed orientare le scelte future relativamente all'impiego dei suddetti antivirali, soprattutto in caso di pandemia influenzale. È importante sottolineare, inoltre, che questi studi vengono condotti per la prima volta in Italia.

Dipartimento
Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate

Attività di controllo, valutazione, parere

Attività del Laboratorio nazionale di riferimento-legionella

Nel 1983, il Ministero della Salute inserì la legionellosi tra le malattie a notifica obbligatoria (DM 07/02/1983) e venne istituito presso l'ISS il Registro nazionale dei casi di legionellosi. Da allora, il Reparto ha svolto un'attività molto intensa di diagnosi microbiologica di *Legionella* su campioni clinici e ambientali, con compiti di coordinamento e di riferimento diagnostico-microbiologico a livello nazionale ed europeo, e isolando per la prima volta in Italia la legionella.

Nel corso degli anni sono state prodotte pubblicazioni a livello nazionale e internazionale e in collaborazione con il Ministero della Salute sono stati anche elaborate linee guida a livello nazionale ed europeo.

Recentemente, con pubblicazione su Gazzetta Ufficiale n. 29 del 05/02/2005 è stata formalizzata l'istituzione presso l'ISS, nel Dipartimento di Malattie infettive parassitarie ed immunomediate, del Laboratorio nazionale di riferimento per le legionelle. Tra le attività del Laboratorio le più salienti sono:

- identificazione e tipizzazione di ceppi di legionella su base antigenica genomica;
- mantenimento di un Registro nazionale della legionellosi in cui sono registrate tutte le informazioni anagrafiche, cliniche, microbiologiche ed epidemiologiche di ogni singolo caso notificato;
- mantenimento di una ceppoteca con tutti i ceppi ricevuti dai Laboratori di riferimento regionali e confermati come *Legionella species*. I ceppi conservati a -80°C sono corredati di schede informative, raccolte in una banca dati;
- consulenza ed *expertise* tecnica, laddove richiesto, al Ministero della Salute e alle Regioni;
- attività di ricerca per migliorare le conoscenze e informazioni su aspetti patogenetici, clinici, diagnostici e ambientali della legionellosi;
- attività di formazione sulle metodiche di analisi di campioni ambientali e clinici per i dipendenti tecnici e laureati di pubbliche istituzioni (ARPA, ASL, Università);
- partecipazione in collaborazione con il Centro nazionale di Epidemiologia, sorveglianza e promozione della salute dell'ISS e con il Ministero della Salute, al programma di sorveglianza europeo dell'*European Working Group on Legionella Infections (EWGLI)*, coordinato da *Communicable Disease Surveillance Center* di Londra sulla sorveglianza epidemiologica internazionale della legionellosi associata ai viaggi;
- intervento in situazioni epidemiche particolari in supporto o in sostituzione dei Laboratori di riferimento regionali;
- partecipazione ad *External Quality Assessment Scheme* coordinati dall'*Health Protection Agency*;
- partecipazione a *proficiency test* coordinati dallo EWGLI su: *Sequence Based Typing (SBT)*, tipizzazione monoclinale, e *Sequence Based Identification (SBI)*.

Piano triennale

Nel triennio 2009-2011 continuerà l'attività di sorveglianza epidemiologica (effettuata in collaborazione con il Centro Nazionale di Epidemiologia) e microbiologica della legionellosi, prestando in particolare attenzione al verificarsi di *cluster* epidemici di legionellosi.

Il laboratorio nazionale di riferimento continuerà l'attività di analisi di campioni, sia di origine ambientale che umana provenienti su richiesta di istituzioni sanitarie periferiche, per la diagnosi o per conferma diagnostica di legionellosi.

Continuerà anche l'attività relativa alla tipizzazione dei ceppi soprattutto in relazione a *cluster* epidemici allo scopo di confrontare i ceppi isolati dall'ambiente e dall'uomo per risalire all'origine dell'infezione.

La tipizzazione di ceppi di Legionella collezionati nella nostra ceppoteca, provenienti da quasi tutto il territorio nazionale, è stata sottoposta ad una prima tipizzazione genomica di screening, dalla quale sono stati identificati circa 30 genotipi, di cui dieci più frequenti.

Questa analisi verrà ulteriormente sviluppata nei prossimi anni analizzando i genotipi riscontrati con metodi di tipizzazione più discriminanti. I genotipi provenienti da ceppi umani e i genotipi provenienti da ceppi isolati dall'uomo verranno confrontati per valutare se esiste correlazione tra di essi.

Nell'ambito della validazione di nuovi metodi diagnostici, è in programma uno studio comparativo tra metodo colturale e *Real Time* PCR, per la ricerca di Legionella in campioni d'acqua.

Per quanto riguarda l'attività di formazione, alla fine dell'anno corrente, considerata la grande richiesta, verrà riproposto lo stesso corso già tenuto nel 2008, "Legionella: valutazione del rischio, indagini ambientali, sistemi di controllo e aspetti normativi", rivolto ai medici, microbiologi e tecnici della prevenzione".

Parteciperemo inoltre, anche nei prossimi tre anni, come accade ormai da più di dieci anni, a quattro controlli di qualità/anno per la quantificazione e l'identificazione di Legionella in campioni d'acqua e quattro controlli di qualità/anno per la diagnosi di legionellosi mediante antigene urinario, (*External Quality Assessment Schemes*) coordinati dall'*Health Protection Agency* di Londra.

Nell'anno corrente è in corso anche un *proficiency test* per la tipizzazione di Legionella mediante analisi di sequenza di alcuni geni (*Sequence Based Typing*, SBT).

Durante il 2008 si è costituito il gruppo di lavoro per la revisione delle Linee guida per il controllo e la prevenzione della legionellosi. L'attività del gruppo continuerà nel 2009 auspicando la stesura del documento entro l'anno.

Continuerà inoltre l'attività di coordinamento dei Laboratori regionali di Riferimento per la diagnosi di Legionella su campioni ambientali. I laboratori che invece effettuano diagnosi su campioni biologici non sono presenti in tutte le Regioni (soltanto sei Regioni li hanno nominati). Nei prossimi anni verrà sollecitata tale presenza in ambito regionale per promuovere l'isolamento di Legionella da campioni clinici per poter risalire all'origine dell'infezione mediante il confronto con i ceppi ambientali e approntare misure di controllo al fine di ridurre il serbatoio di infezione.

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 tubercolosi (TB) farmacoresistente.

Le attività internazionali dell'SRL riguardano soprattutto il controllo di qualità dell'antibiogramma di *M. tuberculosis* (Mtb) in Albania, Kosovo, Bulgaria, Macedonia, Turchia, Oman, Qatar, Bahrain, Mozambico.

A livello nazionale l'SRL coordina una rete di 30 laboratori di micobatteriologia in 18 regioni presso i quali viene eseguito il controllo di qualità dell'antibiogramma di Mtb per i farmaci di prima linea e, si pensa dal 2009, di seconda linea (progetto CCM). Per la determinazione della resistenza ai farmaci antitubercolari di prima linea in Italia la stessa rete di laboratori invia annualmente all'SRL i risultati degli antibiogrammi che vengono analizzati e trasmessi al Ministero della Salute, per l'invio all'ECDC.

Su richiesta, viene eseguito l'antibiogramma per i farmaci antitubercolari di seconda linea per i ceppi MDR (*multiDrug-Resistant*) di Mtb e l'identificazione di ceppi di *Nocardia* mediante sequenziamento del gene rRNA 16S.

Piano triennale

Per il 2009-2011 si prevede di continuare le attività sopra descritte.

Attività di consulenza parassitologica per il Servizio Sanitario Nazionale

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 e immunologiche e di biologia molecolare.

Piano triennale

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 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 luglio 2006, il Reparto è accreditato secondo la norma EN ISO/IEC 17025:2005 (numero di accreditamento SINAL 0689). Dal primo luglio 2006, il Reparto è stato nominato Laboratorio Comunitario di Riferenza per i Parassiti (CRLP) per un periodo di cinque anni. Dal 13 novembre 2006, il Reparto è stato anche nominato dal Ministero della Salute quale Laboratorio Nazionale di Riferimento 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 (8).

Piano triennale

Nel triennio 2009-2011 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 Commissione Europea.

Attività di controllo e valutazione su streptococchi, enterococchi e corinebatteri

Il Reparto provvede a fornire su richiesta degli ospedali l'identificazione e la tipizzazione sierologica e molecolare di ceppi di streptococco beta emolitico e di pneumococco. 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'RNA ribosomiale 16S e analisi filogenetiche, oppure l'amplificazioni di regioni cromosomali specie-specifiche. In particolare, le attività di tipizzazione comprendono per *Streptococcus*

pyogenes, la determinazione del tipo di proteina M (emm typing) e geni per superantigeni; per *Streptococcus agalactiae* la determinazione del sierotipo e dei geni per fattori di virulenza., per *Streptococcus pneumoniae* la tipizzazione sierologica. Per questi microrganismi viene anche determinata la resistenza agli antibiotici con saggi fenotipici e genotipici per i geni di resistenza a eritromicina e clindamicinae tetraciclina.

Il Reparto provvede anche all'identificazione e a eventuali altre caratterizzazioni (es. presenza di particolari tossine o di geni di resistenza) di altri batteri Gram-positivi quali *Staphylococcus aureus*, enterococchi e corinebatteri. Inoltre provvede alla diagnosi mediante tecniche tradizionali e/o molecolari di infezioni da patogeni difficilmente coltivabili quali leptospire, clamidie, bartonelle, borrelie, rickettsie e l'agente eziologico del morbo di Whipple.

Piano triennale

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, quali quelle da *Corynebacterium diphtheriae*, nonché per la diagnosi di infezioni rare o da batteri difficilmente coltivabili. Tecniche molecolari saranno routinariamente affiancate alle tecniche tradizionali di sierotipizzazione per gli streptococchi, soprattutto per le specie più clinicamente rilevanti. La tipizzazione molecolare degli isolati sarà implementata utilizzando soprattutto tecniche *sequence based*.

Attività di parere e valutazione (Decreto Legislativo 24 aprile 2006, n. 219)

L'Unità Varicella svolge inoltre 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.

Piano triennale

L'attività di parere e valutazione proseguirà per tutto il triennio.

Centro di Riferimento nazionale per la sorveglianza meningiti batteriche

Mediante lettere circolari (n. 400.2/15/5709 del 29/12/1993 e n. 400.2/15/3290 del 27/07/1994) 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 di Malattie infettive, parassitarie ed immunomediate e dal Centro nazionale di Epidemiologia, sorveglianza e promozione della salute dell'ISS.

I principali obiettivi della sorveglianza microbiologica sono:

- Quantificare il contributo relativo dei tre principali batteri per i quali sono disponibili vaccini per l'infanzia (*Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, e *Streptococcus pneumoniae*).
- 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; conoscere il sierogruppo/sierotipo prevalente per una mirata profilassi vaccinale; analizzare il trend della sensibilità agli antibiotici per una corretta terapia e profilassi.
- Conoscere l'incidenza nazionale e per Regione per anno.

- Riconoscere la nuova introduzione nel Paese di sierogruppi/tipi non comunemente circolanti.
- Riconoscere il replacement di sierogruppo/tipo a seguito di pressione vaccinale.
- Confrontare le caratteristiche dei ceppi coinvolti in differenti *cluster* o *out break*.
- Inviare i dati italiani nel database europeo coordinato dall'ECDC di Stoccolma per decisioni condivise a livello comunitario

Piano triennale

Tutte le attività elencate verranno proseguite nel triennio e i rendiconti annuali inviati al Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, agli Assessorati delle Regioni e all'*European Centre for Disease Control*.

Centro Nazionale per le Leptosirosi umane

Allo scopo di rendere efficace e completa la sorveglianza della leptosirosi umana è stato intrapreso uno studio volto a valutare: i) se la batteria di ceppi attualmente utilizzata nella MAT è ancora adeguata alla situazione epidemiologica italiana; ii) la sensibilità e la specificità di kit ELISA reperibili in commercio. Risultati falsamente-negativi possono essere dovuti sia al mancato uso nella MAT di *serovar* “nuovi” per l’area geografica che all’uso di test ELISA che utilizzano antigeni non idonei a rilevare anticorpi verso tutti i *serovar* patogeni circolanti nel territorio. Risultati falsamente-positivi possono invece verificarsi nel corso di affezioni causate da batteri o virus che *cross*-reagiscono con le leptospire. Lo studio, iniziato con la valutazione del kit IgM ELISA messo a punto in Australia dalla PanBio, è continuato nel triennio 2006-2008 con la valutazione di altri due kit commerciali IVD (*Leptospira* IgM Microwell ELISA test; IVD Inc, Carlsbad, CA, USA) e SERION (*Classic Leptospira* IgM; Institut Virion-Serion GmbH, Wurzburg, Germania) che impiegano come antigene un ceppo di leptospire saprofite (Patoc 1). Mediante questi kit, sono stati esaminati 385 campioni di siero di 301 pazienti (ricoverati in strutture ospedaliere italiane) affetti da sospetta leptosirosi (già caratterizzati mediante MAT). Come controlli sono stati esaminati 60 donatori sani.

I risultati dello studio hanno dimostrato che entrambi i test presentano una buona sensibilità e un’eccellente specificità (IVD: sensibilità 85,7%, specificità 97,9%; SERION: sensibilità 87,3%, specificità 97,9%) ma non sono in grado (come altri kit commerciali e come riportato in letteratura) di rilevare tutte le infezioni causate dal *serovar* Bratislava. Questo *serovar* è di particolare importanza in Italia perché è responsabile di circa il 12% dei casi di leptosirosi identificati nel nostro Paese. I risultati hanno comunque dimostrato che i due kit ELISA rispetto alla MAT presentano vantaggi molto utili ai fini diagnostici: maggiore sensibilità nei campioni prelevati in fase precoce, capacità di discriminare tra infezioni recenti e pregresse, fattibilità a livello di qualsiasi laboratorio ospedaliero, risposte in tempi brevi, ecc. In conclusione, i risultati dello studio hanno dimostrato che sia il kit IgM ELISA IVD che quello della SERION sono un valido supporto alla sierodiagnosi della leptosirosi se tutti i risultati, sia positivi che negativi, sono confermati in un laboratorio di riferimento mediante la reazione di microagglutinazione (MAT) eseguita con una batteria di antigeni adeguata. I risultati inoltre dimostrano la necessità di validare a livello locale tutti i kit ELISA prima della loro immissione in commercio quali metodi di screening per la sierodiagnosi di leptosirosi. Purtroppo, la valutazione dei kit ELISA viene generalmente effettuata solo nel Paese di messa a punto; rare sono le indagini multicentriche.

Nell’ambito del Progetto TELECOM (Facicolo M56), allo scopo di identificare infezioni da *Leptospira* asintomatiche o non riconosciute in lavoratori a rischio, sono stati esaminati campioni di siero di 254 lavoratori Telecom Italia che svolgono attività di manutenzione/installazione di impianti di telecomunicazione in manufatti sotterranei. La ricerca

di anticorpi anti IgM e IgG è stata eseguita mediante un test ELISA “rapido” della IVD (Leptospira (IgM + IgG) Serum Antibody Detection Assay ELISA). I risultati dell’indagine hanno dimostrato che detto kit (contrariamente a quello prodotto dalla stessa Ditta valutato in precedenza) non è adeguato alla ricerca di anticorpi anti-Leptospira perché i sieri di controllo ISS positivi e negativi non hanno dato i risultati attesi.

Piano triennale

La leptospirosi è una zoonosi di grande rilevanza sia economica che sociale diffusa in tutto il mondo, in particolare nei Paesi tropicali e sub-tropicali. La leptospirosi 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*, in collaborazione con i “Laboratori della Leptosirosi” operanti presso strutture universitarie, ospedaliere e di prevenzione in Ancona, Bari, Messina, Palermo, Parma, Pavia, Roma, Torino, Trieste e Verona, che fungono da Laboratori di riferimento regionali. Il sistema di sorveglianza prevede: i) la conferma sierologica dei casi di sospetta leptospirosi segnalati dalle unità ospedaliere, mediante il metodo di referenza (microagglutinazione-MAT con leptospire vive); ii) la raccolta e la caratterizzazione molecolare ad antigenica dei ceppi isolati dai pazienti al fine di identificare i *serovar* circolanti sul territorio nazionale; iii) indagini epidemiologiche nel campo delle infezioni umane o animali da *Leptospira* mirate. Allo scopo di rendere efficace e completa la sorveglianza è indispensabile da parte del Centro nazionale per le Leptosirosi:

- raccogliere ed elaborare su base nazionale i dati clinici sierologici ed epidemiologici relativi ai casi di leptospirosi umana;
- identificare a livello di sierogruppo e *serovar* i ceppi di *Leptospira* isolati da casi clinici, da animali, e da acque superficiali o altri campioni ambientali, provenienti dai diversi “Laboratori della Leptosirosi” o da altri enti;
- caratterizzare a livello della struttura molecolare sia i ceppi di leptospire di origine italiana che i ceppi tipo necessari per la loro identificazione;
- confermare in laboratorio i casi di sospetta leptospirosi segnalati da unità ospedaliere di Regioni italiane prive di un Laboratorio della Leptosirosi;
- verificare se la batteria di ceppi utilizzata nella MAT in Italia per la sierodiagnosi della leptospirosi è ancora adeguata o se c’è stata una eventuale introduzione di ceppi “nuovi” per il territorio;
- valutare la sensibilità e la specificità di tecniche diagnostiche commerciali al fine di identificare quelle più idonee al territorio;
- promuovere il controllo di qualità dei Laboratori della Leptosirosi che collaborano con l’ISS alla sorveglianza della Leptosirosi umana;
- mantenere i contatti con gli analoghi centri operanti negli altri Paesi e partecipare al sistema di sorveglianza a livello europeo ed extraeuropeo.

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 è iniziata nel 1995 con la tipizzazione sierologica prima e quella molecolare dopo, e, 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). A tali programmi hanno aderito anche quattro laboratori stranieri, Zagabria, Vienna, Bucarest e la città serba di Novi Sad. 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, Università Sapienza di Roma, che fornisce le sacche di sangue di donatori, necessarie per i diversi tipi di controlli. 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 Aziende Ospedaliere, 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 dalla 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. In aggiunta, la partecipazione al controllo di qualità è condizione necessaria per la richiesta di accreditamento internazionale da parte dei laboratori. Solo i laboratori accreditati possono svolgere le loro attività nell'ambito dei trapianti di organo e di cellule staminali ematopoietiche, secondo le ultime disposizioni del CNT e del Registro nazionale per i trapianti di midollo osseo.

Piano triennale

Per il triennio 2009-2011 si prevede l'attività di controllo di qualità in immunogenetica come sopra descritto. Non si esclude l'inserimento di un nuovo schema di controllo di qualità sul microchimerismo, che per i primi due anni sarà eseguito unicamente a scopo sperimentale.

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.

Piano triennale

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 20 lotti infialati l'anno.

Controllo e certificazione dei dispositivi Medico-Diagnostici *in vitro* in base al DL.vo 8 settembre 2000 n. 332 e CTS 2002/364/EC del 7 maggio 2002

L'attività nel settore viene svolta, come servizio reso a pagamento (tariffe aggiornate: DM 30 aprile 2004 e 30 marzo 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 maggio 2002 e CTS 2009/108/EC del 3 febbraio 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 maggio 2002 e CTS 2009/108/EC del 3 febbraio 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:

- conformità ai requisiti essenziali previsti dalla normativa per la progettazione e per il processo di produzione;
- conformità del prodotto ai requisiti previsti dalla normativa tecnica;
- 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.

Piano triennale

Il programma prevede l'aggiornamento delle metodologie, finora eseguite sulla base delle regolamentazioni nazionali (DM 3 marzo 1987, DM 12 dicembre 1992, DM 6 ottobre 1998; CM 30 ottobre 2000 e DM 21 gennaio 2001), secondo i criteri della Direttiva 98/79/CE.

La Direttiva prevede l'intervento diretto dell'Organismo di Controllo per la certificazione dei dispositivi diagnostici inclusi nell'Allegato 2 (Elenco A ed Elenco B). Per tali prodotti è necessario l'accertamento della conformità del progetto e del processo di produzione ai requisiti essenziali; la conformità del prodotto ai requisiti previsti dalla normativa tecnica e la conformità del sistema di qualità anche ai fini della rintracciabilità.

In relazione a questo secondo punto è stata espletata la prima fase del programma dedicata alla preparazione della documentazione tecnica da inviare al Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali come previsto dalla Direttiva. Tale documentazione ha incluso, come previsto dagli Allegati IX e X della Direttiva:

- il documento di politica dell'Istituto per la certificazione dei dispositivi medico-diagnostici *in vitro*;
- Sistema di Gestione dell'Autorizzazione, con Manuale e Procedure;

- Fac-simile di Dichiarazione impegnativa del personale valutatore della conformità;
- Manuale di Qualità per la certificazione dei dispositivi medico-diagnostici *in vitro*;
- Planimetrie e Documento di Valutazione dei rischi (DL.vo 626/94).

In relazione alla documentazione presentata e all'attività finora svolta, il gruppo di lavoro MIPI-CdG/DMDV, *ad hoc* costituito, è stato oggetto di audit da ispettori del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali (17-18 luglio 2008).

Le attività, per il triennio 2009-2011, da parte del gruppo CdG/DMDV, 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; Decreto Legislativo 18 febbraio 1977, n. 44

In relazione all'attuazione del Decreto Legislativo 18 febbraio 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 del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali (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.

Piano triennale

È previsto il controllo annuale su un totale di circa nove lotti di vaccini virali prelevati dal commercio ad opera del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali (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 27/01/1992

Espressione del parere di competenza microbiologica, chemioterapeutica, immunologica e in particolare allergologica sulle autorizzazioni alla sperimentazione animale, inviate al Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali 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 immunomediate o allergiche effettuato mediante opportuni modelli animali.

Piano triennale

L'attività dipenderà esclusivamente dalle richieste del Servizio per la sperimentazione e il benessere degli animali dell'ISS.

Network europeo per la sorveglianza delle infezioni batteriche invasive

Il Dipartimento di MIPI rappresenta attraverso i suoi esperti nelle malattie invasive da meningococco ed emofilo il laboratorio di riferimento nazionale per l'*European Center for Disease Control* (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.

– Resoconto attività 2007-2008

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.

Piano triennale

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 del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali 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.

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 l'Unità Varicella del Reparto partecipa agli studi collaborativi di standardizzazione biologica (BSP), organizzati dall'EDQM per la definizione di Standard Internazionali. In particolare sta partecipando allo studio "*Biological standardisation programme: BSP085: Establishment of the Ph. Eur. BRP for Varicella vaccine Batch 1*", organizzato dall'EDQM, PA/PH/BIO (09) 6.

Piano triennale

Continuerà la partecipazione regolare agli studi di standardizzazione biologica organizzati annualmente dall'EDQM. Sono previsti nuovi studi di standardizzazione di metodiche molecolari per la valutazione dell'attività del virus vaccinale della varicella.

Programma di controllo annuale della composizione dei medicinali

L'AIFA, su proposta dell'ISS, sentita la CUF e il Consiglio Superiore di Sanità, 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 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.

Piano triennale

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
(Decreto Legislativo 18 febbraio 1977, n. 44)**

In relazione all'attuazione del Decreto Legislativo 18 febbraio 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 del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali (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.

Piano triennale

È previsto il controllo annuale su un totale di circa nove lotti di vaccini virali prelevati dal commercio ad opera del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali (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.

Programma nazionale di controllo di qualità per i saggi anti-HIV e dei marcatori dei virus epatitici presso i Laboratori diagnostici italiani

Il programma ha come obiettivo quello di mantenere sotto controllo la performance dei laboratori diagnostici nell'eseguire i saggi sia di tipo immunometrico che basati su amplificazione genica (PCR) per la diagnosi di HIV e dei virus epatitici (HBV e HCV). Tale programma rappresenta l'unico mezzo disponibile all'Autorità Nazionale per conoscere e monitorare la qualità dei servizi prestati a livello periferico. Inoltre il programma consente di valutare la performance dei kit diagnostici "sul campo" ivi inclusi i Laboratori dei servizi

trasfusionali dedicati allo screening delle sacche di sangue: nel passato ha per esempio messo in evidenza, per alcuni kit, la possibilità della presenza di variabilità tra lotti tale da incidere sulle loro prestazioni. Negli anni scorsi sono stati effettuati due esercizi per anno a cui hanno partecipato circa 300 laboratori diagnostici (controllo di qualità per rilevamento di HBsAg, anti-HCV, anti-HIV) e circa 90 laboratori dei servizi trasfusionali (controllo di qualità per rilevamento di HCV-RNA). Il programma prevede che i laboratori eseguano le analisi in condizioni di routine nel più breve tempo possibile e inviino i risultati, registrati su appositi moduli, entro 20 giorni, all'ISS che provvede alla loro elaborazione e a prestare la propria attività di consulenza ai laboratori partecipanti, che avessero problemi particolari emersi nel corso del programma. Al termine di ogni esercizio l'ISS prepara un rapporto comprendente: i) l'analisi dei risultati ottenuti dai singoli laboratori rispetto ai risultati ottenuti dal laboratorio di riferimento; ii) l'analisi dei risultati ottenuti per ciascun campione in tutti i laboratori rispondenti.

Piano triennale

Il programma prevede la partecipazione gratuita dei laboratori operanti sul territorio nazionale che aderiscono volontariamente (circa 300 laboratori diagnostici e 90 centri trasfusionali che eseguono metodiche NAT). Al fine di garantire la riservatezza dei risultati, ad ogni laboratorio partecipante è assegnato un codice identificativo numerico e univoco, noto solo all'ISS, attraverso il quale vengono intrattenuti tutti i rapporti.

Si prevede l'invio di pannelli di siero da utilizzare durante l'esecuzione routinaria dei saggi di rilevamento di HBsAg, anti-HCV, anti-HIV1/2, HCV-RNA, HBV-DNA, HIV-RNA (due invii per anno, 3-8 campioni di siero per ogni tipo di rilevamento).

Revisione d'analisi di infestazione entomologiche di alimenti e identificazione di contaminanti in preparati medicinali

L'igiene degli alimenti sta assumendo in questi ultimi tempi sempre più importanza, sia per le tecnologie attualmente disponibili che per le modalità di consumo in rapida evoluzione. La filiera alimentare (industria alimentare, ristorazione pubblica, laboratorio di produzione artigianale) deve garantire l'igienicità e la qualità dei prodotti che immette al consumo, in tutte le fasi di fabbricazione, trasformazione, preparazione, confezionamento, deposito, trasporto, distribuzione, manipolazione, vendita e somministrazione.

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. Nell'ambito dei compiti istituzionali, 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 alle Legge n. 283 del 30 aprile 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 entomologico 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 10/08/1994), sia con le più comuni tecniche di diagnosi macro e microscopica. In particolare, per la determinazione delle impurità entomologiche nei funghi, il metodo fa riferimento ad una procedura operativa standard in uso presso il Reparto.

Piano triennale

Le attività saranno continuate con le metodologie espone 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 del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, 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.

Piano triennale

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 divenuta in Italia una malattia infettiva a notifica obbligatoria a notifica speciale.

Dal 1982 a dicembre 2008 sono stati notificati 60.346 casi di AIDS. Di questi il 75,7% erano di sesso maschile, l'1,3% in età pediatrica o con un'infezione trasmessa da madre a figlio e 4.732 (7,8%) erano stranieri. In totale a dicembre 2008, 39.042 (64,7%) pazienti risultavano deceduti.

Nel 2008 sono stati notificati 1.238 nuovi casi di AIDS. L'età mediana alla diagnosi dei casi adulti, sia maschi, sia femmine, mostra un aumento nel tempo. L'andamento dei tassi d'incidenza per anno di diagnosi mostra un incremento dei casi fino al 1995, seguito da una rapida diminuzione fino al 1999 e negli anni successivi il numero dei casi diagnosticati subisce un rallentamento. Inoltre, si nota un aumento della proporzione dei casi attribuibili alla trasmissione sessuale e una diminuzione di quella delle altre modalità di trasmissione. Solo il 34,0% dei malati ha fatto uso di terapie antiretrovirali (Notiziario ISS 2009, suppl. 1 in via di pubblicazione).

La sorveglianza dell'AIDS è stata utile per guidare gli sforzi nazionali nel controllo dell'epidemia di AIDS/HIV e per attivare programmi di prevenzione e una corretta gestione dei servizi socio-sanitari. Negli ultimi anni la situazione, però, è radicalmente cambiata: i recenti successi dei trattamenti farmacologici dell'infezione da HIV hanno contribuito non poco a determinare la riduzione dell'incidenza di AIDS, minando la capacità della sorveglianza basata su tale obiettivo di rappresentare accuratamente l'andamento dell'infezione da HIV.

La possibilità, inoltre, di offrire agli individui infetti, ma ancora asintomatici, delle terapie efficaci nel ritardare l'evoluzione in AIDS e nel migliorare la qualità della vita, impone una maggiore attenzione sulle fasi iniziali dell'infezione piuttosto che soltanto sulla fase terminale della malattia.

Infine, 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 e 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 31/03/2008 (GU n. 175 del 28/07/2008), 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.

Già da vari anni alcune Regioni e Province si sono organizzate in modo autonomo e hanno raccolto informazioni sulle nuove diagnosi di infezione da HIV, inviandole periodicamente al Centro Operativo AIDS (COA).

Le Regioni che, ad oggi, hanno istituito un sistema di sorveglianza sono Lazio (dal 1985), Veneto (dal 1988), Friuli Venezia-Giulia (dal 1985), Piemonte (dal 1999), Liguria (dal 2001) e le province di Trento (dal 1985), Bolzano (dal 1985), Modena (dal 1985). Nel 2006 due nuove Province (Sassari e Rimini) hanno inviato dati sulle nuove diagnosi di infezione da HIV, raccogliendo oltre ai dati del 2005 anche i dati in modo retrospettivo (dal 1997 per quanto riguarda la provincia di Sassari e dal 2002 per la provincia di Rimini). Nel 2007, infine, il sistema di sorveglianza delle nuove diagnosi di infezione da HIV è stato istituito anche in Puglia e nella provincia di Catania.

In attesa di dati nazionali sui casi di infezione da HIV, i casi segnalati da queste Regioni e Province non rappresentano certamente tutti i casi di nuove infezioni da HIV, ma possono fornire un'utile indicazione sulla diffusione dell'HIV nel nostro Paese e su alcuni cambiamenti temporali dell'epidemia da HIV in Italia. Nel periodo 1985-2007 sono state riportate nelle 12 Regioni/Province 40.676 nuove diagnosi di infezione da HIV (28.760 maschi, 11.902 femmine, 14 casi non noti). Nel 2007 sono state segnalate 1.679 nuove diagnosi di infezioni.

L'incidenza totale di nuove diagnosi nel 2007 è stata del 6,0 per 100.000 residenti; l'incidenza più bassa è stata osservata in Puglia, mentre quella più alta nella provincia di Rimini.

L'incidenza delle nuove diagnosi ha visto un picco di segnalazioni nel 1987, per diminuire fino al 1998 e stabilizzarsi successivamente. Questo andamento è stato simile tra maschi e femmine. Tuttavia la proporzione di donne è aumentata progressivamente negli anni: il rapporto maschi/femmine che era di 3,5 nel 1985 è di 2,5 nel 2007.

Similmente a quanto precedentemente riportato tra i casi di AIDS, anche tra le nuove diagnosi di infezione da HIV si osserva un aumento dell'età mediana al momento della diagnosi di infezione (aumentata da 23 anni nel 1986 a 37 anni nel 2007), nonché un cambiamento analogo delle categorie di trasmissione: la quota di tossicodipendenti è diminuita dal 74,6% nel 1985 all'8,6% nel 2007, mentre i casi attribuibili a trasmissione sessuale (eterosessuale e omosessuale) nello stesso periodo sono aumentati dal 7,8% al 73,7%.

Piano triennale

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 l'ampliamento del Sistema di sorveglianza a tutte le Regioni italiane.

Sorveglianza e controllo delle infezioni da patogeni enterici

Presso il Dipartimento di 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 fenotiche 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 Tessa, il nuovo sistema europeo di sorveglianza delle malattie infettive, trasmessi al Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali e quindi all’Unità “*Foodborne and Waterborne Zoonotic Diseases*” dell’*European Center for Disease Control* 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.

Piano triennale

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 online 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 del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali 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)

Dopo il 2000, in seguito ad una inattesa riemergenza nei Paesi occidentali di alcune Infezioni Sessualmente Trasmesse (IST), il Centro Europeo per il Controllo delle Malattie (ECDC) ha emanato una serie di raccomandazioni per il miglioramento dei sistemi di sorveglianza e controllo di queste infezioni negli Stati comunitari.

In Italia, un Programma integrato di sorveglianza e controllo delle infezioni sessualmente trasmesse e dell’infezione da HIV è stato avviato nel 2006 (finanziato dal Centro per il Controllo delle Malattie (CCM) del Ministero della Salute) e ha consentito di sottoporre il Sistema di Sorveglianza Nazionale delle MST, già avviato nel 1991, ad alcune integrazioni metodologiche, migliorandone il flusso di dati, la puntualità e la copertura specialistica delle Reti di segnalazione delle nuove diagnosi.

Il Programma ha previsto anche l’integrazione delle attività di sorveglianza del vecchio Sistema con interventi più legati al controllo e alla prevenzione su larga scala. Gli obiettivi generali hanno riguardato soprattutto: i) il miglioramento della capacità del Sistema di descrivere gli andamenti annuali delle diverse IST; ii) la promozione sul territorio nazionale di condotte assistenziali standardizzate verso il paziente con sospetta IST; iii) lo sviluppo di interventi di informazione e prevenzione mirate alla popolazione generale anche tramite una linea telefonica dedicata.

Piano triennale

Differentemente da quanto avvenuto fino ad ora, durante il triennio 2009-2011 le attività di raccolta dati del Sistema di Sorveglianza MST si svolgeranno con l'ausilio di due Reti sentinella di segnalazione. La prima, alla quale parteciperanno 12 centri clinici ubicati in importanti strutture ospedaliere, provvederà, come già accaduto dal 1991, alla segnalazione delle nuove diagnosi IST; la seconda, di recente costituzione, alla quale parteciperanno 14 laboratori di Microbiologia ad elevato standard operativo, con il compito di migliorare le conoscenze sulla diffusione in Italia delle infezioni da *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* e da *T. vaginalis*. Quest'ultima Rete è stata costituita con la collaborazione dell'Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI) con la quale è stato redatto anche il Protocollo di Sorveglianza delle tre infezioni e condotto uno studio pilota per valutarne l'applicabilità nella pratica dei Laboratori. Durante il 2008, lo studio pilota ha consentito di raccogliere dati preliminari sulla prevalenza delle tre infezioni su oltre 6.000 campioni raccolti in tre mesi, confermando l'applicabilità del protocollo e l'avvio del nuovo Sistema sul territorio nazionale, a partire dal successivo anno solare.

L'attività parallela di segnalazione da parte delle due Reti sentinella consentirà nei prossimi tre anni di raccogliere dati più accurati sulla diffusione delle IST nel Paese. Nei centri saranno inoltre coordinati e promossi interventi efficaci di prevenzione primaria e secondaria dirette al paziente e alle popolazioni suscettibili a più alto rischio, anche mediante attività di screening da promuovere sull'intero territorio nazionale.

A partire dal 2009 sarà inoltre avviata la verifica del nuovo Sistema Elettronico di segnalazione delle nuove diagnosi sviluppato in collaborazione con il SIDBAE-ISS. Il Sistema prevede un collegamento internet dedicato che consente di mettere in rete telematica i 12 centri clinici per le IST con il coordinamento centrale presso l'ISS per svolgere le attività di segnalazione dei nuovi casi. Il collegamento sfrutta un portale attivato nel sito web dell'ISS al quale i centri periferici potranno accedere, dopo autenticazione, per utilizzare una scheda video dove inserire le caratteristiche demografiche, cliniche e comportamentali relative ai nuovi casi. Questa nuova procedura è stata studiata per ridurre il ritardo di notifica delle segnalazioni e consentirà di migliorare la puntualità e la sensibilità del Sistema verso le variazioni degli andamenti o il rilievo di eventuali focolai.

Il Sistema di segnalazione elettronica consentirà anche l'elaborazione automatica dei dati, sia in formato tabellare che grafico, e faciliterà nel triennio, la redazione periodica dei rapporti tecnici da distribuire alla periferia, nonché la sistematizzazione di articoli scientifici.

Nel triennio 2009-2011 verranno realizzati almeno tre rapporti tecnici a scadenza annuale, basati sulle attività di segnalazione previste dal Sistema e pubblicabili come numeri monografici del Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità. La redazione di eventuali articoli scientifici sarà pianificata per divulgare i dati più significativi che emergeranno dalla sistematizzazione delle segnalazioni raccolte.

Inoltre la partecipazione del Sistema di Sorveglianza italiano alla Sorveglianza europea delle infezioni sessualmente trasmesse (ESSTI) assicurerà la partecipazione alle attività e alle iniziative promosse a livello comunitario.

- Attività di promozione a gestione clinica standardizzata delle IST

Nel triennio 2009-2011 nei centri clinici partecipanti alla Rete di Sorveglianza continueranno le iniziative per la promozione di condotte assistenziali di comprovata efficacia sia mediante il miglioramento della formazione continua dei medici specialisti sia mediante la diffusione e applicazione di Linee Guida (LL.GG.) nazionali e di Protocolli terapeutici per le IST.

A partire dal 2009 in tutti i centri partecipanti alle due Reti di Sorveglianza saranno rese disponibili le Linee Guida (LL.GG.) sul trattamento delle infezioni sessualmente

trasmesse già messe a punto con la collaborazione della Società per lo Studio Multidisciplinare delle MST (SIMAST), della Società Italiana di Malattie Infettive e Tropicali (SIMIT), dell'*European Society of Infection Diseases in Obstetrics and Gynecology* (ESIDOG), e della Società Italiana di Dermatologia e delle Malattie Sessualmente Trasmesse (SIDEMAST). Scopo delle LL.GG. sarà quello di fornire un supporto *evidence based* di ausilio alla gestione del paziente con una sospetta IST a tutti i protagonisti delle attività di controllo e sorveglianza e agli altri operatori sanitari, compreso il medico di medicina generale. Le LL.GG. saranno distribuite anche alla comunità scientifica nazionale mediante la loro pubblicazione su riviste di letteratura grigia ad elevata tiratura.

Saranno inoltre organizzati due corsi di formazione presso l'ISS, indirizzati rispettivamente a medici di medicina generale su temi riguardanti la gestione del paziente con sospetta MST in ambiente extraspecialistico e a biologi e medici microbiologi, sulle innovazioni nella diagnostica delle infezioni sessuali.

– Attività di informazione ed educazione sanitaria

Nel triennio continueranno le attività di *counseling* telefonico sulle MST svolte dalla Unità Operativa “Telefono Verde AIDS” (UO TVA). L'UO in questi ultimi anni ha allargato la sua naturale attività di *counseling* sull'infezione da HIV a tutte le altre infezioni sessuali, promuovendo un messaggio di prevenzione basato sulle relazioni biologiche, epidemiologiche e sociali di queste due aree specialistiche. Gli obiettivi dell'attività di informazione ed educazione riguarderanno:

- fornire conoscenze aggiornate sulle moderne IST alla popolazione generale;
- fornire indicazioni per l'accesso alle strutture specialistiche nelle varie Regioni;
- favorire attraverso il colloquio telefonico il miglioramento della percezione del rischio personale per le IST;
- avviare negli individui a rischio un cambiamento dei comportamenti a rischio, da rinforzare con altri metodi di controllo ed educazione (*counseling* nelle strutture, screening mirati, ecc.).

La pressione informativa sarà garantita quotidianamente e rivolta anche a popolazioni di stranieri residenti in Italia, mediante la collaborazione di mediatori linguistico-culturali che risponderanno al telefono in sette lingue (inglese, francese, rumeno, spagnolo, arabo, cinese e russo).

Vaccini antinfluenzali: attività di controllo, valutazione e consulenza

– Attività di controllo dei lotti vaccinali

Nonostante l'istituzione del nuovo “Centro per la ricerca e la valutazione dei prodotti immunobiologici” – CRIVIB in cui confluiranno le competenze relative al *batch release* del vaccino antinfluenzale, nell'anno 2008 tali attività è stata svolta nell'ambito del MIPI e in particolare dal Reparto Malattie virali e vaccini inattivati.

Le procedure di *batch release* 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. Su campioni rappresentativi del lotto di vaccino da commercializzare vengono eseguiti saggi per la determinazione del contenuto antigenico (*potency test*) di ciascuno dei tre ceppi virali contenuti nel vaccino. A tal fine viene utilizzato il saggio di Immunodiffusione Singola Radiale (SRD), utilizzando antigeni e antisieri di referenza allestiti e forniti dai laboratori della WHO (*National Institute for biological Standards and Control* – NIBSC). Viene altresì eseguito un test per la

determinazione del contenuto endotossico (LAL test) e, nel caso di vaccini sub-virionici (“a subunità”) viene anche eseguito un saggio di purezza (*purity test*).

Controllo post-marketing: oltre al controllo preventivo, viene eseguito un controllo su lotti di vaccino già immessi sul mercato, secondo un programma annualmente concordato con il Ministero della Salute (AIFA). 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. È stata svolta un’attività di sensibilizzazione finalizzata ad aumentare le coperture vaccinali. La conseguente espansione delle capacità produttive delle Ditte vaccinogene in periodo interpandemico, permetterà di poter disporre, in caso di pandemia, di un numero notevolmente superiore di dosi di vaccino.

– Attività regolatorie e di parere

Tale attività ha riguardato tutte le problematiche relative alla profilassi vaccinale, all’aggiornamento del vaccino e ai suoi processi di produzione, alle caratteristiche dei ceppi circolanti in periodo epidemico, all’elaborazione del Piano Pandemico Nazionale. In particolare:

- Procedure di Registrazione nazionale e Variazioni di tipo II, Mutui Riconoscimenti Europei svolte sia come *Reference Member State* (RMS) che come *Concerned Member State* (CMS).
- Interrogazioni parlamentari.
- Elaborazione di Procedure previste dal Sistema di Assicurazione di Qualità (SAQ).

Piano triennale

A differenza delle attività di cui sopra al primo punto, le attività descritte nel secondo punto rimarranno di competenza del Reparto Malattie virali e vaccini inattivati, in base all’accordo MIPI/CRIVIB.

Conseguentemente continuerà in tutte le attività regolatorie e di elaborazione di pareri, relativi a tutte le problematiche che riguardano la patologia influenzale e la sua prevenzione attraverso la l’immunoprofilassi vaccinale, in particolare:

- formulazione di pareri, su richiesta del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, su tutte le problematiche relative alla qualità dei vaccini influenzali e al loro impiego;
- valutazione di dispositivi diagnostici per la diagnosi di laboratorio di virus influenzali umani circolanti in periodo epidemico, per l’identificazione delle varianti antigeniche emergenti, da includere nel vaccino di nuova formulazione.

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*) ai lavori del CEN – *Technical Committee 216/Disinfectants* che produce le Norme europee per la regolamentazione della dimostrazione di efficacia di questi prodotti.

Piano triennale

Proseguimento dell'attività di valutazione dei dossier per la registrazione a seconda delle richieste pervenute dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali. 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'EC/EFTA e dal CEN.

Dipartimento
Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare

Attività di ricerca

VII Programma quadro – Tema 2 “Food, Agriculture and Fisheries, and Biotechnology” Progetto BASELINE “Selection and improving of fit-for-purpose sampling procedures for specific foods and risks” Task 5.4
Necessità di nuovi metodi analitici e di campionamento

I metodi usualmente usati nei controlli degli alimenti necessitano di una valutazione per quanto riguarda la loro specificità, incertezza di misura e possibilità di fornire risultati falsi positivi o falsi negativi. Questi ultimi assumono particolare rilievo nel caso di rilevamento di patogeni emergenti per i quali le conoscenze sulle possibili interazioni tra matrice alimentare e agente patogeno sono limitate.

Si rende quindi necessaria la messa a punto di metodi che permettano la determinazione di bassi livelli di contaminanti che possono essere presenti nei primi stadi del processo produttivo e che possono costituire i presupposti per stabilire i PO lungo la filiera.

In particolare verranno presi in considerazione un metodo di *Real Time* PCR per la determinazione di HAV e norovirus nonché metodi molecolari per la ricerca di *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica*.

Per quanto concerne i contaminati chimici, verranno messi a punto metodi per il campionamento e la determinazione dei pesticidi nei prodotti vegetali utilizzando tecniche multi-residuo GC/MS e GS/MS/MS nonché un metodo quantitativo per la ricerca dell'acrilammide.

Risultati attesi nel triennio

Messa a punto e validazione di metodi chimici e microbiologici per la determinazione di bassi livelli di contaminanti nei prodotti alimentari.

Trasferibilità dei risultati

Protocollo di un metodo multi-residuo per i pesticidi.

Protocollo per la determinazione e quantificazione dell'acrilammide.

Protocollo di metodi molecolari per HAV, norovirus, *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes*.

Piani di campionamento per i prodotti vegetali.

VII Programma quadro – TEMA 2: “Food, Agriculture and Fisheries, and Biotechnology” Progetto: BASELINE “Selection and improving of fit-for-purpose sampling procedures for specific foods and risks”

Un alto livello di protezione della salute pubblica è uno dei fondamentali obiettivi della legislazione alimentare, come stabilito dal Regolamento CE 178:2002. Con l'aumento del commercio internazionale la salute di un sempre maggior numero di consumatori deve essere tutelata ed è quindi essenziale che ci sia una armonizzazione delle misure di controllo. Per raggiungere un alto grado di protezione, la legislazione alimentare deve essere basata sull'Analisi del Rischio, articolata in Valutazione del Rischio, Gestione del Rischio e Comunicazione del Rischio.

Ai fini della valutazione del rischio microbiologico connesso alla presenza di *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp*, verranno selezionati e ottimizzati piani di campionamento per i due patogeni in diverse categorie alimentari. In tale contesto verranno analizzati gli attuali piani di campionamento nei diversi Paesi europei e verranno selezionati gli specifici alimenti e le fasi produttive da studiare.

Verrà valutata la necessità di mettere a punto nuovi metodi per il campionamento e l'analisi degli alimenti.

Verrà condotta la validazione dei metodi di analisi alternativi (metodi molecolari) messi a punto, in base alla norma ISO 16140. Ciascuna categoria di alimenti sarà contaminata con quattro livelli di contaminazione e sei replicati. Le analisi saranno condotte usando i metodi ISO e i metodi molecolari.

I metodi molecolari validati verranno armonizzati in modo da essere adottati come standard internazionali (es. ISO).

Risultati attesi nel triennio

Revisione critica degli attuali piani di campionamento e dei metodi analitici attualmente previsti dai Regolamenti della Commissione Europea alla luce dei risultati ottenuti dal progetto ed eventuale applicazione di nuovi piani di campionamento e nuovi metodi analitici.

Trasferibilità dei risultati

Fornire strategie di campionamento armonizzate e validate, strutturate come standard internazionali (es. ISO) al fine di supportare la Comunità Europea nella sicurezza alimentare, al fine di raccogliere dati comparabili in grado di migliorare l'analisi del rischio per contaminanti chimici e biologici.

Acidi grassi e polifenoli della dieta nella patogenesi e prevenzione del carcinoma del colon. Effetti sui processi infiammatori associati ad obesità viscerale

Il rischio di sviluppare il cancro del colon (CC) aumenta in individui con obesità viscerale ed è influenzato da una dieta ricca in acidi grassi (FA) saturi. Il tessuto adiposo bianco (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 principale nella patogenesi del CC associato ad obesità viscerale. Le cause della disfunzione adipocitaria e gli eventi molecolari che legano obesità, insulino-resistenza, e CC, sono però ancora ignoti. Recentemente, alcuni componenti della dieta mediterranea, come i polifenoli contenuti negli alimenti vegetali, hanno mostrato effetti preventivi sull'insorgenza di malattie associate ad obesità, incluso il cancro, grazie alla loro capacità di modulare il metabolismo, la trasduzione del segnale, l'espressione genica e l'attivazione/inibizione di specifici *pathway* infiammatori/proliferativi. Restano però da definire i meccanismi con cui essi esplicano tali funzioni. Il progetto ha l'obiettivo principale di identificare gli eventi molecolari con i quali FA a diverso grado di saturazione alterano la funzionalità degli adipociti, attivando *pathway* infiammatori/proliferativi nei colonociti. Il progetto si prefigge poi di identificare effetti protettivi di specifici polifenoli sulla carcinogenesi indotta da infiammazione e i relativi meccanismi d'azione.

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/m²) o obesi (BMI 30-35 Kg/m²), circonferenza vita >95 cm (uomo) e > 80 cm (donna), sottoposti a chirurgia addominale per condizioni benigne o CC, ai quali verrà richiesto il loro consenso informato. Lo studio, approvato dal Comitato Etico di competenza, si avvarrà della pre-esistente collaborazione con chirurghi e oncologi dell'Università Sapienza e Università Cattolica. Il progetto sarà articolato in tre parti strettamente interconnesse, che si prefiggono di raggiungere risultati specifici. 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 insaturazione e ossidazione nella modulazione di funzioni adipocitarie connesse allo sviluppo di infiammazione. Infine, nella Fase 3 verrà saggiata la capacità protettiva di specifici

polifenoli nei confronti delle alterazioni adipocitarie responsabili della promozione di processi infiammatori tumorigenici.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto contribuirà alla comprensione della patogenesi del cancro del colon associato ad obesità viscerale offrendo il supporto necessario per lo sviluppo di nuove strategie di prevenzione.

A lungo termine, i risultati ottenuti avranno conseguenze importanti per lo sviluppo di nuove strategie nutrizionali volte alla riduzione dell'incidenza di carcinoma del colon, permettendo di traslare la ricerca di base in nuove prospettive cliniche.

Analisi della suscettibilità agli ultrasuoni di microrganismi patogeni alimentari e delle loro tossine

L'uso degli ultrasuoni (US) in tecnologia alimentare si sta sempre più diffondendo per processi quali estrazione di componenti da materie prime, accelerazione di processi fermentativi, omogeneizzazione, degassificazione, fino all'intenerimento delle carni o alla cristallizzazione degli zuccheri. Gli US a frequenze più basse (20-100 kHz) e intensità più elevate hanno la capacità peculiare di causare il fenomeno della cavitazione, che consiste nell'implosione di bolle gassose, conseguente alla creazione di zone alternate di compressione ed espansione nel mezzo sottoposto alla loro azione. È stato dimostrato che la cavitazione dovuta agli US può avere effetti battericidi: pertanto, gli US presentano un potenziale interesse come mezzo fisico per la conservazione degli alimenti freschi, in alternativa ai più tradizionali trattamenti termici e/o chimici che possono causare effetti indesiderabili sulla loro qualità nutrizionale e sensoriale. La ricerca in questo campo è agli inizi e sono pochi i dati esistenti in letteratura, in particolare relativi alla suscettibilità agli US dei vari patogeni e delle loro tossine in matrici alimentari diverse. Scopo del presente progetto sarà quindi quello di analizzare gli effetti degli US con caratteristiche di frequenze ed intensità variabili, da soli o in combinazione con altre tecnologie (alte pressioni e temperature, conservanti chimici), sui microrganismi patogeni alimentari e loro tossine inoculati sperimentalmente in alimenti di varia natura.

Risultati attesi nel triennio

Matrici alimentari diverse (specificamente, alimenti freschi deperibili sia liquidi che solidi) saranno contaminate con quantità variabili di microrganismi patogeni alimentari, in particolare sporigeni gram-positivi (generi *Clostridium* e *Bacillus*) che dimostrano una maggiore resistenza ai tradizionali trattamenti di conservazione, e/o con le tossine che tali microrganismi eventualmente producono. Gli alimenti così contaminati saranno sottoposti a diverse condizioni di US mediante l'uso di strumenti generatori disponibili in commercio: in seguito all'analisi della suscettibilità dei microrganismi e/o delle tossine ai trattamenti, verranno individuati i parametri di sonicazione che produrranno la loro completa inattivazione, senza causare effetti negativi sulle matrici alimentari. A questo scopo, verranno individuate anche le condizioni sub-ottimali di US combinati con valori di temperature e/o pressioni variabili (termo-sonicazione, mano-sonicazione, mano-termo-sonicazione), o eventualmente con conservanti chimici.

Trasferibilità dei risultati

Lo studio della suscettibilità agli US dei patogeni alimentari (in particolare, sporigeni gram-positivi) e delle loro tossine permetterà in primo luogo di analizzare più a fondo le loro caratteristiche fisiologiche e biochimiche. I risultati ottenuti potranno quindi trovare applicazione nello sviluppo di nuove tecnologie a US, anche in combinazione con altre tecnologie, per la conservazione di alimenti freschi deperibili. Tali nuove tecnologie potranno eventualmente meglio incontrare le esigenze del consumatore moderno che sempre più richiede

alimenti trattati al minimo, possibilmente simili agli alimenti freschi e che conservino un'alta qualità dal punto di vista sensoriale e nutrizionale.

Antagonismo di batteri patogeni mediante colture microbiche singole e/o associate

I batteri lattici sono routinariamente utilizzati nella preparazione e conservazione degli alimenti fermentati e la loro assunzione negli ultimi anni è stato ulteriormente rivalorizzato in funzione degli effetti benefici sulla salute che esercitano (benessere per l'uomo, riduzione del rischio di alcune malattie e prevenzione o controllo di patogeni ai fini della sicurezza d'uso degli alimenti). Sebbene tali proprietà siano specie-specifiche o più spesso ceppo-specifiche, per talune situazioni queste sono assicurate dai cosiddetti consorzi microbici; nel caso degli alimenti sono proprio i consorzi che assicurano ai prodotti tipici e tradizionali fermentati la sicurezza d'uso grazie ai molteplici *hurdles* che realizzano con il loro metabolismo ai patogeni. L'azione antagonizzante che molti microrganismi benefici esercitano deve evidentemente associarsi ad un ciclo moltiplicativo identico se non addirittura più rapido di quello dei principali agenti patogeni. Quando tali condizioni non sussistono potrebbe risultare di sicuro vantaggio il ricorso preventivo al prodotto metabolico della coltura microbica che potrebbe assommare le proprietà del microrganismo e assicurare alla stessa una condizione di vantaggio sulla coltura dannosa alla salute dei viventi o alla qualità dell'alimento. A tutt'oggi non sono disponibili modelli sperimentali riproducibili con cui valutare in maniera quantificabile l'efficacia di una coltura microbica o di un complesso microbico benefico nel contrasto di un agente patogeno intestinale o nell'inibizione/rallentamento della crescita dello stesso in un prodotto alimentare. Si studierà un nuovo modello sperimentale per valutare l'azione antagonista esercitata dai batteri benefici nei confronti di batteri patogeni quando assunti con l'alimentazione o addizionati ad un prodotto alimentare.

Risultati attesi nel triennio

Individuazione dei fattori in grado di assicurare il vantaggio moltiplicativo ad una coltura benefica nel caso dell'assunzione diretta da parte di un essere umano o nel caso di un suo inoculo in un prodotto alimentare.

Individuazione delle combinazioni microbiche ottimali e loro relative concentrazioni in grado di contrastare una serie di patogeni.

Trasferibilità dei risultati

I dati e le condizioni verranno messe a disposizione delle industrie alimentari comprese quelle che sono interessate alla produzione di alimenti probiotici.

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 con l'attuazione della 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 che caratterizzano serovar emergenti di particolare rilevanza per la sanità pubblica.

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.

Assunzione di elementi in traccia e loro specie chimiche attraverso la dieta e valutazione degli effetti sulla salute umana

Il contenuto totale di un elemento in una matrice alimentare è un dato spesso insufficiente per la valutazione dei possibili effetti biologici. La forma chimica dell'elemento (specie) influenza l'assorbimento gastrointestinale, il destino metabolico e i possibili effetti benefici (elementi essenziali) o avversi; riguardo a questi ultimi, la speciazione riveste un ruolo centrale nella valutazione del rischio, come evidenziato di recente dalla richiesta di dati sulla presenza delle specie dell'arsenico negli alimenti da parte dell'EFSA.

Il progetto prevede l'impiego delle tecniche analitiche più avanzate in questo settore, quali la spettrometria di massa con sorgente al plasma combinata online con la cromatografia liquida e diversi tipi di spettrometria di massa organica, per l'indagine dell'identità strutturale delle specie rivelate mediante tecniche combinate.

Gli studi di speciazione saranno integrati da studi volti alla caratterizzazione dell'assorbimento gastrointestinale degli elementi. La bioaccessibilità verrà valutata *in vitro*, mediante metodologie quali la solubilizzazione attraverso trattamento con enzimi simulanti la digestione gastrica/intestinale, seguita da misure di diffusione (dialisi per la simulazione del trasporto passivo). Informazioni circa l'*uptake* e il trasporto gastrointestinale verranno ricavate ricorrendo a monostrati di cellule Caco-2.

La ricerca comprende anche la valutazione della stima dell'esposizione, l'impiego di biomarcatori di esposizione e di effetto, e la valutazione tossicologica *in vitro* e *in vivo* di specifiche forme chimiche e chimico fisiche degli elementi, incluse le micro/nanoparticelle.

Risultati attesi nel triennio

Gli studi di speciazione, di bioaccessibilità e l'impiego di biomarcatori di esposizione possono essere combinati in un approccio integrato per la valutazione dell'interazione specie-specifica (ovvero a livello molecolare) tra gli elementi inorganici assunti attraverso la dieta e l'uomo.

Questo approccio consente l'ottenimento di dati di primaria importanza nel campo della 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.

Le linee di ricerca in cui è articolato il programma, in parte in via di finanziamento, includono la speciazione e la bioaccessibilità del selenio, dell'arsenico e del cromo in alimenti e mangimi; la speciazione del vanadio nelle acque minerali; la caratterizzazione del cadmio e del suo legame con le metallotioneine in matrici alimentari ricche di questo elemento; la caratterizzazione di micro/nanoparticelle in prodotti alimentari e una prima ricognizione dei loro possibili effetti tossici; gli studi sullo iodio urinario come biomarcatore dello *status* e possibile biomarcatore di effetto in relazione all'esposizione a interferenti endocrini; gli studi sul contenuto di selenio e zinco in fluidi e tessuti umani come biomarcatori per l'identificazione precoce di effetti sulla salute.

Trasferibilità dei risultati

I dati forniti dal programma sono ritenuti indispensabili per una efficace valutazione del rischio legato all'assunzione degli elementi in traccia presi in esame attraverso la dieta dagli organismi che in sede nazionale e comunitaria hanno compiti di valutazione del rischio.

Dalla maggior parte delle linee di ricerca elencate si attendono risultati che verranno direttamente trasmessi all'EFSA per le attività valutative pertinenti.

In alcuni casi, le linee di ricerca potranno fornire risultati con immediata ricaduta in termini di prevenzione di effetti avversi sulla salute e per l'implementazione di linee guida che, anche tenendo conto del rapporto rischio/beneficio, possano essere di ausilio nell'orientare le scelte alimentari dei consumatori.

Azione strategica di innovazione industriale – Nuove tecnologie per il *made in Italy*” – “Sicurezza dei prodotti a base di latte: il problema della contaminazione da *Listeria monocytogenes*”

Sorveglianze condotte in Europa, Australia e Stati Uniti hanno evidenziato un'estesa contaminazione da *Listeria monocytogenes* nel latte crudo. Inoltre vari studi finalizzati a verificare la presenza della *Listeria monocytogenes* negli ambienti e nelle attrezzature degli impianti di produzione e trasformazione di prodotti caseari hanno dimostrato l'ampia possibilità di contaminazione del latte dopo il processo di pastorizzazione. Durante il 2008 ci sono state sei notifiche di allerta riguardanti formaggi italiani contaminati con *Listeria monocytogenes*, in particolare in ricotta di pecora e gorgonzola e ciò rappresenta per l'autorità sanitaria motivo di

grande preoccupazione dato che la listeriosi, seppure rara, rimane una delle malattie alimentari con la più alta percentuale di mortalità (20-30%).

Come stabilito dal Regolamento CE 1441:2007, gli operatori del settore alimentare devono mettere in atto azioni per controllare la contaminazione da *Listeria monocytogenes* e la sua moltiplicazione nel prodotto fino al momento del consumo.

Verranno condotti studi per valutare la presenza/sopravvivenza della *Listeria monocytogenes* in prodotti lattiero-caseari sia nelle varie fasi di produzione/trasformazione sia nel prodotto finito fino alla fine della *shelf-life*.

Risultati attesi nel triennio

Implementazione delle pratiche igieniche nell'ambito del sistema HACCP, in accordo con i seguenti documenti del *Codex Alimentarius: Code of Hygienic Practice for Milk and Milk products (CAC/RCP 57-2004) and Recommended International Code of Practice-General Principles of Food Hygiene (CAC/RCP 1- 1969, Rev. 4, 2003)*.

Validazione delle misure di controllo in accordo con il documento del *Codex Alimentarius Guidelines for the Validation of Food Hygiene Control Measures*.

Studi di *shelf-life* finalizzati ad assicurare la conformità ai Criteri Microbiologici fissati per la *Listeria monocytogenes* negli alimenti RTE dal Regolamento CE 1441:2007. Tali studi verranno condotti in accordo con i seguenti documenti elaborati dalla Commissione Europea: “*GUIDANCE DOCUMENT on the shelf-life studies for ready-to-eat foods, under Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2008 on microbiological criteria for foodstuffs*” e “*TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT on shelf-life studies for Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods*”

Trasferibilità dei risultati

Trasferimento degli studi di *shelf-life* agli operatori del settore alimentare nell'ambito della produzione dei prodotti lattiero-caseari.

Biotechnologie e sicurezza alimentare: marcatori molecolari e biochimici

L'attività di ricerca verterà sulla valutazione del rischio chimico in particolare sul dosaggio di biomarcatori, indicatori di rischio e fattori protettivi per lo studio, sulla salute umana e animale, degli effetti positivi di componenti della dieta e degli effetti negativi di contaminanti quali xenobiotici, residui e additivi.

A tal fine, mediante metodiche di biologia molecolare (PCR e PCR *real time*), si cercherà di individuare e/o dosare marcatori molecolari, in sistemi *in vitro* e *vivo*, per studiare gli effetti di contaminanti quali xenobiotici, residui e additivi e della dieta sulla salute umana e animale. Inoltre verranno anche utilizzate metodologie biochimiche (cromatografia liquida, metodiche immuno-enzimatiche e spettrofotometriche) per studiare la risposta e l'andamento di marcatori biochimici (biologici) in diverse matrici biologiche (sangue, siero, plasma, urine ecc.) di origine animale (eventualmente anche umana) a supporto e convalida di quelli molecolari.

Le metodologie cromatografiche verranno anche impiegate per il dosaggio di tossine in matrici alimentari, e loro applicazione nella valutazione/confronto con nuovi metodi alternativi usati per la rivelazione di tali sostanze.

Risultati attesi nel triennio

Sviluppo di metodologie atte ad individuare e dosare marcatori molecolari /biochimici, la cui espressione e regolazione dipende dalla presenza/assenza di particolari sostanze (biotossine, contaminanti, residui, altro) negli alimenti.

Trasferibilità dei risultati

Lo sviluppo delle metodologie di cui sopra permetterà di utilizzarli come elementi predittivi per la valutazione della sicurezza alimentare e individuare i potenziali rischi legati alla contaminazione delle materie prime, lavorazione e trasformazione.

Bioterrorismo alimentare: rafforzamento dei sistemi di prevenzione e risposta a deliberati attacchi alla catena di distribuzione alimentare

Nella passata decade, molti Stati hanno investito nel tentativo di migliorare la capacità di prevenire, rilevare e rispondere alle minacce terroristiche. L'agricoltura, pur essendo un settore strategico della economia UE, è una delle aree che ha ricevuto meno attenzione al riguardo.

La *World Health Assembly* ha espresso una seria preoccupazione riguardo tali minacce e ha chiesto alla WHO di fornire strumenti e supporti agli Stati membri per aumentare la capacità di risposta dei sistemi di sicurezza nazionali. Nel *World Health Report 2007* la contaminazione accidentale e deliberata degli alimenti è stata considerata come una delle maggiori minacce per la salute pubblica del XXI secolo, gli alimenti sono infatti riconosciuti come un potenziale veicolo alla diffusione di agenti biologici, chimici, fisici e radioattivi su vasta scala. La contaminazione alimentare deliberata, volta ad ottenere dolosamente un profitto politico o finanziario, è dunque una possibilità che le autorità governative non possono ignorare.

Lo scopo di questo progetto è quello di produrre una *overview* delle strategie adottate in UE per fronteggiare attacchi terroristici alla catena di produzione/distribuzione alimentare. Nello specifico si propone di effettuare questa analisi in un contesto metodologico che consenta di adeguare le strategie alle potenziali minacce prendendo in considerazione la peculiarità delle differenti tipologie alimentari per meglio enfatizzare criticità ed aspetti che appaiono sotto/sovra stimati.

Risultati attesi nel triennio

L'obiettivo a breve-medio termine è quello di creare una roadmap delle strategie esistenti e delle iniziative intraprese in Europa nel tentativo di prevenire attacchi terroristici alla catena di distribuzione alimentare, evidenziando le criticità in relazione alle differenti catene di produzione/distribuzione. Alla luce del quadro che si delineerà, verranno individuate le minacce (agenti biologici, chimici e fisici) in relazione alle differenti tipologie alimentari; ciò sarà valutato sia nell'eventualità di un attacco su vasta scala che di un attacco isolato.

Nella fase finale del progetto sarà creata una rete costituita da enti pubblici, enti di ricerca e operatori del settore alimentare in grado di promuovere strategie e soluzioni per migliorare la capacità di prevenire e gestire attacchi deliberati alla catena di produzione/distribuzione degli alimenti, e sarà disponibile una metodologia per l'analisi dei gap partendo dalla produzione fino ad arrivare alla distribuzione sul territorio.

Al fine di avere un quadro completo della problematica si produrrà anche un elenco degli *stakeholder* che operano nel campo della "protezione" alimentare quali *contact point* per gli operatori del settore.

Solo per la prima fase del progetto è previsto un finanziamento.

Trasferibilità dei risultati

Le organizzazioni UE beneficeranno delle metodologie e dei dati che questo progetto produrrà fornendo le basi per una valutazione del livello di protezione alimentare e per definire misure comuni di azione (linee guida) nell'eventualità di un attacco sia su larga scala che isolato.

La costruzione di un sito web, l'organizzazione di workshop e la produzione di lavori scientifici contribuiranno alla diffusione dei risultati.

Biotracer Molecular Characterization of toxin genes of spore formers and Biotraceability of *C.botulinum*

Il progetto europeo Biotracer finanziato nell'ambito del VI programma quadro dell'UE ha come fine quello di definire gli strumenti analitici atti a permettere la biotracciabilità dei contaminati microbiologici in campo alimentare. L'unità operativa dell'ISS è inserita nell'area di ricerca relativa alla biotracciabilità di agenti batterici e virali potenzialmente utilizzabili in atti di bioterrorismo. Scopo principale dell'UO diretta dall'ISS è quella di mettere a punto e validare un metodo per permettere la biotracciabilità dei clostridi produttori di tossine botuliniche. Le neurotossine botuliniche (BoNT) sono infatti tra i più potenti agenti tossici conosciuti. Oltre alle specie *C. botulinum*, anche altri ceppi di clostridi, quali il *Clostridium butyricum* e *Clostridium baratii*, sono stati recentemente riconosciuti come produttori di BoNT. Il metodo colturale standard proposta dal CDC è il metodo di riferimento per la determinazione di questi clostridi, ma prende in considerazione solo il *C. botulinum*, e prevede che l'identificazione della produzione di tossina sia effettuata utilizzando la prova di tossicità sul topo. Il *mouse bioassay* è un metodo altamente sensibile e specifico, ma non armonizzabile e standardizzabile. L'individuazione dei geni produttori di neurotossina è considerato, quindi, il metodo di eccellenza per permettere la tracciabilità e rintracciabilità di tutti i clostridi produttori di BoNT nelle derrate alimentari.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi dal progetto saranno:

- Definire un metodo per la determinazione dei geni produttori di tossine botuliniche correlate a casi umani (bontA, B, E e F).
- Semplificare il metodo *Real Time* PCR in un *array real-Time* PCR per la sua facile applicazione nei laboratori deputati al controllo.
- Sottoporre il metodo ad una validazione *in house* utilizzando un appropriato numero di ceppi di clostridi produttori di tossina botulinica.
- Costituire una banca europea di DNA di clostridi produttori di tossine botuliniche.
- Validare il metodo tramite un ring *trial* internazionale.
- Armonizzare in forma ISO la procedura per permettere la sua approvazione come standard internazionale.

Trasferibilità dei risultati

Il metodo *Real-Time* PCR validato e armonizzato sarà trasferito ai laboratori dell'SSN deputati al controllo delle derrate alimentari.

Cinetica del metabolismo del nickel nell'uomo a seguito di esposizione orale

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. Il progetto attuale di estendere la base di dati acquisita su soli quattro soggetti, 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). Lo studio si svolgerà in collaborazione con il *Royal Surrey County Hospital*, Guildford, UK, che seguirà la parte clinica e ha richiesto e ottenuto l'autorizzazione della Commissione etica. Nel corso del progetto verranno messe a punto metodologie per l'analisi della composizione isotopica del nickel in fluidi ed escrezioni biologiche mediante ICP-MS.

Risultati attesi nel triennio

Produzione di nuova informazione relativamente al metabolismo di un elemento potenzialmente nocivo per la salute.

Identificazione di indicatori biologici specifici per il monitoraggio dell'esposizione ambientale e/o alimentare al nickel.

Trasferibilità dei risultati

Criteri per la valutazione dei rischi associati con esposizione orale al nickel.

Linee guida sull'assunzione di alimenti contenenti nickel.

Correlazione dell'antibioticoresistenza con la modulazione della virulenza in patogeni d'interesse alimentare

Alcuni patogeni alimentari mostrano un alto livello di variabilità genica e questa li predispone ad una modulazione funzionale che ne condiziona la patogenicità e la resistenza. Più precisamente, regioni del genoma che codificano per fattori non sintetici sono la più importante fonte di variazione di patogenicità e resistenza. Solitamente i geni della resistenza e della patogenicità sono differenzialmente integrati nel genoma e questo comporta un potenziale patogeno diverso.

Tenuto conto che il massiccio uso di antibiotici provoca una marcata pressione selettiva nell'ambiente, che, a sua volta, comporta inevitabilmente l'emergenza e la persistenza di batteri antibiotico-resistenti, appare interessante stabilire se questo carattere si accompagna alla emergenza di ceppi con un potenziale patogeno maggiore.

Viene pertanto proposto uno studio inteso a valutare la prevalenza e l'associazione dell'antibioticoresistenza con i fattori di virulenza presenti in due specie di rilievo ai fini della sicurezza alimentare: *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

Risultati attesi nel triennio

Identificazione dei profili di resistenza agli antibiotici che più si associano con i ceppi maggiormente virulenti. In modo da definire un protocollo terapeutico appropriato che permetta di ridurre la presenza nell'ambiente di tali ceppi.

Trasferibilità dei risultati

La linea guida per la terapia delle principali malattie infettive con cui ridurre la diffusione ambientale dei ceppi resistenti/più virulenti, verrà messa a disposizione dei veterinari di campo e pubblici.

Criticità della terapia antibiotica: uso alternativo di oli essenziali e sviluppo di nuovi metodi per la ricerca di residui di antibiotici

Il massiccio uso di antibiotici provoca una marcata pressione selettiva nell'ambiente che comporta inevitabilmente l'emergenza e la persistenza di batteri antibiotico-resistenti, capaci di provocare malattie nell'uomo e negli animali, contribuendo significativamente al multifattoriale problema dell'antimicrobicoresistenza.

Inoltre, il mancato rispetto delle condizioni d'uso previste per la terapia veterinaria (molecole non autorizzate, tempi di sospensione e dosaggi non permessi) provoca l'emergenza di un problema sanitario addizionale rappresentato dalla presenza dei residui delle molecole antibiotici negli alimenti.

Per la riduzione dell'antibioticoresistenza, è stato suggerito da organismi internazionali di considerare soluzioni alternative allo studio e produzione di nuove molecole antimicrobiche. Gli oli essenziali vegetali stanno ricevendo attenzione per una possibile applicazione come antimicrobici sia nella pratica medica umana che animale.

Gli attuali metodi di screening per la ricerca dei residui sono caratterizzati dalla capacità limitante di rilevare ai livelli ammessi poche singole differenti molecole antibiotiche o nella migliore delle ipotesi qualche singola famiglia.

Risultati attesi nel triennio

Identificazione e valutazione di terpeni per un potenziale impiego nella terapia delle infezioni di più rilevante interesse veterinario comprese quelle sostenute da agenti antibiotico resistenti.

Preparazione di formulati per la terapia di alcune infezioni animali in grado di condizionare la qualità e la sicurezza degli alimenti.

Messa a punto di un nuovo metodo di screening per la ricerca di un ampio numero di molecole delle più importanti famiglie antibiotiche utilizzate nella pratica veterinaria ai rispettivi livelli ammessi.

Trasferibilità dei risultati

Prodotti d'uso terapeutico destinati agli allevatori.

Protocolli e metodiche per la ricerca di residui di antibiotici negli alimenti verranno messi a disposizione dei laboratori di controllo pubblici e privati.

Criticità produttive nei piatti pronti al consumo

Nella corretta produzione di piatti pronti, anche in ragione dell'ampia variabilità di composizione, non è economico e utile valutare in continuo la qualità del prodotto finito, ma occorre soprattutto applicare e vigilare sulle norme di buona produzione e attivare il monitoraggio di eventuali punti critici di controllo nell'ambito del sistema HACCP.

Lo studio retrospettivo della relazione che interviene tra il consumo di alcune tipologie di questi prodotti (anche non tradizionali ma di rilevante diffusione in seguito all'estendersi dell'immigrazione) e il manifestarsi di patologie dovrebbe consentire di individuare le produzioni più critiche, basandosi eventualmente, in mancanza di dati consolidati, sull'esperienza clinica di specialisti.

Un successivo studio su ampia scala delle modalità di produzione di alcune tipologie di piatti pronti con presunta/accertata elevata criticità, condotto in collaborazione con enti o istituzioni che si avvalgono di servizi di ristorazione collettiva per i propri utenti o dipendenti, consentirà di individuare e classificare le attività a maggior rischio che più spesso intervengono nel determinare inconvenienti igienico-qualitativi.

Si valuterà l'accuratezza della scelta delle materie prime e l'applicazione della buona prassi igienica e del sistema HACCP con evidenziazione delle eventuali lacune gestionali, in grado di condurre a probabili sviluppi negativi.

Dati valutativi di supporto emergeranno dalla verifica del sistema HACCP e dalla risposta degli utenti.

Risultati attesi nel triennio

Individuazione di tipologie di piatti pronti per il consumo a maggior rischio igienico. Individuazione e classificazione di attività produttive a maggior rischio igienico e, in via secondaria, individuazione di valori di riferimento utili come criteri di igiene di processo.

Interpretazione degli scostamenti significativi da procedure/valori di riferimento.

Grado di coerenza tra studi predittivi basati sulla microbiologia delle materie prime e riscontri effettivi ottenuti nelle preparazioni.

Trasferibilità dei risultati

Dati e procedure di riferimento utili per l'elaborazione di linee guida per l'applicazione/valutazione delle misure di controllo nella produzione di piatti pronti per il consumo, rese disponibili ai laboratori dell'SSN.

Informazioni integrative ai fini dell'estensione del regolamento (CE) n. 1441/2007 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari (in particolare: criteri di igiene di processo).

Comunicazione dei risultati alle imprese, anche ai fini di una ulteriore collaborazione.

DatabasePlantTox: Studio di sostanze naturalmente presenti negli organismi vegetali. Metabolismo e tossicità su animali e uomini

Negli ultimi anni abbiamo assistito al rapido sviluppo delle medicine alternative che, come base, utilizzano prodotti vegetali. Le materie prime, erbe ed estratti, utilizzati per la preparazione dei prodotti farmaceutici e vegetali sono importati da Paesi terzi, nella maggior parte dei casi extracomunitari, non assoggettati al rispetto delle numerose norme restrittive in uso nei Paesi dell'UE. Per questi motivi, ogni anno gli organismi preposti alla tutela della salute sono sottoposti a continue richieste di informazioni sulla salubrità di prodotti di cui non si conoscono con esattezza né quali siano le sostanze contenute né quali siano i rispettivi principi attivi. Ciò rappresenta un problema evidente soprattutto quando si devono approntare risposte rapide a domande che sorgono dal rischio di intossicazione/avvelenamento di consumatori e/o lavoratori o a richieste urgenti per lo sblocco di merci ferme in dogana.

La Comunità Europea, per regolamentare il settore di cui si parla, ha emanato diverse direttive sui medicinali vegetali e sugli integratori alimentari, ma allo stato attuale si ricorda che nella Comunità non esistono database su prodotti a base di sostanze vegetali.

Risultati attesi nel triennio

Acquisizione dei dati relativi alla presenza di sostanze potenzialmente nocive in prodotti a base di piante al fine di un loro utilizzo per la valutazione del rischio associato al consumo di tali prodotti.

Organizzazione in un sistema di gestione dati delle caratteristiche compositive anche in relazione al potenziale tossico di alcuni preparati a base di piante.

Trasferibilità dei risultati

Trasferire le informazioni acquisite alle autorità sanitarie centrali e periferiche nell'ambito delle attività di sorveglianza e controllo ufficiale.

Diagnosi e caratterizzazione molecolare di virus gastroenterici

I Rotavirus (RV) e i Norovirus (NoV) causano globalmente oltre il 40% dei casi gravi di diarrea infantile acuta, provocando mediamente oltre 200 morti e 100.000 ricoveri per anno in Europa. I NoV sono inoltre responsabili di oltre la metà delle epidemie di gastroenterite nell'adulto, essendo trasmessi anche per via alimentare. Dal 2006, sono disponibili in commercio due vaccini vivi contro l'infezione da rotavirus, efficaci contro i principali sierotipi di rotavirus umano. Una trasmissione zoonotica dei NoV, oltre al ruolo quale veicolo di alimenti vegetali e molluschi, è stata anche proposta per ceppi virali suini. Il progetto valuterà la circolazione dei ceppi di rotavirus nei pazienti pediatrici con diarrea acuta in Italia, in un contesto di epidemiologia molecolare a livello europeo. Lo studio presterà particolare attenzione alla diffusione di ceppi virali emergenti e a trasmissione zoonotica e di variazioni possibilmente correlabili agli effetti delle campagne di vaccinazione. Il progetto si propone inoltre l'impiego di metodi molecolari per la caratterizzazione dei genotipi circolanti di NoV e in particolare di quelli associati ad epidemie, in Italia e in relazione alla situazione europea. Saranno generate proteine virali ricombinanti e anticorpi monoclonali genotipo-specifici o *cross*-reattivi per

identificare epitopi costanti e variabili sulle proteine capsidiche virali. I dati epidemiologici e di laboratorio saranno analizzati mediante database presso l'ISS e la EC.

Risultati attesi nel triennio

Saranno ottimizzati i metodi molecolari per la genotipizzazione di RV pediatriche, in particolare varianti virali insolite ed emergenti e ceppi di origine animale. I dati di caratterizzazione molecolare (antigeni capsidici e proteina enterotossica) serviranno a consolidare il database genomico costituito presso l'ISS (Dipartimento SPVSA/CRIVIB), interfacciandolo con il database EuroRotaNet, presso l'HPA, UK. I dati italiani saranno confrontati con i dati europei, definendo dinamiche evolutive e diffusione transnazionale di RV. I dati di sequenza serviranno a studiare ceppi emergenti e/o animali o riassortanti uomo-animale, per analizzare possibili selezioni geno-fenotipiche correlabili e/o prevenibili con i vaccini. Saranno prodotti dati di genotipo e sequenza su NoV da casi sporadici ed epidemie in comunità in Italia, in particolare a trasmissione alimentare. I dati di caratterizzazione molecolare serviranno a identificare ceppi a diffusione transnazionale, e ad ottimizzare tecniche diagnostiche rapide ad ampio spettro, quali *real-time* PCR e *Array*. Saranno identificati ceppi di NoV di Genogruppo II in suini di allevamento, comparandone la sequenza con ceppi implicati in casi umani di gastroenterite. Saranno prodotte *Virus-like particle* (VLP) di ceppi diversi di NoV per la produzione di anticorpi monoclonali cross-reattivi e tipo-specifici, per l'uso quali antigene in test sierologici, e per lo studio di determinanti antigenici e siti di interazione virali con recettori cellulari.

Trasferibilità dei risultati

Produzione di database epidemiologico-virologici utili per l'SSN. Dati su diffusione ed evoluzione di RV di origine umana o animale nei casi clinici italiani. Dati sul confronto tra la situazione epidemiologico-molecolare dell'infezione pediatrica da RV in Italia ed Europa. Definizione della *baseline* sulla diffusione dei genotipi di mRV prima della vaccinazione su larga scala. Dati sulla circolazione in Italia di ceppi di NoV autoctoni o di importazione da altri paesi europei, anche tramite alimenti. Messa a punto di metodi molecolari di possibile impiego a livello diagnostico periferico. Identificazione di focolai epidemici di gastroenterite in comunità, controllo delle fonti di rischio e della diffusione virale. Sviluppo di anticorpi per la differenziazione antigenica dei ceppi di NoV di diverso genotipo. Preparazione di *report* e linee guida sulla gestione della diagnostica dei NoV e delle emergenze sanitarie. Pubblicazioni scientifiche e presentazioni a convegni.

Effetti di componenti della dieta sull'interazione adipocita-macrofago nello sviluppo dello stato infiammatorio nell'obesità

L'obesità, da sempre riconosciuta come fattore di rischio per malattie cardiovascolari, diabete tipo II, insulino-resistenza e diversi tipi di cancro, oggi è considerata essa stessa una patologia. Diversi studi indicano che l'obesità è associata ad un cronico stato di infiammazione, suggerendo questo come potenziale meccanismo patogenetico. In soggetti obesi si ha un aumento di proteine infiammatorie circolanti, e una massiccia infiltrazione di macrofagi nel tessuto adiposo dovuto all'aumento di MCP1. Recenti studi suggeriscono che fra i macrofagi integrati nel tessuto adiposo e gli adipociti stessi si stabiliscano interazioni reciproche creando un circolo vizioso capace di amplificare la risposta infiammatoria. Tale "dialogo" potrebbe essere mediato dal recettore TLR4 un membro della famiglia dei recettori TLR che svolgono un ruolo critico nella risposta immuno-mediata e che possono essere attivati, tra l'altro da componenti della dieta e LDL ossidate (oxLDL). È noto che la dieta mediterranea, ricca di frutta, verdura e olio extra vergine d'oliva (EVOO), esercita effetti salutistici e protettivi grazie alla presenza di composti polifenolici con proprietà anti-infiammatorie e antiossidanti. Il

progetto si propone di studiare i meccanismi molecolari alla base dell'interazione tra macrofagi e adipociti coinvolta nell'innescò dell'inflammazìone associata ad obesità, e di identificare i target molecolari che mediano gli effetti protettivi dei polifenoli.

Risultati attesi nel triennio

Per questi studi si utilizzeranno adipociti isolati da biopsie di grasso viscerale e monociti/macrofagi isolati da sangue periferico, di soggetti normopeso (BMI 22- 24,9 Kg/ m²) e obesi (BMI > 35 Kg/m²). Su queste cellule si valuterà la secrezione di citochine infiammatorie (TNF α , IL6 e MCP-1), l'espressione di TLR4 e l'attivazione di *pathway* pro-infiammatori, prima e dopo trattamento con oxLDL, allo scopo di identificare l'esatto contributo dei due tipi cellulari al processo infiammatorio. Parallelamente, al fine di definire il ruolo degli adipociti nel modulare la risposta infiammatoria, macrofagi umani di soggetti normopeso saranno incubati con terreno condizionato da adipociti provenienti dai soggetti obesi e se ne valuterà l'attivazione attraverso markers opportuni. Infine, per identificare i meccanismi d'azione e gli specifici *pathway* sui quali i polifenoli della dieta possono agire per contrastare il processo infiammatorio, si utilizzerà l'acido protocatecuico (PCA) contenuto nell'EVOO e considerato uno dei maggiori metaboliti di polifenoli complessi, il quale, oltre ad essere dotato di attività antiossidante/antinfiammatoria, è capace di modulare diverse attività cellulari. In particolare si definirà la capacità del PCA di: i) contrastare gli effetti pro-infiammatori delle oxLDL sugli adipociti e sui macrofagi, e ii) revertire le disfunzioni adipocitarie legate ad obesità e responsabili dell'attivazione delle cellule macrofagiche.

Trasferibilità dei risultati

È da sottolineare l'aspetto innovativo dell'utilizzo di un modello di adipociti umani isolati dal comparto viscerale, il più coinvolto nel determinare l'insorgenza di complicanze legate a obesità. I dati ottenuti permetteranno di individuare nuovi target molecolari per nuove terapie e *marker* per il monitoraggio di rischio e progressione della malattia. Inoltre le nuove conoscenze acquisite attraverso questo studio potranno essere utilizzate a medio e lungo termine in applicazioni cliniche, offrendo all'SSN indicazioni per interventi dietetici mirati e utilizzo di sostanze naturali quali polifenoli contenuti nell'olio extra vergine d'oliva nel prevenire e contrastare l'obesità e le sue complicanze.

Effetto del consumo di olio extra vergine di oliva in soggetti obesi, in età adulta e pre-puberale

Obesità e sovrappeso ormai interessano tutte le fasce di età, compresa l'età evolutiva. L'obesità è legata all'insorgenza di patologie ad alta morbilità e mortalità come diabete tipo II, arteriosclerosi, e alcuni tipi di cancro. In particolare, l'insorgenza di diabete tipo II in soggetti in sovrappeso o obesi, è stata messa in relazione all'accumulo di adipe a livello viscerale che, attraverso un'alterata secrezione di adipocitochine, è responsabile dell'insorgenza di uno stato infiammatorio cronico e della sindrome metabolica caratterizzata da ipertensione, dismetabolismo lipidico, iperinsulinemia e/o insulino-resistenza. Evidenze epidemiologiche dimostrano che l'adesione alla dieta mediterranea, che è ricca di alimenti di origine vegetale e utilizza come condimento l'olio extra vergine di oliva (EVOO), riduce significativamente il rischio di diabete tipo II e arteriosclerosi. In particolare è stato dimostrato che i polifenoli contenuti nell'EVOO svolgono un'efficace azione protettiva contro infiammazione e obesità. Resta tuttavia da definire la loro reale efficacia *in vivo*, a causa dello scarso numero di studi di intervento condotti, nessuno nei soggetti giovani. Per questo motivo il progetto si propone di valutare l'effetto dell'olio extravergine di oliva e dei suoi componenti polifenolici in due diverse popolazioni (età adulta ed età evolutiva), attraverso uno studio di intervento, l'unico in grado di fornire indicazioni utili sulla reale efficacia dei composti fenolici.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio di intervento sulla popolazione in età adulta, coinvolgerà 30 soggetti obesi (età tra i 35 e 70 aa, $25 < \text{BMI} < 35$, circonferenza vita > 88 cm donne, e > 102 cm uomini). Lo studio sulla popolazione infantile coinvolgerà 35 bambini tra i sei e i dodici anni, con BMI uguale o maggiore del 97° percentile in base all'età e al sesso. Gli studi saranno basati su un disegno *cross-over* e avranno una durata di dodici settimane distinte in quattro fasi durante le quali i soggetti consumeranno una dieta controllata con, alternativamente, olio di oliva a basso o ad alto contenuto di polifenoli. Alla fine di ogni fase i soggetti partecipanti allo studio verranno sottoposti a prelievo di sangue e a raccolta delle urine delle 24 ore. Verranno valutati: parametri ematici di controllo dell'infiammazione e del metabolismo lipidico e glucidico (HOMA-IR, insulina, oxLDL); il contenuto di IL-6, TNF α , adiponectina, apelina, visfatina, vit E, retinolo, b-carotene e polifenoli nel plasma; il contenuto di isoprostani nonché polifenoli e loro prodotti metabolici nell'urina. Scopo di tali studi sarà quello di approfondire le nostre conoscenze sul rischio di sviluppare diabete tipo II e insulino-resistenza, nell'età adulta ed evolutiva e di stabilire come i polifenoli presenti nell'olio possano avere un ruolo nel contrastare lo stato subcronico di infiammazione presente in corso di obesità.

Trasferibilità dei risultati

L'obesità e le sue complicanze rappresentano una emergenza sanitaria, poiché il suo incremento ha avuto nel nostro Paese, come in tutti gli altri Paesi economicamente avanzati, un andamento di tipo esponenziale interessando tutte le fasce di età.

La nuova conoscenza prodotta dal progetto potrà essere trasferita agli operatori dell'SSN indicando nuovi approcci nutrizionali per la prevenzione e terapia delle patologie associate ad obesità. Questo rappresenta l'aspetto qualificante del progetto poiché, sebbene l'interesse per le proprietà salutari di specifici alimenti stia aumentando sempre più, esso si basa principalmente su dati sperimentali ottenuti in sistemi *in vitro* e solo in rari casi la conoscenza ottenuta dalla ricerca di base viene confermata e validata da studi di intervento, i quali rappresentano l'unico strumento per dare conferme convincenti sulla reale efficacia di alcuni alimenti.

Effetto di fattori ambientali sulla tossicità di *Ostreopsis spp* e studio di bioaccumulo e rilascio, da parte di molluschi bivalvi, delle tossine prodotte

I dinoflagellati bentonici produttori di tossine costituiscono un problema sanitario non più solo nelle aree tropicali ma anche in zone temperate come il Mediterraneo. In seguito a *bloom* di *Ostreopsis ovata* in diverse Regioni d'Italia si sono avute intossicazioni nell'uomo causate da inalazione di aerosol e taluni prodotti ittici sono risultati tossici (molluschi, ricci, pesci).

Molte specie di *Ostreopsis* sono potenzialmente tossiche, possono produrre patitossine che agendo a livello delle membrane cellulari alterano lo scambio di ioni Na⁺, K⁺, Ca²⁺.

Con l'Università di Tor Vergata si vuole studiare come l'intensità della luce e la temperatura dell'acqua possano favorire lo sviluppo di fioriture e la produzione di tossine, mediante uso di bioreattori di crescita. Inoltre saranno utilizzati metodi di PCR per il riconoscimento algale.

Per valutare il rischio associato al consumo di molluschi bivalvi si condurranno studi atti a verificare le dinamiche di contaminazione e di rilascio, da parte di questi organismi, di alcune specie algali del genere *Ostreopsis*, utilizzando impianti pilota con ricircolo di acqua di mare artificiale e in condizioni controllate di depurazione (temperatura e sistema combinato di raggi UV e ozono). La determinazione della tossina verrà effettuata mediante utilizzo di metodi biologici (test di emolisi su eritrociti di pecora, test di citotossicità su colture cellulari, test della lattato deidrogenasi con uso di un biosensore) e chimici (HPLC e HPLC/MS).

Risultati attesi nel triennio

Conoscenza di come i fattori ambientali influiscono sulla crescita di *Ostreopsis spp* e quindi sullo sviluppo di fioriture con possibile produzione di tossine.

Conoscenza sulla capacità di accumulo, da parte dei molluschi bivalvi, di alghe tossiche e definizione delle condizioni ottimali (tempi e temperature) per facilitare la detossificazione dei molluschi sottoposti a processo di depurazione.

Trasferibilità dei risultati

Le conoscenze relative all'influenza dei fattori ambientali e ai processi di depurazione, la diffusione di metodi per il rilevamento di tossine e per l'identificazione di specie dell'*Ostreopsis*, saranno utili alle autorità competenti nell'elaborazione di piani di sorveglianza a tutela della salute pubblica e nel prendere le dovute precauzioni prima della commercializzazione dei molluschi.

Elementi in traccia: presenza negli alimenti e nei mangimi, effetti biologici, speciazione, fonti e trasferimento lungo la catena alimentare

Recenti studi in ambito internazionale hanno evidenziato la necessità di implementare la conoscenza relativa alla presenza di contaminanti nelle diverse tipologie alimentari.

Appare necessaria soprattutto la valutazione del profilo biochimico con il quale i diversi contaminanti si presentano negli alimenti, con particolare attenzione agli alimenti destinati a categorie di popolazione vulnerabile (es. *baby food*).

Contemporaneamente, in analogia agli studi condotti in relazione al progetto "*from the farm to the fork*" la determinazione della presenza di tali contaminanti in tutta la filiera alimentare (compreso il segmento zootecnico) assume assoluta priorità.

Il progetto prevede la determinazione di Hg, As, Pb e Cd in matrici alimentari ad uso umano e veterinario allo scopo di valutarne i livelli di presenza in funzione dei limiti comunitari descritti. La distribuzione nelle diverse forme in cui ciascun elemento può essere presente, sarà valutata attraverso opportuni studi di speciazione.

Le determinazioni verranno condotte con moderne tecniche analitiche e metodi validati.

Le tecniche analitiche impiegate saranno: Q-ICP-MS, Z-ETA-AAS, FIMS-AAS.

Per la valutazione della speciazione chimica degli elementi descritti gli strumenti indicati saranno accoppiati con HPLC-DAD.

Risultati attesi nel triennio

I risultati prodotti saranno confrontati con gli attuali limiti di legge cogenti; saranno inoltre verificati eventuali trend di aumento o diminuzione dei livelli rispetto ai dati storici. Eventuali variazioni osservate potranno essere utilizzate nell'ottica di una revisione dei limiti di legge ad oggi stabiliti.

Gli studi relativi alla speciazione consentiranno di descrivere un profilo di presenza di ciascuna specie in ciascuna matrice allo scopo di valutare come i limiti di legge relativi alla presenza di talune sostanze indesiderate possano essere riferite più dettagliatamente a quei composti di maggior impatto tossicologico.

Trasferibilità dei risultati

- Eventuale revisione della normativa comunitaria in materia di limiti massimi di contaminanti.
- Trasferimento ai laboratori del Controllo Ufficiale dei Metodi Validati per la determinazione dei contaminanti (As, Cd, Pb, Hg).

Formazione e consulenza per le Autorità competenti in materia di sicurezza alimentare e controlli ufficiali

Il progetto di ricerca si propone di fornire ai tre livelli dell'Autorità competente (livello nazionale, regionale e territoriale) il supporto tecnico-scientifico e le attività di consulenza necessarie per:

- la realizzazione delle attività di formazione e addestramento previste all'articolo 6 del Regolamento (CE) 882/2004 e all'Allegato II, Capo I dello stesso regolamento per il personale preposto ai controlli ufficiali (con particolare riguardo alla diffusione dei manuali di corretta prassi igienica);
- l'implementazione dei processi e delle procedure documentate necessarie a: garantire l'efficacia e l'appropriatezza dei controlli ufficiali su animali vivi, mangimi e alimenti in tutte le fasi della produzione, trasformazione e distribuzione, nonché riguardo all'uso dei mangimi; assicurare l'imparzialità, la qualità e la coerenza dei controlli ufficiali a tutti i livelli;
- la realizzazione delle attività di audit previste all'articolo 4, paragrafo 6 del Regolamento (CE) 882/2004 (audit sull'autorità competente).

Risultati attesi nel triennio

Le attività di formazione e addestramento e di consulenza – già avviate su richiesta del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali e nei confronti di alcune Autorità competenti regionali (Liguria, Sicilia, Valle D'Aosta) e territoriali (ASL di Trapani, ASL di Agrigento, ASL di Benevento e ASL della Valle D'Aosta) – sono volte a garantire una corretta e omogenea applicazione di quanto previsto dai regolamenti del pacchetto igiene e dalla normativa cogente correlata. L'obiettivo finale è quello di contribuire al miglioramento dell'efficacia e dell'appropriatezza dei controlli ufficiali assicurandone al contempo l'imparzialità, la qualità e la coerenza. Tale obiettivo assume una valenza strategica in vista degli audit generali e specifici che saranno effettuati da parte di esperti della Commissione nel nostro Paese ai sensi dell'articolo 45 del Regolamento (CE) 882/2004.

Trasferibilità dei risultati

Le attività di formazione e addestramento e di consulenza finora svolte hanno permesso: di acquisire tutti gli elementi necessari per garantire il trasferimento di conoscenze (sapere), strumenti operativi e organizzativi (saper fare) e modalità comportamentali (saper essere) alle Autorità competenti di tutto il territorio nazionale che ne facciano richiesta; di garantire, attraverso un circuito virtuoso, una corretta e omogenea applicazione su tutto il territorio nazionale di quanto previsto dai regolamenti del pacchetto igiene e dalla normativa cogente correlata.

Gestione della sanità in acquacoltura e riflessi sulla sicurezza alimentare

Appare sempre più evidente l'importanza che riveste l'acquacoltura quale fonte di produzione alimentare per l'uomo. Già oggi, la FAO stima che circa il 43% del pesce attualmente consumato sia di allevamento. Inoltre, entro il 2030, viene stimato che in relazione alla crescita della popolazione mondiale, saranno necessari ulteriori 40 milioni di t di organismi acquatici per mantenere gli attuali consumi medi pro capite (16 kg). Solo l'acquacoltura sembra in grado di poter incrementare le produzioni sino a soddisfare la crescente domanda di alimenti ittici.

Però su questo settore l'aspetto sanitario rappresenta un elemento di particolare delicatezza. Negli allevamenti, dove generalmente è alto il carico di pesce per volume d'acqua (35-50 kg/m³), le condizioni di stress degli animali aumentano, favorendo lo sviluppo di infezioni

(batteri, virus, funghi e parassiti) che causano gravi perdite del prodotto con relativi danni economici.

Nel 2004, la Commissione ha stimato che nei Paesi UE le perdite nel settore dell'acquacoltura, dovute solo alle patologie ittiche, siano nell'ordine del 20% rispetto alla produzione totale, per un valore economico di 500 milioni di euro, su un complessivo di 2,5 miliardi di euro.

Per contrastare le ittiopatologie si è fatto ricorso in tutti i Paesi all'impiego di vaccini, di farmaci veterinari e di varie sostanze disinfettanti. Negli anni più recenti si è cercato di cambiare impostazione attraverso l'applicazione di linee guida sulle buone pratiche di allevamento orientate più sulle attività di prevenzione che di terapia, impiegando nuovi vaccini e altri principi immunostimolanti. Nonostante questa evoluzione, molte malattie hanno continuato a manifestarsi e il ricorso a molecole farmacologicamente attive spesso risulta ancora indispensabile.

L'impiego di queste sostanze, sebbene regolato da numerose norme comunitarie e nazionali, può causare comunque una serie di rischi sanitari legati al problema della presenza di residui nelle carni (sostanze autorizzate ma oltre i limiti consentiti, sostanze impiegate illecitamente o vietate), all'impatto ambientale e ai fenomeni di ceppi batterici farmaco resistenti con trasferimento all'uomo. Queste problematiche non sono limitate alle produzioni acquicole italiane o comunitarie ma sono comuni a tutte le produzioni d'acquacoltura mondiale. E considerato il volume di questi prodotti importati anche da Paesi terzi, la valutazione di questi rischi assume una importanza sia per gli aspetti di sanità animale (codice OIE) che di sicurezza degli alimenti per consumo umano.

Il progetto vedrebbe coinvolti come partner Il Dipartimento di Ecologia e Acquacoltura dell'Università Tor Vergata e il Dipartimento di Biologia della Sapienza Università di Roma.

Risultati attesi nel triennio

Nell'ambito di queste problematiche, si vorrebbe impostare questo programma di ricerca su due linee di intervento:

- messa a punto e aggiornamento di metodiche chimico analitiche per la individuazione di molecole di sostanze farmacologicamente attive presenti nei tessuti dei pesci;
- individuazione, valutazione e sperimentazione di nuove sostanze attive verso alcune patologie ittiche.

Non risultano esserci rimedi validi per una serie di rilevanti patologie ittiche presenti nella maricoltura italiana (ma anche di altri Paesi mediterranei), come la Necrosi Virale del Sistema Nervoso (VNN), la Tuberculosis (*Mycobacterium marinum*), l'Infezione Enterica (*Enteromyxum leei*), la Linfocisti (Iridovirus), la *Winter disease*, le infezioni parassitarie da protozoi, elminti, ectoparassiti.

Senza principi attivi anche alcune importanti patologie dei pesci allevati in acqua dolce: la Necrosi Ematopoietica Infettiva (IHN-Rhabdovirus), la Malattia Proliferativa Renale (PKD-*Tetracapsuloides bryosalmonae*).

Una tale attività sarebbe in linea anche con una serie di raccomandazione di alcune agenzie internazionali come la FAO, l'OIE e la stessa Commissione, che invitano tutti i Paesi coinvolti in queste produzioni a fare uno sforzo per contrastare le perdite dovute alle patologie in acquacoltura.

Trasferibilità dei risultati

I beneficiari di questa ricerca potrebbero essere i piscicoltori italiani ed esteri, i medici veterinari ispettori di ASL, PIF e UVAC, gli operatori sanitari che svolgono attività di controllo e analisi (ARPA, IZS).

Identificazione dei meccanismi patogenetici responsabili degli eventi avversi della gravidanza nella malattia celiaca

La malattia celiaca (MC) è un'enteropatia autoimmune, scatenata nei soggetti geneticamente determinati dal glutine. Il glutine è una miscela proteica alcol-solubile presente in cereali quali grano, segale e orzo. È la più frequente intolleranza alimentare, con un'incidenza di circa 1:100 a livello mondiale; l'unica terapia disponibile è l'esclusione degli alimenti contenenti glutine dalla dieta. Pur essendo definita un'enteropatia, la MC è una condizione sistemica, dal momento che può coinvolgere diversi organi e sistemi, tra cui l'apparato riproduttivo femminile. È infatti descritta la correlazione tra MC da una parte ed eventi avversi in gravidanza e sfavorevole *outcome* neonatale, dall'altra, in particolare aborti spontanei, parti prematuri e ritardo di crescita intrauterino. L'attività per i prossimi tre anni sarà in parte finalizzata ad identificare i fattori che determinano l'aumentata incidenza di patologie ostetriche nella celiachia. Si valuterà se l'assunzione del glutine durante la gravidanza da parte delle donne celiache sia la causa delle patologie sopra elencate. A tal fine, si verificherà se il glutine determini insufficienza placentare, mediante l'apoptosi delle cellule del trofoblasto in seguito all'attivazione dei meccanismi immunologici della decidua o attraverso l'attività degli anticorpi anti-transglutaminasi, presenti nel sangue periferico dei soggetti celiaci che assumono glutine.

Risultati attesi nel triennio

Si prevede di individuare i meccanismi patogenetici responsabili dell'aumentato rischio delle patologie ostetriche nelle donne celiache. In particolare, si prevede di dimostrare che la patogenesi della poliabortività, deficit di crescita intrauterino e basso peso neonatale nelle gravidanze delle donne celiache è dovuta al consumo di glutine durante la gravidanza. Il glutine determinerebbe insufficienza placentare provocando un aumento del *rate* di apoptosi delle cellule del trofoblasto, mediante stimolazione immunogenica diretta nei confronti del sistema immune della decidua e/o mediata dagli anticorpi anti-transglutaminasi. Di conseguenza, l'esclusione totale del glutine dalla dieta nel periodo peri-concezionale e durante tutta la gravidanza comporterebbe una riduzione del rischio di sviluppare insufficienza placentare e le patologie ad essa dovute durante la gravidanza delle donne affette da celiachia.

Il presente progetto sarà svolto in collaborazione con il laboratorio della Prof.ssa Di Simone – Dipartimento per la Tutela della salute della donna e della vita nascente, Università Cattolica Sacro Cuore, Roma.

Trasferibilità dei risultati

Se i risultati attesi saranno confermati dalle procedure sperimentali, la loro trasferibilità sarebbe immediata. Infatti si dimostrerebbe per la prima volta con dati sperimentali, e non solo con studi epidemiologici, che il glutine è coinvolto nelle patologie della gravidanza nelle donne celiache e che la sua completa eliminazione dalla dieta nel periodo peri-concezionale e durante tutta la gravidanza è l'unico mezzo efficace per prevenire le patologie ostetriche che spesso complicano la gravidanza delle donne celiache. Inoltre per la prima volta sarebbe dimostrato che il glutine viene presentato al sistema immunitario in un distretto diverso da quello intestinale. Tale evidenza sarebbe importante per identificare efficaci terapie per la MC alternative alla dieta priva di glutine, le quali non dovrebbero prevedere un'azione unicamente a livello intestinale.

Identificazione di predittori di virulenza per la messa a punto di metodi per la ricerca di VTEC negli alimenti e nei campioni clinici, animali e ambientali

Gli *Escherichia coli* produttori di Verocitotossine (VTEC) sono patogeni zoonotici in grado di causare gravi patologie nell'uomo. Il serbatoio naturale dei VTEC è l'intestino dei ruminanti e la trasmissione all'uomo avviene attraverso il consumo di alimenti contaminati ma anche

attraverso veicoli legati alla dispersione delle deiezioni dei ruminanti nell'ambiente. Nel serbatoio animale sono stati identificati numerosi sierogruppi VTEC ma i ceppi patogeni identificati finora appartengono ad un numero limitato di questi e posseggono, oltre ai geni codificanti le verocitotossine, fattori di virulenza accessori veicolati da elementi genetici mobili che includono plasmidi, batteriofagi e isole di patogenicità. A causa della loro grande eterogeneità fenotipica e genotipica, è estremamente difficile definire uno schema di classificazione univoco dei VTEC patogeni per l'uomo. Questo aspetto rappresenta una priorità per la definizione dei criteri microbiologici per la salubrità degli alimenti e per la messa a punto di metodi efficaci per la loro identificazione.

L'obiettivo di questa ricerca è la comparazione dell'intero genoma di ceppi VTEC isolati da casi umani e dal serbatoio animale attraverso metodiche innovative quali l'analisi *microarray* e il sequenziamento diretto ad alta capacità. Questo studio potrebbe portare all'identificazione di singole caratteristiche definite "predittori di virulenza" associate ai ceppi VTEC che causano le forme più gravi di malattia nell'uomo.

Risultati attesi nel triennio

Ad oggi non sono disponibili metodi standardizzati in grado di rilevare tutti i sierogruppi VTEC patogeni per l'uomo. Per i VTEC O157 è disponibile uno standard internazionale, tuttavia questa metodica è stata sviluppata per le sole matrici alimentari e presenta lo svantaggio di dover procedere alla conferma nei ceppi isolati della presenza dei geni codificanti le verocitotossine. Per la ricerca degli altri VTEC sono stati descritti metodi molecolari che prevedono la rilevazione simultanea di numerosi target genici. Questi metodi sono generalmente complessi e richiedono l'isolamento del ceppo al fine di dimostrare che la positività ottenuta con il metodo molecolare sia causata da geni presenti simultaneamente in un'unica cellula batterica viva. Inoltre queste metodiche sono disponibili solo presso laboratori di riferimento e non sono eseguite di routine dai laboratori microbiologici ospedalieri o che eseguono il controllo ufficiale degli alimenti.

Il risultato principale di questo studio sarà l'identificazione di strutture genomiche associate alla virulenza e comuni a tutti i ceppi VTEC patogeni per l'uomo. Questo consentirà di comprendere le basi molecolari della virulenza dei VTEC e di definirne i meccanismi patogenetici. L'identificazione di predittori di virulenza è il primo passo verso lo sviluppo di strumenti diagnostici e di controllo destinati agli operatori dell'industria alimentare e agli operatori sanitari coinvolti nella gestione delle infezioni da VTEC.

Trasferibilità dei risultati

La definizione del corredo genico di virulenza dei VTEC costituisce la base per l'implementazione di misure di intervento finalizzate alla prevenzione e alla gestione delle infezioni umane attraverso lo sviluppo di metodi basati sulla ricerca dei predittori di virulenza e l'esecuzione di studi di microbiologia predittiva per la definizione dei profili di rischio associati alle diverse filiere produttive. Tale approccio è indispensabile per la definizione dei criteri microbiologici per la sicurezza alimentare e per il controllo della filiera produttiva degli alimenti di origine animale.

Lo sviluppo di protocolli per la ricerca dei VTEC patogeni per l'uomo in campioni alimentari porterà alla produzione di metodi destinati agli operatori del settore alimentare e ai laboratori preposti al controllo ufficiale degli alimenti.

Individuazione e misura di biomarcatori di esposizione da micotossine

Lo studio degli effetti sulla salute umana e animale associati alle micotossine è tradizionalmente legata alla valutazione dell'esposizione con la dieta che viene classicamente stimata combinando i livelli di contaminazione degli alimenti, fonte primaria di esposizione alle

micotossine, con i dati di consumo. Tuttavia le variazioni regionali nella preparazione degli alimenti, la disparità dei dati d'assunzione, i dati di tossicocinetica (assorbimento intestinale, distribuzione ed escrezione) non sono considerati nello studio classico dell'esposizione con la dieta mentre tali considerazioni sulla suscettibilità e sulle variazioni individuali all'esposizione sono richieste sia nella valutazione dell'impatto delle micotossine sulla salute che nella valutazione dell'efficacia delle strategie di intervento nella politica sanitaria.

L'individuazione e la misura di specifici biomarcatori d'esposizione, pertanto, avranno la finalità di rispecchiare il reale livello d'esposizione degli individui tenendo conto delle variazioni dei livelli di contaminazione degli alimenti, consumi, composizione della dieta, tecniche di preparazione degli alimenti superando gli annosi problemi di campionamento e accuratezza del dato. A tal fine verrà sviluppata e validata una metodica per l'individuazione e la misura di biomarcatori d'esposizione per le principali micotossine con le tecniche LC-MS/MS, per la produzione di dati necessari per portare a termine un'efficace valutazione dell'esposizione.

Risultati attesi nel triennio

L'uso di biomarcatori d'esposizione nell'epidemiologia molecolare identificherà ed eluciderà gli stadi dello sviluppo degli effetti delle micotossine sulla salute. Le informazioni prodotte avranno ricadute non solo nella conoscenza dell'entità dell'esposizione della popolazione italiana alle micotossine, nella politica della prevenzione sanitaria e nell'indagine clinica, ma anche in ambito legislativo.

Sul modello dei biomarcatori delle aflatoxine, per le quali dalla modificazione biochimica dell'AFB1 assunta con la dieta si è arrivati alla definizione di certo numero di biomarcatori per questa importante micotossina cancerogena, si definirà una metodologia per la caratterizzazione e individuazione di potenziali biomarcatori per le principali micotossine (ocratossina A, zearalenone, fumonisine, deossinivalenolo, T2 e HT2) con tecniche di spettroscopia di massa combinate con la cromatografia liquida.

Il progetto ha lo scopo di mettere a punto una metodica per l'individuazione di biomarcatori d'esposizione per le principali micotossine con tecniche LC-MS/MS quale strumento per produrre dati nell'epidemiologia molecolare.

L'obiettivo è quello di minimizzare il rischio associato con le micotossine e arrivare ad eradicare il loro impatto sulla salute umana e animale, affiancando alla politica di sorveglianza stabilita dalle disposizioni di controllo della legislazione europea, il monitoraggio sia della presenza delle tossine negli alimenti che dell'incidenza dei biomarcatori.

Trasferibilità dei risultati

È riconosciuto dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) che le micotossine sono dotate di elevata tossicità per l'uomo e per gli animali con caratteristiche di genotossicità, cancerogenicità, immunotossicità, mutagenicità, nefrotossicità e teratogenicità; molti studi associano le micotossine con l'incidenza di un esteso numero di malattie ad effetto acuto e cronico: le aflatoxine sono il maggiore fattore di rischio per il carcinoma epatocellulare; le fumonisine sono state associate con una elevata incidenza di cancro all'esofago, l'ocratossina è stata correlata con la nefropatia endemica dei Balcani.

L'approccio sistematico proposto per la valutazione dell'esposizione dovrebbe integrarsi nella politica di valutazione del rischio e quindi di prevenzione, fornendo i dati necessari per lo sviluppo, validazione e applicazione di un modello che identifichi specifici biomarcatori non solo del cancro ma di tutte le altre patologie croniche correlate con le micotossine.

Infezioni da *Escherichia coli* produttori di verocitotossina (VTEC): le attività del Laboratorio Comunitario e Nazionale di riferimento

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 Dipartimento è impegnato da tempo nell'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. Nel 2006, il Dipartimento è stato designato dal Ministero della Salute quale Laboratorio Nazionale di Riferimento per le infezioni da *E. coli* e dalla Commissione Europea quale *Community Reference Laboratory (CRL) for E. coli, including Verotoxigenic E. coli (VTEC)*. Le attività dei Laboratori di Riferimento continueranno nel triennio 2009-11 e includeranno:

- il coordinamento delle attività dei Laboratori Nazionali di Riferimento degli Stati membri della UE e, a livello nazionale, dei laboratori responsabili del controllo ufficiale degli alimenti (Ist. Zooprofilattici Sperimentali);
- 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 stipiti 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 dei Laboratori Nazionali di Riferimento 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'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA).

Simili risultati potranno essere ottenuti anche a livello nazionale, migliorando la capacità dei laboratori degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali 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'*European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)* per le infezioni da VTEC.

Trasferibilità dei risultati

Sia a livello comunitario che nazionale si otterrà il miglioramento delle capacità dei Laboratori Nazionali di Riferimento 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.

Integratori alimentari a base di piante: livelli di assunzione, valutazione del rischio e del beneficio (PlantLIBRA)

Nell'Unione Europea 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 botanicals*. In quest'ambito l'ISS è responsabile di un *workpackage* che provvederà a supportare con dati sperimentali un meta-database di composti biologicamente attivi identificandoli, caratterizzandoli e studiandone l'attività fisiologica. 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.

Interazione di composti polifenolici con meccanismi molecolari regolatori coinvolti nella patogenesi del danno aterosclerotico

La ritenzione sub-endoteliale di lipoproteine a bassa densità (LDL) è ritenuta l'evento iniziale nella formazione della placca aterosclerotica. Le LDL intrappolate nella parete vasale sono progressivamente ossidate dai macrofagi che poi le internalizzano tramite recettori *scavenger* non soggetti a regolazione. Ciò determina l'accumulo intracellulare di lipidi e la trasformazione dei macrofagi in *foam cell*. La progressione della placca e i conseguenti processi degenerativi coinvolgono sia la secrezione di fattori infiammatori, chemiotattici e citochine, che fenomeni proliferativi e/o apoptotici a carico di tutte le cellule della parete vasale. Negli stadi più avanzati del processo degenerativo, il 50% delle cellule apoptotiche è rappresentato da macrofagi, e ciò causa espansione e instabilità della placca. I meccanismi molecolari responsabili del processo apoptotico nelle cellule macrofagiche sono però ancora da chiarire. Studi epidemiologici evidenziano che il consumo di composti polifenolici con la dieta è associato ad un ridotto rischio di aterosclerosi e malattia cardiovascolare. Obiettivi principali del progetto sono: i) identificare i meccanismi molecolari coinvolti nel processo apoptotico indotto da LDL ossidate in linee macrofagiche murine stabilizzate e in cellule umane primarie, e ii) definire le potenzialità di specifici polifenoli nel contrastare gli eventi molecolari e cellulari coinvolti nella patogenesi della lesione vasale.

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: i) della risposta cellulare all'azione delle LDL ossidate, individuando i meccanismi molecolari responsabili di stress ossidativo e

dell'induzione di apoptosi e le principali chinasi coinvolte nella trasmissione del segnale; ii) degli effetti di polifenoli sull'attivazione dei sistemi intracellulari di difesa antiossidante, come il sistema ARE–Nrf2, responsabili dell'induzione di enzimi di fase II, e sull'attivazione di fattori di trascrizione, coinvolti nell'induzione di apoptosi. Ciò permetterà di individuare i meccanismi d'azione specifici con i quali, da un lato, le LDL ossidate sono coinvolte nella patogenesi della lesione vasale, dall'altro, i composti polifenolici contrastano l'induzione di apoptosi e la conseguente evoluzione degenerativa della placca aterosclerotica.

Trasferibilità dei risultati

La migliore comprensione degli eventi cellulari e molecolari che portano al danno cellulare coinvolto nella lesione vasale responsabile del processo aterosclerotico, permetterà di individuare nuovi possibili target verso cui indirizzare interventi terapeutici. In particolare, la definizione degli effetti esercitati da polifenoli sull'attivazione/inibizione di fattori intracellulari coinvolti nel danno apoptotico, e sull'attivazione di sistemi endogeni di difesa offrirà un supporto conoscitivo utile alla definizione di strategie di prevenzione basate su interventi dietetici mirati, nonché di interventi sperimentali terapeutici basati sull'uso di specifici nutrienti funzionali.

Italian network for the molecular EPIdemiological surveillance of FOOD-borne pathogens (acronym: EPIFOOD)

In accordo con i principi enunciati dai Regolamenti Comunitari volti ad assicurare che ai cittadini della UE siano garantiti gli standard più elevati possibili di sicurezza alimentare, appare prioritario che ogni Stato membro persegua una politica efficace a tutela della salute dei consumatori. Tale garanzia, può essere assicurata soltanto attraverso l'analisi del rischio. Tipicamente l'analisi del rischio viene divisa in tre parti strutturalmente separate ma interdipendenti: la valutazione, la gestione e la comunicazione del rischio. La valutazione del rischio si basa su elementi scientifici obiettivi e trasparenti e ha come fine l'individuazione della probabilità che i pericoli presenti lungo tutta la filiera produttiva possano causare danno al consumatore. Inoltre il regolamento europeo 178/2002 sottolinea la necessità di avere un sistema atto alla rintracciabilità degli alimenti. La mancanza di informazioni riguardo ai livelli di contaminazione nei vari alimenti circolanti in un Paese è la principale carenza non solo del "sistema italiano" ma anche di quello comunitario. Queste informazioni dovrebbero essere utilizzate non solo per individuare gli alimenti potenzialmente contaminati, ma soprattutto di capire le cause della contaminazione. Solo la condivisione di metodi analitici validati utilizzabili dai vari laboratori periferici dell'SSN, potrà permettere l'aggregazione di dati provenienti da fonti diverse.

Risultati attesi nel triennio

I principali risultati del progetto possono essere riassunti nei seguenti punti:

- Validazione di metodiche innovative obiettivo primario è la validazione delle metodiche *Real Time* PCR commerciali o *open* formula. I metodi di analisi innovativi prenderanno in considerazione con particolare attenzione la *Salmonella spp* e la *Listeria monocytogenes*.
- Armonizzazione delle metodiche: saranno oggetto di piani di armonizzazione sia i metodi analitici che tutte le procedure necessarie per la preparazione dei campioni.
- Caratterizzazione dei ceppi *Una multiplex* PCR per l'identificazione dei differenti sierotipi di *Listeria monocytogenes* verrà sviluppata. I ceppi isolati durante il progetto saranno caratterizzati dagli IZS partecipanti utilizzando tale metodo.

Trasferibilità dei risultati

L'obiettivo principale del progetto è quello di attivare una rete di cooperazione tra le diverse strutture (IZS e ISS) coinvolte nella valutazione dei rischi microbiologici. Questa rete integrata sarà creata sulla base di procedure comuni di isolamento e di rilevamento. Queste informazioni saranno uno strumento importante per monitorare i microrganismi negli alimenti catena, e per rintracciare i comportamenti dei microrganismi negli alimenti e nell'ambiente. La disponibilità di metodi di biologia molecolare alternativi ai metodi classici permetterà la riduzione dei costi destinati dagli IZS al controllo ufficiale. Tutte le informazioni relative ai livelli di contaminazione degli alimenti analizzati saranno inserite in un database disponibile a tutte le strutture dell'SSN.

L'acido grasso eicosapentaenoico (C20:5 n-3) nelle prevenzione e modulazione di patologie demielinizzanti

Un possibile attraente approccio terapeutico per le malattie demielinizzanti potrebbe essere quello di stimolare il processo di rimielinizzazione identificando fattori coinvolti nel processo di differenziazione degli oligodendrociti. Un nostro precedente studio ha dimostrato che l'acido eicosapentaenoico (EPA), uno dei principali componenti dell'olio di pesce, stimola l'espressione dei geni della mielina modulando il differenziamento degli oligodendrociti. Altri autori hanno anche dimostrato che l'EPA inibisce la fosfolipasi A2, enzima coinvolto nei processi infiammatori e altamente espresso nelle lesioni demielinizzanti dell'encefalite allergica (EAE), modello sperimentale della sclerosi multipla (SM). Un miglioramento del decorso clinico della SM è stato osservato in pazienti trattati con olio di pesce subito dopo la diagnosi della patologia. Attualmente non sono disponibili informazioni sul ruolo dell'EPA nella modulazione della mielinogenesi e delle malattie demielinizzanti. Al fine di studiare l'effetto dell'EPA sul processo di riparo della mielina, si eseguiranno esperimenti in ratti Dark-Agouti in cui è stata indotta l'EAE. Gli animali saranno sacrificati a differenti tempi di trattamento e fasi della malattia. L'effetto terapeutico dell'EPA sarà valutato seguendo il decorso clinico della malattia e determinano con analisi biochimiche ed immunoistochimiche, nel sistema nervoso centrale, il processo di rimielinizzazione e la risposta pro- e anti-infiammatoria.

Tali studi dovrebbero contribuire ad identificare nuove terapie per le malattie demielinizzanti e identificare molecole nutrizionali in grado di modulare e/o prevenire patologie cronico-degenerative.

Risultati attesi nel triennio

- Individuazione di nutrienti in grado di modulare e/o prevenire patologie neurologiche.
- Identificazione di mediatori cellulari e/o nucleari, attivati dall'acido eicosapentaenoico e coinvolti nel programma di differenziazione delle cellule della glia e nella modulazione genica delle proteine della mielina.
- Valutazione in modelli sperimentali di demielinizzazione della potenzialità dell'acido eicosapentaenoico di innescare il processo di rimielinizzazione.

Trasferibilità dei risultati

- Potenziali e alternativi interventi terapeutici per il trattamento della Sclerosi Multipla.
- I risultati finali saranno compendati in pubblicazioni internazionali e trasferiti all'SSN.

La qualità del dato analitico

Le micotossine sono contaminanti frequentemente riscontrabili in un gran numero di matrici alimentari e in grado di esercitare effetti a lungo, medio e breve termine sull'uomo e sugli animali. Di conseguenza risulta prioritario disporre a livello nazionale della valutazione del rischio da micotossine e individuare e studiare biomarcatori di esposizione, sia nell'uomo sia

negli animali. Tali tipologie di studio non prescindono dall'esigenza di disporre di dati analitici/scientifici ottenuti con criteri di affidabilità e completezza, cioè adeguati allo scopo per cui saranno utilizzati. Strumento chiave in questo contesto può essere la "Qualità" intesa come disciplina flessibile che permette l'assicurazione della qualità analitica (incertezza, *bias*) e della sua gestione (controllo di qualità, materiali di riferimento, standardizzazioni, valori di riferimento).

Per supportare gli studi di esposizione e di valutazione del rischio per le micotossine, il presente piano di ricerca si propone di sviluppare e validare alcuni metodi analitici, utilizzando tecniche strumentali sia di screening (HPLC, ELISA, *microarray*) sia di conferma (LC-MS/MS), assicurando che il laboratorio operi in conformità alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005.

Risultati attesi nel triennio

L'attività sarà finalizzata alla messa a punto e alla validazione di metodi analitici. Nello specifico, saranno sviluppati metodi multimicotossina sia con tecniche di screening sia di conferma in matrici alimentari, soprattutto cereali, che verranno poi validati secondo le procedure interne del Reparto.

Riguardo la determinazione di biomarcatori di esposizione da micotossine, si svilupperanno e valideranno metodi LC-MS/MS in matrici biologiche.

Trasferibilità dei risultati

I dati scientifici prodotti possono essere utilizzati in ambito multidisciplinare (chimico, tossicologico, medico, politico) per l'analisi del rischio da micotossina, soprattutto nelle sue fasi finali, cioè per la gestione e per la comunicazione del rischio.

I metodi analitici studiati possono essere utilizzati per costruire una raccolta di metodi armonizzati da poter condividere con laboratori che effettuano sorveglianza sanitaria in modo da costruire una rete con cui interagire e confrontarsi in un processo iterativo che possa migliorare la qualità dei dati scientifici utili per l'analisi del rischio.

Le nanotecnologie applicate alla sicurezza degli alimenti

Le nanotecnologie stanno ricevendo una sempre maggiore attenzione grazie alla loro versatilità e utilizzo in differenti campi; in particolare, l'uso di queste tecnologie nel settore della sicurezza alimentare, per la rivelazione di contaminanti biologici e chimici, consentirebbe la loro determinazione in tempo reale e potrebbe implementare i sistemi diagnostici già in uso aumentandone la sensibilità e il limite minimo di rilevabilità.

Gli obiettivi del programma di ricerca sono finalizzati a sviluppare metodi di analisi rapidi, specifici, sensibili e affidabili, per individuare i contaminanti biologici presenti negli alimenti, con approcci integrati basati su materiali nanostrutturati. La ricerca si focalizzerà su differenti matrici alimentari, con particolare riferimento a quelle riportate nel Regolamento 2073/2005 CE. I microrganismi patogeni considerati nel presente studio sono *Salmonella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus* e sue tossine. In particolare, *S. aureus* oltre a produrre una grande varietà di tossine è in grado di provocare la mastite nei bovini da latte, provocando una malattia con un notevole impatto economico per l'industria lattiero-casearia. Inizialmente verrà considerato l'uso di nanoparticelle per la concentrazione di *Salmonella*, *Campylobacter*, *S. aureus* e delle tossine stafilococciche in campioni standard di riferimento, quindi si procederà all'applicazione di queste nuove tecnologie in campioni alimentari sperimentalmente e naturalmente contaminati.

Risultati attesi nel triennio

- Utilizzo delle nanoparticelle per concentrare *Salmonella*, *Campylobacter*, *S. aureus* e sue tossine in matrici alimentari complesse.

- Valutazione dell'immobilizzazione di anticorpi specifici sulle nanoparticelle.
- Sviluppo di immunosensori elettrochimici, basati su anticorpi specifici in grado di riconoscere e reagire selettivamente con le sostanze selezionate, qualora queste siano presenti nell'alimento.
- Sviluppo di un sistema *Enzyme-Linked-Immuno-Electrochemical-array*, per il monitoraggio delle tossine stafilococciche.
- Utilizzo di enzimi marcatori quali Fosfatasi Alcalina, Perossidasi e Glucosio Ossidasi i cui prodotti di reazione possono essere misurati tramite tecniche di misura elettrochimica rapide e sensibili, come la voltammetria differenziale ad impulsi e la voltammetria ad onda quadra.
- Sviluppo di metodiche di PCR *real time* per la determinazione di *Salmonella*, *Campylobacter* e *S. aureus*.
- Messa a punto di un Controllo di Amplificazione, da utilizzare nelle metodiche molecolari sviluppate, per poter monitorare eventuali campioni falsamente negativi.
- Validazione *in house* di tali metodiche mediante confronto con i metodi normati, in accordo con la EN/ISO 16140.

Trasferibilità dei risultati

- Tali sistemi integrati confrontati e validati con i metodi standard di riferimento, saranno utilizzabili come metodi di screening sia nell'ambito del controllo ufficiale che nei piani di autocontrollo.
- Utilizzo di tali sistemi analitici, altamente sensibili e rapidi, direttamente sulle linee produttive, allo scopo di analizzare in tempo reale lo stato di contaminazione delle derrate alimentari.
- Definire e individuare, attraverso lo studio della filiera produttiva, i punti critici di controllo da monitorare nei piani HACCP.
- Incrementare le conoscenze sulle caratteristiche igienico-sanitarie delle categorie alimentari considerate.
- Possibilità di attuare misure tempestive riguardanti il rilascio di lotti di prodotto o la possibilità del loro ritiro dal commercio, contribuendo così all'aumento della sicurezza e della fiducia del consumatore.

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 attuali 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 sottoposto all'approvazione del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, 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 dei kit commerciali maggiormente utilizzati per la ricerca negli alimenti delle proteine del latte e dell'uovo.
- Valutazione *in house* delle performance dei diversi kit selezionati (specificità, limite di rivelabilità e quantificazione, precisione, accuratezza) applicando i protocolli analitici a materiali di riferimento opportunamente caratterizzati, a materie prime e a matrici alimentari complesse.
- Selezione dei metodi più affidabili sulla base dei dati raccolti.
- Validazione dei protocolli operativi individuati 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 condivise 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.

Modelli di studio per contaminanti della catena alimentare ad azione endocrino-metabolica durante lo sviluppo pre- e postnatale: meccanismi di azione e biomarcatori di effetti a lungo termine

Sviluppo di studi integrati *in vivo/in vitro* per valutare gli effetti, con relativi meccanismi e biomarker, durante lo sviluppo pre- e/o postnatale di interferenti endocrini (IE, <http://www.iss.it>) presenti come contaminanti ubiquitari nella catena alimentare (alimenti e mangimi).

Vengono indagati tre gruppi prioritari di IE: ftalati, ritardanti di fiamma bromurati e pesticidi con azione di IE (ad es., etilene bisditiocarbammati).

Lo studio darà specifica attenzione ad effetti: i) mediati dall'interazione con i recettori nucleari androgeno(AR), estrogeni (ER α e β) nonché con i PPAR, coinvolti nel metabolismo di glucidi e lipidi; ii) a carico dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide-gonadi e potenziali riflessi sul sistema riproduttivo maschile e femminile.

Tali effetti verranno studiati mediante:

- sviluppo di un modello animale di esposizione nella fase peripuberale, *focus* di suscettibilità per gli effetti metabolici indotti da IE;
- follow-up a lungo termine di esposizione prenatale durante lo sviluppo dei tessuti bersaglio (fegato, gonadi, tiroide);
- test *in vitro* con linee cellulari umane diverse per l'espressione di ER e AR, con particolare attenzione alla batteria di linee di prostata utilizzata nel progetto europeo ReProTect (www.reprotect.eu).

Gli effetti sullo sviluppo di tessuti bersaglio verranno valutati integrando analisi istopatologiche, immunoistochimiche e biochimiche. Specifico rilievo negli studi *in vitro/in vivo* 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.

Risultati attesi nel triennio

I risultati del progetto consentiranno di valutare gli effetti dell'esposizione precoce a IE sull'insorgenza di alterazioni a lungo termine a livello morfologico, funzionale e/o cellulare nei tessuti bersaglio. Gli studi *in vitro* chiariranno meccanismi e forniranno possibili *biomarker* degli effetti osservati *in vivo* e serviranno, inoltre, per valutare eventuali effetti additivi di esposizioni a sostanze multiple ("effetto cocktail") sui *marker* più sensibili.

Particolare attenzione verrà data a *marker* precoci, a livello tissutale, biochimico e molecolare, dell'esposizione pre- e postatale a IE sul metabolismo dei lipidi/glucidi, degli steroidi sessuali e degli ormoni tiroidei e sul loro potenziale ruolo in patologie riproduttive ed endocrino-metaboliche dell'età evolutiva e/o dell'adulto.

Inoltre, il progetto consentirà la messa a punto di sistemi sperimentali per la valutazione tossicologica di IE, in particolare: i) il modello di esposizione peripuberale per valutare effetti specifici sulla crescita e la pubertà dell'esposizione a IE durante l'infanzia, utilizzando parametri relativi alla maturazione dei sistemi bersaglio (scheletrico, riproduttivo, neuroendocrino, immunitario); ii) lo sviluppo di strategie di tossicogenomica per la caratterizzazione IE, utilizzando linee cellulari con diversa espressione di recettori nucleari e il *phenotypic anchoring* con marcatori sia generali di *status* cellulare (progressione del ciclo cellulare, apoptosi ecc.) sia specifici (es. PSA e secrezione di Zn per le colture di prostata) di differenziazione e maturazione funzionale.

Trasferibilità dei risultati

- Sviluppo di strategie integrate *in vitro/in vivo* e utilizzo della tossicogenomica per la valutazione tossicologica di IE contaminanti della catena alimentare;
- incremento di conoscenze sui potenziali rischi a lungo termine per la salute associati all'esposizione a contaminanti della catena alimentare;
- contributo alla valutazione del ruolo della esposizione precoce a IE quale fattore di rischio per patologie di forte impatto sull'SSN come i disturbi della crescita e pubertà, della riproduzione maschile e femminile, tiroidei e metabolici;
- caratterizzazione di possibili biomarcatori di effetto predittivi (alterazioni a livello bio-molecolare e loro correlazione con danno tissutale), utilizzabili nelle attività di prevenzione e sorveglianza sanitaria dell'esposizione alimentare a IE;
- evidenze scientifiche per elaborare linee guida per la prevenzione primaria durante l'età evolutiva.

Modelli di studio per contaminanti della catena alimentare ad azione endocrino-metabolica durante lo sviluppo pre- e post-natale: meccanismi di azione e biomarcatori di effetti a lungo termine

Sviluppo di studi integrati *in vivo/in vitro* per valutare gli effetti, con relativi meccanismi e *biomarker*, durante lo sviluppo pre- e/o post-natale di interferenti endocrini (IE, <http://www.iss.it>) presenti come contaminanti ubiquitari nella catena alimentare (alimenti e mangimi).

Vengono indagati tre gruppi prioritari di IE: ftalati, ritardanti di fiamma bromurati e pesticidi con azione di IE (ad es., etilene bisditiocarbammati).

Lo studio darà specifica attenzione ad effetti: i) mediati dall'interazione con i recettori nucleari androgeno(AR), estrogeni (ERalfa ed ERbeta) nonché con i PPAR, coinvolti nel metabolismo di glucidi e lipidi; ii) a carico dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide-gonadi e potenziali riflessi sul sistema riproduttivo maschile e femminile.

Tali effetti verranno studiati mediante:

- sviluppo di un modello animale di esposizione nella fase peripuberale, *focus* di suscettibilità per gli effetti metabolici indotti da IE;
- follow-up a lungo termine di esposizione prenatale durante lo sviluppo dei tessuti bersaglio (fegato, gonadi, tiroide);
- test *in vitro* con linee cellulari umane diverse per l'espressione di ER e AR, con particolare attenzione alla batteria di linee di prostata utilizzata nel progetto europeo ReProTect (www.reprotect.eu).

Gli effetti sullo sviluppo di tessuti bersaglio verranno valutati integrando analisi istopatologiche, immunoistochimiche e biochimiche. Specifico rilievo negli studi *in vitro/in vivo* 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.

Risultati attesi nel triennio

I risultati del progetto consentiranno di valutare gli effetti dell'esposizione precoce a IE sull'insorgenza di alterazioni a lungo termine a livello morfologico, funzionale e/o cellulare nei tessuti bersaglio. Gli studi *in vitro* chiariranno meccanismi e forniranno possibili *biomarker* degli effetti osservati *in vivo* e serviranno, inoltre, per valutare eventuali effetti additivi di esposizioni a sostanze multiple ("effetto cocktail") sui *marker* più sensibili.

Particolare attenzione verrà data a *marker* precoci, a livello tissutale, biochimico e molecolare, dell'esposizione pre- e post-natale a IE sul metabolismo dei lipidi/glucidi, degli steroidi sessuali e degli ormoni tiroidei e sul loro potenziale ruolo in patologie riproduttive ed endocrino-metaboliche dell'età evolutiva e/o dell'adulto.

Inoltre, il progetto consentirà la messa a punto di sistemi sperimentali per la valutazione tossicologica di IE, in particolare: i) il modello di esposizione peripuberale per valutare effetti specifici sulla crescita e la pubertà dell'esposizione a IE durante l'infanzia, utilizzando parametri relativi alla maturazione dei sistemi bersaglio (scheletrico, riproduttivo, neuroendocrino, immunitario); ii) lo sviluppo di strategie di tossicogenomica per la caratterizzazione IE, utilizzando linee cellulari con diversa espressione di recettori nucleari e il *phenotypic anchoring* con marcatori sia generali di *status* cellulare (progressione del ciclo cellulare, apoptosi, ecc.) sia specifici (es. PSA e secrezione di Zn per le colture di prostata) di differenziazione e maturazione funzionale.

Trasferibilità dei risultati

- Sviluppo di strategie integrate *in vitro/in vivo* e utilizzo della tossicogenomica per la valutazione tossicologica di IE contaminanti della catena alimentare.
- Incremento di conoscenze sui potenziali rischi a lungo termine per la salute associati all'esposizione a contaminanti della catena alimentare.
- Contributo alla valutazione del ruolo della esposizione precoce a IE quale fattore di rischio per patologie di forte impatto sull'SSN come i disturbi della crescita e pubertà, della riproduzione maschile e femminile, tiroidei e metabolici.
- Caratterizzazione di possibili biomarcatori di effetto predittivi (alterazioni a livello biomolecolare e loro correlazione con danno tissutale), utilizzabili nelle attività di prevenzione e sorveglianza sanitaria dell'esposizione alimentare a IE.

- Evidenze scientifiche per elaborare linee guida per la prevenzione primaria durante l'età evolutiva.

Obesità viscerale e insulino-resistenza: meccanismi molecolari e influenza della dieta

L'obesità, disturbo metabolico diffuso nei Paesi industrializzati, è un fattore di rischio per lo sviluppo di patologie quali diabete di tipo 2 e aterosclerosi, principali cause di morte in tutto il mondo. L'espansione del tessuto adiposo bianco (WAT) a livello viscerale, tipica dell'obesità è accompagnata da diminuite capacità antiossidanti, con aumento di LDL ossidate (oxLDL) e con alterata secrezione da parte del WAT di adipochine e citochine infiammatorie (adiponectina, leptina, resistina, visfatina, TNFalfa, IL-6) che contribuiscono allo sviluppo dell'insulino-resistenza (IR). Del complesso network regolatorio coinvolto nell'omeostasi del WAT, possono far parte sequenze non codificanti di RNA (miRNA) che modulano l'espressione genica. È dimostrato che i polifenoli possono contribuire a prevenire diverse patologie. In particolare, oltre a prevenire il danno ossidativo, possono modulare l'espressione genica e la trasduzione del segnale regolando a livello molecolare e cellulare specifici *pathway*. Il progetto si propone di identificare i meccanismi cellulari e molecolari coinvolti nell'insorgenza di IR in corso di obesità e/o diabete e il ruolo dei polifenoli nel contrastare lo stato subcronico di infiammazione. Una maggiore comprensione di tali aspetti potrebbe offrire nuove possibilità di applicazione dei composti fenolici per la prevenzione e/o terapia dell'obesità e delle sue complicanze.

Risultati attesi nel triennio

Scopo del lavoro è quello di: i) identificare a livello cellulare e molecolare i meccanismi coinvolti nell'insorgenza di insulino-resistenza nell'obesità; ii) definire la capacità di composti fenolici, *in vitro*, di modulare infiammazione e/o insulino-resistenza associate ad obesità. Il progetto è articolato in due parti: i) identificazione, in adipociti umani isolati da biopsie di grasso viscerale di adulti a diverso grado di adiposità $29 < \text{BMI} < 35 \text{ Kg/m}^2$ (sottoposti a chirurgia per patologie benigne), di possibili differenze nel profilo trascrizionale di miRNA, di specifici *pathway* coinvolti nell'insorgenza di insulino-resistenza e diabete di tipo 2; ii) definizione della capacità di polifenoli di contrastare le alterazioni dell'espressione genica, del profilo di miRNA, dell'attività secretoria e della sensibilità insulinica osservati in adipociti umani in funzione dell'adiposità.

Trasferibilità dei risultati

È da sottolineare l'aspetto innovativo dell'utilizzo di un modello di adipociti umani isolati dal comparto viscerale, il più coinvolto nel determinare l'insorgenza di insulino-resistenza e delle complicanze legate a obesità, nell'analisi di aspetti biochimico-molecolari dell'obesità. Le nuove conoscenze generate dal progetto saranno trasferibili a medio e lungo termine in applicazioni cliniche, offrendo al Sistema Sanitario Nazionale indicazioni per interventi dietetici e farmacologici; target molecolari per nuove terapie; *marker* per il monitoraggio di rischio e progressione della malattia. È importante sottolineare che l'interesse per la promozione della salute da parte di componenti funzionali degli alimenti va aumentando, pertanto i dati ottenuti *in vitro* dalla ricerca di base potrebbero essere traslati per essere confermati da studi di intervento, i soli a poter fornire indicazioni sulla reale efficacia di alcuni alimenti.

Produzione di anticorpi monoclonali diretti contro fattori di adesione di Escherichia coli O157 produttore di verocitotossina (VTEC O157)

I ceppi VTEC O157 possono provocare malattia grave nell'uomo e rappresentano un serio problema di sanità pubblica. Tali patogeni hanno un'origine zoonotica e il serbatoio naturale è

rappresentato dal tratto gastrointestinale dei ruminanti. Gli animali colonizzati eliminano VTEC O157 con le feci rappresentando la fonte di contaminazione per gli alimenti e per l'ambiente che rappresentano i principali veicoli per la trasmissione delle infezioni all'uomo. Pertanto, la riduzione di VTEC O157 negli allevamenti rappresenta la strategia più efficace per ridurre il rischio di infezione. Al fine di ridurre l'impatto sull'ecosistema e sulla diffusione di geni di antibiotico-resistenza, l'utilizzo di antimicrobici in zootecnia per la riduzione della colonizzazione intestinale da parte dei microrganismi patogeni è sconsigliabile ed è incoraggiato lo sviluppo di strategie alternative quali la vaccinazione, il trattamento con probiotici e la somministrazione di batteriofagi. Tuttavia gli studi condotti finora non hanno potuto dimostrare l'efficacia di questi approcci nella riduzione della colonizzazione dei bovini da VTEC O157.

La ricerca proposta è rivolta alla produzione di anticorpi monoclonali diretti contro fattori di adesione di VTEC O157 coinvolti alla valutazione della loro capacità di interferire col meccanismo di colonizzazione dell'ospite per lo sviluppo di strategie innovative per la riduzione della colonizzazione dei bovini in allevamento.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio sarà effettuato in fasi successive. Nella prima fase, saranno clonati ed espressi *in vitro* i geni codificanti fattori di adesione di VTEC O157 coinvolti nella colonizzazione del tratto gastrointestinale dell'ospite bovino. Nella seconda fase, i fattori ricombinanti saranno utilizzati per l'immunizzazione di topi BalbC per la produzione di anticorpi in grado di riconoscerli. Verrà quindi effettuata la produzione di ibridomi in grado di produrre anticorpi monoclonali (MAbs) diretti contro i fattori di interesse. Nell'ultima fase sarà valutata la capacità dei supernatanti di coltura degli ibridomi di interferire col meccanismo di adesione dei VTEC O157 ad un sistema *in vitro* costituito da monostrati di cellule Hep2 in coltura. Gli ibridomi che produrranno MAbs in grado di ridurre il livello di adesione dei VTEC O157 nel sistema *in vitro* saranno selezionati e clonati. L'identificazione di un pannello di MAbs in grado di interferire con l'adesione consentirà di comprendere le basi molecolari del processo di colonizzazione attraverso la mappatura degli epitopi esposti sulla superficie del batterio durante la fase di adesione *in vivo* all'enterocita.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questa ricerca miglioreranno la conoscenza dei meccanismi molecolari alla base del processo di colonizzazione del tratto gastrointestinale dei bovini da VTEC O157. Inoltre, il successo nell'identificazione di MAbs efficaci nella riduzione del potenziale di adesione dei ceppi VTEC O157 ai sistemi *in vitro* è propedeutico allo sviluppo di strategie funzionali alla riduzione della colonizzazione da VTEC O157 dei bovini in allevamento e la conseguente riduzione del rischio di esposizione dell'uomo ai veicoli di infezione.

MAbs in grado di interferire con l'adesione dei VTEC O157 potrebbero essere utilizzati per la produzione di probiotici modificati geneticamente in grado di esporre le loro catene ipervariabili sulla superficie. Questo porterebbe alla realizzazione di un prodotto facilmente somministrabile e in grado di stabilirsi nel tratto gastrointestinale del bovino che sia anche efficace nella riduzione della colonizzazione da VTEC O157.

Rare Diseases: Infant Botulism

Il progetto di ricerca "*Infant Botulism*" è stato finanziato nell'ambito dell'accordo di collaborazione Italia-USA sulle malattie rare con scadenza 31/12/2009. Tale progetto di ricerca è articolato in tre *work package* come di seguito indicato:

- WP1. Programma di educazione coordinato dal Centro Antiveneni di Pavia. Il WP ha lo scopo di sensibilizzare la classe medica alla formulazione del sospetto clinico di botulismo infantile, standardizzare le procedure terapeutiche.

- WP 2. Messa a punto di un metodo diagnostico rapido.
Questo WP coordinato dal Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo (CNRB), si prefigge l'obiettivo di mettere a punto e validare in house un metodo di *multiplex Real Time PCR* per la rapida conferma di laboratorio della malattia
- WP3. Coordinamento del progetto e realizzazione di un sito internet sul botulismo infantile.

Questo WP è coordinato dal CNRB ha lo scopo di inserire il botulismo nel Registro nazionale delle malattie rare, avviare e standardizzare le procedure per ottenere le immunoglobuline umane antitossine botuliniche tipo A e B, realizzare un sito web indirizzato alla classe medica, alle famiglie e agli operatori del Sistema Sanitario Nazionale al fine di disseminare la corretta informazione sulla malattia sugli aspetti di carattere epidemiologico, clinico, e terapeutico.

Risultati attesi nel triennio

Disseminare una corretta informazione sulla malattia che sia di facile accesso sia per gli addetti ai lavori che per le famiglie che sempre più spesso sono raggiunte da informazioni frammentarie.

Aumentare il sospetto diagnostico di botulismo infantile in lattanti che presentano sintomatologia caratteristica già nelle precoci fasi della malattia.

Disporre di un protocollo terapeutico standardizzato indirizzato ai clinici coinvolti nel management del botulismo infantile (pediatri, rianimatori, tossicologi, medici di base).

Inserire il botulismo infantile nel Registro nazionale delle malattie rare.

Disporre di un metodo analitico rapido, sensibile, affidabile e di facile esecuzione per la conferma di laboratorio.

Definire e standardizzare le procedure per l'acquisizione delle immunoglobuline umane anti tossine botuliniche tipo A e B dall'unico produttore e distributore mondiale: *Infant Botulism Treatment and Prevention Program (IBTPP)* in California.

Raccogliere ed elaborare tutte le informazioni di natura epidemiologica, clinica, terapeutica e microbiologica relative ai casi di botulismo infantile

Trasferibilità dei risultati

Le attività di cui al progetto permetteranno una più efficace diffusione delle informazioni sul botulismo infantile permettendo una più rapida e precoce diagnosi della malattia.

Ruolo epidemiologico della fauna selvatica nell'ecologia delle virosi trasmissibili all'uomo e agli animali domestici

Il commercio internazionale delle specie animali, l'aumento della popolazione umana e la riduzione dell'habitat selvatico hanno aumentato l'interfaccia ecologica tra specie selvatiche, potenziali serbatoi di patogeni, uomo e animali da allevamento.

Ad oggi gli studi sulle principali malattie trasmissibili della fauna selvatica omeoterma consentono l'acquisizione di dati sulla presenza e diffusione di alcune infezioni in specie aviarie e in mammiferi. In tale ambito è possibile distinguere patologie a rilevanza zoo-economica, reciprocamente trasmissibili tra fauna selvatica e domestica, che spesso esitano in gravi danni alle produzioni zootecniche e patologie a carattere zoonosico, con origine nella fauna selvatica e potenzialmente trasmissibili all'uomo; a queste ultime si aggiungono alcune patologie caratterizzate da impatto demografico sulle popolazioni animali, in grado di pregiudicare la conservazione delle specie in via di estinzione.

Tra le patologie indicate, quelle ad eziologia virale circolanti nel serbatoio selvatico rappresentano un argomento ad alta priorità, per il potenziale carattere zoonosico, per le perdite

economiche associate alla morbilità/mortalità negli allevamenti di animali domestici e i pericolosi effetti sulle popolazioni selvatiche e gli ecosistemi.

Lo studio sarà rivolto principalmente ad individuare specie animali che rappresentano un potenziale serbatoio di infezioni da coronavirus e a studiare i meccanismi evolutivi della trasmissione virale.

Risultati attesi nel triennio

La ricerca si propone di individuare animali selvatici che possono rappresentare serbatoio di coronavirus, in grado di infettare altre specie animali e di sviluppare sistemi diagnostici rapidi per la diagnosi e la tipizzazione. Verrà considerato lo sviluppo e standardizzazione di protocolli di RRT-PCR ad elevata sensibilità e specificità, per l'analisi di un numero elevato di campioni in tempi ridotti e il monitoraggio in tempo reale della reazione di amplificazione. Il sistema diagnostico verrà calibrato e ottimizzato in termini di specificità e sensibilità con un panel di virus di referenza e su campioni di campo prelevati da specie animali domestiche e selvatiche.

Trasferibilità dei risultati

Comprendere le associazioni tra ospite, agente infettivo e ambiente che portano all'emergenza, diffusione o incremento dell'incidenza delle infezioni.

Identificare le aree critiche per l'emergenza delle infezioni nel serbatoio selvatico, dove deve essere indirizzato l'aumento di controllo e prevenzione.

Aumentare la capacità di identificare e rispondere in maniera efficiente e rapida ai focolai di infezioni emergenti nelle specie selvatiche.

Selection and improving of fit-for-purpose sampling procedures for specific foods and risks (BASELINE)

Il Regolamento EC 178/2002 definisce che un fondamentale obiettivo della politica europea è quello di garantire un alto livello di sicurezza a tutti i cittadini dell'Unione. Questo livello di sicurezza deve essere raggiunto mediante l'analisi del rischio. La maggioranza delle analisi quantitative del rischio in campo microbiologico richieste dagli organi competenti hanno evidenziato un'impossibilità nell'utilizzo delle informazioni già disponibili dovuto alla mancanza di piani di campionamento così come l'assenza di metodi di analisi condivisi a livello europeo che spesso non consentono di poter disporre di dati che possano permettere di valutare le differenti strategie sanitarie dei singoli governi nazionali. Inoltre recentemente sono stati introdotti dal *Codex Alimentarius* nuovi concetti quali gli obiettivi di sicurezza alimentare (in inglese *Food Safety Objective* – FSO) o gli obiettivi di efficacia (*Performance Objective* – PO) che in parte modificano l'approccio metodologico alla sicurezza alimentare. Scopo principale del progetto è quello di cercare di armonizzare i piani di campionamento in campo microbiologico presenti nei differenti Paesi. Il progetto prenderà in considerazione differenti matrici alimentari quali i prodotti della pesca, gli ovoprodotti, le carni, i prodotti caseari e i prodotti vegetali.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi nel progetto dal WP diretto dall'ISS sono:

- Identificare i fattori di rischio e gli Obiettivi di Sicurezza alimentare in differenti matrici alimentari.
- Incrementare l'efficacia dei piani di campionamento e delle procedure di isolamento in relazione a parametri microbiologici.
- Validare metodi di determinazione basati di protocolli internazionali armonizzati in accordo alla norma internazionale ISO 16140.
- Armonizzare i piani di campionamento in accordo con i regolamenti europei 2073 e 1441 in relazione ai nuovi metodi sviluppati nel corso del progetto.

Trasferibilità dei risultati

Trasferimento di piani di campionamento, strategie armonizzate e protocolli sperimentali normalizzati e validati secondo standard internazionali, da utilizzare, nelle differenti filiere alimentari dai diversi Paesi europei per incrementare i dati necessari per la valutazione del rischio quantitativo sulle combinazioni rischio microbiologico/alimento definiti dal progetto.

Sistemi innovativi armonizzati per lo studio diagnostico ed epidemiologico di virus emergenti a trasmissione zoonotica e/o da vettori

Un numero crescente di virus degli animali appare essere in grado di causare malattia nell'uomo. In particolare il suino allevato o selvatico può trasmettere per via oro-fecale o alimentare virus dell'epatite E (HEV), ma anche Norovirus (NoV), Sapovirus (SaV), e Rotavirus (RV). La Direttiva CE sulle zoonosi del 2003 pone inoltre tra le cinque priorità di sorveglianza virologica per gli MS i virus trasmessi da vettori. Fattori climatici o legati alla globalizzazione hanno prodotto nell'ultimo decennio cambiamenti nell'epidemiologia di diverse malattie virali da vettori, incluse infezioni già considerate esotiche (Chik e WNF in Italia, e CCHF in Paesi vicini), la cui introduzione in Europa è resa possibile da modificazioni del virus, favorevoli l'adattamento a vettori e animali serbatoio autoctoni. Il progetto prevede lo sviluppo di sistemi innovativi (quali *Microarray*) per lo screening di patogeni virali enterici del suino con potenziale zoonotico, in particolare HEV geneticamente correlati tra uomo e suino, in campioni clinici umani e animali e matrici alimentari. Saranno sviluppati database di sequenza per RV, NoV, SaV, e HEV con dati della routine diagnostica del DSPVSA e sequenze di repertorio da database online. La ricerca svilupperà inoltre una piattaforma europea d'intervento virologico ed epidemiologico per le principali emergenze da arbovirus a trasmissione zoonotica, con particolare riguardo all'organizzazione e partecipazione a *Ring Trial*, workshop su WNFV, CCHFV e RVFV.

Risultati attesi nel triennio

Sviluppo di database di sequenza per RV, NoV, SaV, HEV. Identificazione delle sequenze target per la preparazione di vetrini *Microarray* (DNA/DNA) per la diagnosi e caratterizzazione in genogrupo e genotipo dei diversi virus. Sviluppo e validazione di Procedure Operative Standard (SOP) per l'analisi quantitativa di HEV in campioni clinici, matrici alimentari e campioni ambientali, in allevamenti, mattatoi e impianti di preparazione, e punti vendita lungo la filiera del suino. Generazione di dati quantitativi su presenza, riduzione e contaminazione virale nei punti diversi della filiera. Definizione di misure di controllo delle sorgenti di rischio. Identificazione di ceppi virali del suino con potenziale zoonotico. Sviluppo di una piattaforma innovativa per la diagnostica integrata virologica, batteriologica e parassitologica su campioni clinici di suino (feci, sangue) e matrici alimentari di origine animale, in collaborazione con l'IZSAM. Estensione delle capacità diagnostiche per virus CCHF, WNF, e RVF, attraverso la condivisione di tecniche *state-of-the-art* a livello europeo. Partecipazione a workshop, corsi e *ring trial* finalizzati alla validazione dei metodi diagnostici. Scambio di materiali di riferimento per lo sviluppo di piattaforme diagnostiche di laboratorio per arbovirus a trasmissione zoonotica. Messa a punto di network di laboratorio a livello nazionale ed europeo per l'intervento in situazioni di emergenza epidemica, in sinergia con altre componenti dell'SSN.

Trasferibilità dei risultati

I risultati del progetto saranno resi disponibili nell'ambito dell'SSN per la condivisione di metodiche diagnostiche e confermatorie di laboratorio e per la predisposizione di piani integrati di controllo delle emergenze infettive virali. Saranno sviluppati metodi analitici standard quantitativi per HEV. Saranno prodotti: *report* relativi all'identificazione delle fonti di contaminazione virale e dei punti di rischio nella filiera del suino; dati per la costruzione di una

piattaforma diagnostica di possibile impiego nell'ambito dell'SSN (IZS); dati sulla diffusione di virus enterici nel suino con potenziale zoonosico; protocolli diagnostici molecolari per l'impiego in campioni clinici animali e alimenti. Pubblicazione dei dati in riviste scientifiche e presentazioni a convegni.

Speciazione dell'arsenico negli alimenti. Arsenico inorganico. Metodi analitici. Livelli di presenza in prodotti di origine marina. Esposizione umana attraverso il consumo di prodotti di origine marina

La tossicità di alcuni elementi tossici come il piombo, il cadmio, il mercurio e l'arsenico è nota da tempo e numerosi sono gli studi condotti negli ultimi anni per valutarne l'esposizione umana attraverso gli alimenti.

La necessità di determinare tali elementi nelle diverse forme chimiche con cui sono presenti negli alimenti sta assumendo rilevanza crescente sotto l'aspetto sanitario a causa del differente grado di tossicità presentate da esse.

La speciazione dell'arsenico, con la forma inorganica cancerogena, rappresenta oggi uno dei problemi da affrontare con maggiore urgenza.

L'uomo è esposto all'arsenico principalmente attraverso l'acqua potabile e gli alimenti. Sotto l'aspetto sanitario l'arsenico nella sua forma inorganica rappresenta un problema rilevante per la sua accertata cancerogenicità. È presente principalmente nelle acque potabili di alcune aree geografiche per ragioni naturali. Il JECFA ha stabilito per l'arsenico inorganico una assunzione tollerabile provvisoria settimanale (PTWI) pari a 0,015 mg/kg di peso corporeo.

Le alghe sono da secoli un alimento tradizionale in Cina e India. Negli ultimi decenni nei Paesi occidentali è aumentato il consumo di alghe, soprattutto presso particolari tipologie di consumatori, grazie alle loro proprietà terapeutiche e come integratori alimentari. È noto tuttavia che le alghe contengono elevate quantità di arsenico, prevalentemente in forma organica. Nella maggior parte delle specie di alghe la forma chimica dell'arsenico principale è quella degli arseno-zuccheri. Questi composti non rappresentano un rischio particolare per l'uomo.

Maggiore preoccupazione destano alcune specie di alghe brune, come ad esempio la hijiki (*Hizikia fusiforme*), che possono presentare contenuti di arsenico fino a 100 mg/kg, di cui oltre l'80% nella forma di arsenico inorganico.

Attualmente non è disponibile una normativa comunitaria specifica per l'arsenico inorganico negli alimenti.

Questo studio si propone di:

- mettere a punto di metodi di analisi per l'arsenico inorganico;
- valutare la presenza di arsenico inorganico e di arsenico totale nei prodotti a base di alghe;
- valutare l'esposizione umana all'arsenico inorganico attraverso il consumo di prodotti a base di alghe.

La parte operativa prevede: i) campionatura di di alghe marine, di prodotti a base di alghe, di pesci allevati con mangimi a base di alghe e di mangimi a base di alghe; ii) determinazione di As totale e As inorganico, mediante le tecniche accoppiate di ICP/MS (As totale) e di HPLC/ICP/MS (As inorganico); iii) stima dell'esposizione umana ad As totale e As inorganico attraverso il consumo di prodotti a base di alghe e di pesci allevati con mangimi a base di alghe.

Risultati attesi nel triennio

- Messa a punto di metodi per l'analisi dell'arsenico inorganico in prodotti a base di alghe e pesci.
- Acquisizione di dati di presenza di arsenico inorganico in prodotti a base di alghe e di pesci allevati con mangimi a base di alghe.

- Stima della esposizione umana all'arsenico inorganico attraverso il consumo di prodotti a base di alghe e di pesci allevati con mangimi a base di alghe.

Trasferibilità dei risultati

I risultati raggiunti saranno trasferiti ai Gruppi di esperti *ad hoc* della Commissione Europea per l'eventuale definizione di limiti normativi UE per l'arsenico inorganico.

Speciazione del mercurio. Metilmercurio. Metodi analitici. Livelli di presenza in prodotti di origine ittica. Esposizione umana attraverso il consumo di prodotti di origine ittica

La tossicità di alcuni elementi tossici come il piombo, il cadmio, il mercurio e l'arsenico è nota da tempo e numerosi sono gli studi condotti negli ultimi anni per valutarne l'esposizione umana attraverso gli alimenti.

La necessità di determinare tali elementi nelle diverse forme chimiche con cui sono presenti negli alimenti sta assumendo rilevanza crescente sotto l'aspetto sanitario a causa del differente grado di tossicità presentate da esse.

La speciazione del mercurio, con la forma chimica del metilmercurio, rappresenta oggi uno dei problemi da affrontare con maggiore urgenza.

Il mercurio è presente nel pesce e nei prodotti della pesca principalmente sotto forma di metilmercurio.

I risultati dello SCOOP Task 3.2.11 sulla esposizione della popolazione europea a metalli pesanti tra cui il mercurio (2004), hanno evidenziato che per i bambini può esserci il rischio di superamento del PTWI per il metilmercurio attraverso il consumo di pesce.

Il JECFA ha stabilito per il metilmercurio un PTWI di 1.66 µg/kg peso corporeo, mentre per il mercurio il PTWI è pari a 5 µg/kg peso corporeo.

Nel 2004 l'EFSA, sulla base dei risultati dello SCOOP, ha confermato che alcune fasce di popolazione con forti consumi di pesci predatori possono superare il PTWI del metilmercurio e ha raccomandato nuovi studi focalizzati sulla esposizione al metilmercurio di donne in gravidanza e di bambini.

Il Reg. 1881/2006 ha stabilito per il mercurio il limite di 0,50 mg/kg per tutti i pesci, esclusi i pesci predatori, per i quali il limite è pari a 1,0 mg/kg. Il Reg 629/2008 ha confermato questi limiti relativi al mercurio.

Poiché è auspicabile che nei prossimi anni siano definiti limiti specifici di metilmercurio nei prodotti ittici, già presenti attualmente in altri Paesi tra i quali USA, risulta necessario uno studio per la messa a punto di metodologie analitiche semplici e rapide per la determinazione del metilmercurio, in particolare per quanto riguarda le fasi di estrazione, separazione e purificazione. Ciò al fine di fornire metodi rapidi e uniformi ai Laboratori preposti al Controllo Ufficiale.

Questo studio si propone di:

- mettere a punto di metodi per l'analisi per del metilmercurio nei prodotti ittici;
- valutare la presenza di mercurio e metilmercurio nei prodotti ittici;
- valutare l'esposizione umana al mercurio e al metilmercurio attraverso il consumo di prodotti ittici.

Risultati attesi nel triennio

- Messa a punto di metodi per l'analisi di metilmercurio nei prodotti ittici.
- Acquisizione di dati di presenza di metilmercurio e mercurio negli alimenti di origine ittica.
- Stima della esposizione umana al mercurio e metilmercurio attraverso il consumo di prodotti ittici.

Trasferibilità dei risultati

I risultati raggiunti saranno trasferiti ai Gruppi di esperti *ad hoc* della Commissione Europea per la eventuale definizione di limiti normativi UE per il metilmercurio nei prodotti ittici.

Studi di esposizione sulla popolazione italiana per le sostanze volontariamente aggiunte agli alimenti

Nell'ambito delle attività di valutazione del rischio correlata alla presenza di sostanze chimiche potenzialmente nocive negli alimenti l'elemento fondamentale è costituito dagli studi di esposizione della popolazione a sostanze volontariamente aggiunte durante la trasformazione alimentare. Nel corso degli ultimi anni si sono evidenziate notevoli difficoltà nell'individuazione di un percorso metodologico che garantisca, allo stesso tempo, affidabilità dei dati e adeguato livello di protezione dei consumatori. In particolare, l'ultimo programma quadro delle attività di ricerca europee (VII Programma UE) ha individuato nell'esposizione della popolazione agli additivi alimentari uno dei punti fondamentali su cui sviluppare la ricerca. In questo contesto, la normativa comunitaria prevede l'obbligo, per i Paesi membri, di effettuare, periodicamente, studi finalizzati a valutare l'esposizione della popolazione agli additivi, al fine di verificare l'opportunità di possibili revisioni della legge vigente. Saranno individuati secondo i criteri stabiliti dalla UE gli additivi più rilevanti sanitariamente e saranno calcolate le assunzioni analizzando campionature rappresentative e combinando i dati di presenza con i dati di consumo alimentare recentemente (2009) revisionati dall'INRAN. Sarà quindi possibile individuare aree di popolazione a rischio di superamento delle dosi tollerabili.

Risultati attesi nel triennio

- Conoscenza sui reali livelli di presenza negli alimenti degli additivi prioritari;
- Stima degli *intake* degli additivi prioritari per la popolazione generale e per segmenti vulnerabili;
- Metodi di analisi validati per il dosaggio di additivi negli alimenti.

Trasferibilità dei risultati

- Eventuali revisioni della normativa comunitaria a seguito di individuazione di aree di rischio;
- Trasferimento ai laboratori pubblici di metodi per il dosaggio di additivi validati 17025.

Studio degli agenti patogeni responsabili di infezioni batteriche a carattere zoonosico, oggetto di Profilassi di Stato negli animali di allevamento

La attività di studio e di ricerca riguarderanno principalmente tre aree, due delle quali (primi due punti) già svolte negli anni precedenti:

- Caratterizzazione molecolare dei ceppi di Brucella
La *brucellosis* è endemica nel sud-Italia dove un numero considerevole di casi umani si registrano ogni anno. La *Brucella melitensis* biotipo 3 è il ceppo più frequentemente isolato sia nell'uomo che negli animali, in particolare nei piccoli ruminanti. L'identificazione della specie e del biotipo sono di importanza cruciale nei programmi di sorveglianza/eradicazione della malattia. Scopo delle attività è quella della messa a punto del metodo di tipizzazione genotipica dei ceppi basato sull'analisi del polimorfismo MLVA-16.
- Sorveglianza epidemiologica della tubercolosi bovina (TB)
La percentuale di allevamenti infetti con tubercolosi nell'Italia meridionale e insulare è ancora elevata. La Sicilia è la regione che detiene il primato per la presenza della TB in campo animale. La presenza nell'area nebroidea di un sistema zootecnico caratterizzato

da allevamenti misti (bovini, ovini, caprini e suini) e di una ricca fauna selvatica (suino nero, cinghiale, volpe, furetto, ecc.), impone un approfondimento sul ruolo che queste specie domestiche e selvatiche possono avere nel mantenimento e nella trasmissione della tubercolosi. Scopo del monitoraggio sanitario sul territorio del parco è quello di valutare il ruolo del suino nero dei Nebrodi nella diffusione della tubercolosi nell'area protetta.

- Studio dell'attività antimicrobica dei probiotici nei confronti del patogeno Salmonella
I microrganismi probiotici stanno acquistando un'importanza sempre più rilevante nel campo nutrizionale umano e animale per i loro effetti benefici sulla salute attraverso la stimolazione delle funzioni immunitarie, digestive e respiratorie. Le attività riguarderanno lo studio del microbiota autoctono negli animali da allevamento, la selezione dei batteri lacto-acidi (LAB) e la valutazione del loro potenziale effetto antimicrobico nei confronti dei principali patogeni responsabile delle *food-borne disease*.

Risultati attesi nel triennio

- La messa a punto del metodo di tipizzazione genotipica dei ceppi basata sull'analisi del polimorfismo MLVA-16. I dati finora ottenuti evidenziano come questa metodica di tipizzazione sia un validissimo strumento epidemiologico per lo studio della malattia.
- Il monitoraggio sanitario per la valutazione del ruolo del suino nero dei Nebrodi nella diffusione della tubercolosi nell'area protetta. I dati ottenuti finora hanno permesso di identificare il suino nero dei Nebrodi come *spillover* o serbatoio della tubercolosi bovina.
- La valutazione del potenziale effetto antimicrobico di alcuni probiotici nei confronti dei principali patogeni responsabile delle *food-borne disease* attraverso saggi *in vitro* di inibizione della crescita e di invasività. I risultati finora ottenuti dimostrano una significativa attività antimicrobica dei probiotici *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. reuteri* e *Bacillus clausii* nei confronti della Salmonella.

Trasferibilità dei risultati

Le conoscenze acquisite permetteranno di migliorare e rafforzare le misure di sorveglianza epidemiologica nell'ambito dei piani di Profilassi di Stato. Verranno inoltre trasferite ai laboratori della rete degli IZS e di altri enti pubblici o privati interessati.

Studio dei fattori genetici utilizzabili nella gestione delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili dei piccoli ruminanti

Le Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST) sono un gruppo di patologie neurodegenerative che comprendono, nell'uomo, la malattia di Creutzfeldt-Jakob (MCJ), negli animali la scrapie degli ovini e caprini e l'encefalopatia spongiforme bovina (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. Obiettivo principale del progetto è quello di chiarire nelle pecore l'esistenza di ulteriori alleli del gene della PrP, oltre all'"ARR", associati a resistenza alle EST. Si intende inoltre indagare anche nelle capre l'esistenza di eventuali alleli della PrP associati a resistenza alle EST. Sarà studiato il gene della PrP dei casi naturali di malattia per evidenziare i genotipi coinvolti nella malattia naturale. Un campione di controllo sarà inoltre analizzato per evidenziare l'associazione a resistenza degli alleli della PrP riscontrati.

Si utilizzerà inoltre la tecnica del PMCA per indagarne l'utilità come strumento predittivo della suscettibilità genetica alle EST. I dati conseguiti saranno confrontati con e quelli ottenuti *in vivo*. Nel caso di chiara correlazione la tecnica del PMCA sarà utilizzata per testare genotipi rari e difficilmente testabili *in vivo* di cui sono state evidenziate associazione con minore

suscettibilità. Saranno inoltre testati con differenti isolati di EST tutti i genotipi disponibili per verificarne la suscettibilità nei confronti dei diversi ceppi.

Risultati attesi nel triennio

Obiettivo del progetto è quello di chiarire il ruolo svolto dal gene della PrP nel determinare la suscettibilità / resistenza alle EST oltre all'individuazione di alleli della PrP degli ovini oltre l'ARR associati a resistenza alle EST.

Sarà inoltre definito il comportamento di differenti alleli della PrP caprina nei confronti di diversi ceppi di EST al fine di fornire un eventuale base per l'istituzione della selezione genetica nei confronti dei fattori di resistenza alle EST anche nella specie caprina.

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 del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali e all'SSN ai fini del loro utilizzo per la prevenzione e il controllo delle EST.

Studio del botulismo animale mediante l'applicazione di metodi innovativi per la ricerca di *Clostridium botulinum* e delle sue neurotossine

Il botulismo animale è una patologia nota sia nella sua forma tossica, conseguente l'assunzione di alimenti contaminati, sia nella forma tossinfettiva che deriva dalla proliferazione del microrganismo nell'organismo del soggetto colpito e dalla sua successiva produzione di neurotossine botuliniche *in situ*.

Tale zoonosi è fortemente sottostimata soprattutto per quanto riguarda gli estesi episodi di botulismo aviario in uccelli selvatici. È infatti stato stimato che il botulismo aviario rappresenti la prima causa di morte di popolazioni aviarie selvatiche in tutto il mondo.

Il progetto si propone di fornire strumenti innovativi per la diagnosi di botulismo animale, che consentano di individuare e caratterizzare l'agente eziologico in tempi rapidi e in modo affidabile, utilizzando metodi alternativi alla prova biologica su topo.

Si intende inoltre creare una rete nazionale per la raccolta delle informazioni e dei dati epidemiologici relativi ai casi di botulismo animale e in particolare aviario e bovino, avvalendosi della collaborazione degli IZS, anche in ottemperanza alle prescrizioni della direttiva 2003/99/CE recepita con DL.vo 191/2006.

Da ultimo si intende sviluppare un vaccino stabulogeno per la terapia del botulismo negli animali da reddito.

Risultati attesi nel triennio

- Messa a punto di un protocollo di *Multiplex Real Time* PCR per la determinazione dei geni che codificano per le neurotossine botuliniche coinvolte nel botulismo animale;
- Sviluppo di un saggio immunoenzimatico (ELISA) specifico per le neurotossine botuliniche e per gli anticorpi anti neurotossine botuliniche;
- Aumento delle notifiche di episodi di botulismo aviario in particolare nelle zone umide;
- Creazione di un database per la raccolta delle informazioni e dei dati di natura epidemiologica, clinica, ecologica relativi ai casi di botulismo animale verificatisi sul territorio nazionale;
- Messa a punto delle strategie per il management dei casi di botulismo animale con particolare riferimento agli animali da reddito.

Trasferibilità dei risultati

I metodi prodotti da questo progetto di ricerca contribuiranno a migliorare le tecniche diagnostiche indispensabili per la conferma dei focolai di botulismo animale.

Dall'elaborazione dei dati epidemiologici, clinici ed ecologici raccolti in occasione di focolai di botulismo animale, sarà possibile comprendere meglio i fattori di rischio di questa zoonosi e sarà possibile mettere a punto strategie mirate per il contenimento degli episodi futuri.

Studio del ruolo di PMP70 nella patogenesi della adrenoleucodistrofia

L'*X-linked* adrenoleucodistrofia (ALD) è una malattia genetica dovuta a mutazioni del gene ABCD1. Esistono diverse varianti cliniche che non correlano con il genotipo e si ritiene quindi che geni modificatori possano avere un ruolo nella espressione della malattia. Uno dei geni candidati a tal fine è ABCD3 che codifica il trasportatore perossisomiale PMP70. Per mezzo della tecnica dell'*RNA-interference* applicata in cellule gliali di ratto, abbiamo precedentemente generato una linea cellulare, *abcd3kd*, in cui il gene ABCD3 è stato stabilmente silenziato. I nostri risultati hanno dimostrato che la mancanza di PMP70 provoca il rilascio di nitriti e superossido e la diminuzione dell'espressione e dell'attività degli enzimi antiossidanti indicando la presenza di un danno ossidativo. I nostri dati hanno anche dimostrato un maggiore rilascio di TNFalfa, IFNgamma e IL-12 rispetto alle cellule wt. Lo scenario indotto dal silenziamento di ABCD3 ricorda il quadro infiammatorio e ossidativo tipico della forma cerebrale dell'ALD e suggerisce il coinvolgimento della PMP70 nella forma infiammatoria della malattia. Poiché i trasportatori perossisomiali per essere funzionali devono formare dimeri, un'ipotesi potrebbe essere che polimorfismi o mutazioni di PMP70 possano condizionare la formazione del dimero PMP70/ALD influenzando il decorso della patologia. Con il presente progetto si intende approfondire questa ipotesi con studi *in vitro* inducendo il silenziamento di ABCD1, il doppio silenziamento di ABCD1 e ABCD3 e testando l'efficacia di alcune sostanze antiossidanti nel ridurre il processo ossidativo osservato in *abcd3kd*. In collaborazione con l'ospedale Bambino Gesù si eseguirà lo screening di polimorfismi di ABCD3 nei pazienti con diversi fenotipi.

Risultati attesi nel triennio

Il silenziamento di ABCD1 in cellule gliali darà indicazioni sulla funzione del gene dell'ALD. Dal momento che topi *knock-down* per ABCD1 non presentano segni di malattia, non ci attendiamo di osservare processi infiammatori o ossidativi. Ciò rafforzerà l'ipotesi del ruolo di PMP70 come gene che collabora all'espressione fenotipica della patologia. Il doppio silenziamento ABCD1/ABCD3 potrà indicare la funzione *overlapping* dei due geni. La valutazione dell'efficacia di alcune sostanze nell'inibire il processo infiammatorio e ossidativo in *abcd3kd*, suggerirà nuovi interventi terapeutici per l'ALD. Verranno testate alcuni inibitori dell'iNOS, la NAC e si studierà anche l'effetto della lovastatina e dell'olio di Lorenzo che sono in grado di ridurre i livelli plasmatici di *very long chain fatty acids*, *marker* biochimici della patologia. L'eventuale presenza di polimorfismi di ABCD3 in pazienti con il fenotipo infiammatorio confermerà il coinvolgimento di PMP70 nella malattia umana.

Trasferibilità dei risultati

Al momento non sono disponibili terapie soddisfacenti per l'ALD. Il precoce trattamento dietetico con l'olio di Lorenzo è essenziale per prevenire la rapida progressione della malattia ma è inefficace per i segni neurologici dei pazienti. Le conoscenze di base prodotte con questo progetto potranno essere traslate a medio e lungo termine nella applicazione clinica suggerendo all'SSN nuovi *marker* per monitorare il rischio della progressione della malattia e nuove specifiche sostanze per terapie farmacologiche. Inoltre l'identificazione dei geni modificatori potrebbe essere di rilevanza per prevedere se un ragazzo asintomatico è ad alto o basso rischio di sviluppare la forma infiammatoria cerebrale. Questa conoscenza aiuterà il medico specialista nella selezione dei pazienti da sottoporre al trapianto di cellule ematopoietiche che è il trattamento di elezione per pazienti preadolescenti nei primissimi stadi della forma cerebrale. L'alto rischio di questa tecnica in pazienti ALD (20-30% di mortalità) e il fatto che solo il 30-

40% dei pazienti ALD sviluppa la forma cerebrale fa sì che questa procedura venga offerta solo a ben selezionati pazienti.

Studio di modelli per la valutazione dei meccanismi di trasferimento di alcuni contaminanti chimici dall'ambiente agli alimenti durante la produzione primaria

Gli effetti dell'inquinamento possono essere distinti in effetti diretti sulla risorsa o indiretti (che ricadono su altre risorse, uomini o animali). Tra gli effetti diretti annoveriamo la preclusione all'utilizzo per certe funzioni cui la risorsa era destinata. Gli effetti indiretti possono esercitarsi su altre risorse o su organismi viventi, uomo compreso. I cosiddetti comparti abiotici inquinati, acqua, aria e suolo sono in pratica intercomunicanti, come del resto facilmente intuibile conoscendo i principi dei cicli biogeochimici propri dell'ecologia classica e, conseguentemente, attraverso tutti e tre i comparti i contaminanti possono arrivare alle colture vegetali, da qui agli animali d'allevamento e, infine, all'uomo. Quello che noi trasferiamo nel nostro ambiente può quindi essere ritrasferito a noi, in alcuni casi, con conseguenze avverse. A ciò si aggiunga il fatto che effetti indiretti dell'inquinamento ambientale possono riflettersi sulla produzione primaria di alimenti anche attraverso fonti di contaminazione specifica, ad oggi poco conosciute e studiate, come ad esempio i materiali di contenimento e/o a contatto, le lettiere, gli ammendanti e i concimi organici da reflui zootecnici. È, dunque, d'estrema rilevanza lo studio dei meccanismi attraverso i quali l'inquinamento ambientale o microambientale può inficiare la sicurezza d'uso degli alimenti. L'individuazione dei processi più rilevanti in termini di rischio per la salute del consumatore richiede lo sviluppo di un approccio organico e coerente per la valutazione della probabilità ed entità del possibile trasferimento degli agenti chimici tossici. Il Reparto Contaminanti chimici degli alimenti contribuirà allo studio di tali fenomeni valutando i meccanismi di trasferimento di idrocarburi policiclici aromatici, composti polifluorurati, diesteri ftalici, oli minerali.

Risultati attesi nel triennio

- Identificazione dei profili analitici di riferimento per qualificare da un punto di vista sanitario ambiente e microambienti di produzione alimentare primaria;
- Identificazione dei fattori di abbattimento o favorenti l'esposizione, il trasferimento e il bioaccumulo delle sostanze di interesse tossicologico nelle filiere alimentari, e valutazione del loro contributo attraverso studi di modellistica;
- Riduzione dell'esposizione alimentare a contaminanti di rilevante interesse tossicologico attraverso l'identificazione dei punti critici dovuti all'interazione tra macro- e micro-ambiente, mezzi di produzione e substrati biologici;
- Quantificazione del rischio espositivo e del possibile bioaccumulo mediante modellistica *in vitro* e *in vivo*;
- Proposizione di linee guida basate sui principi dell'HACCP, unitamente all'utilizzo di saggi di screening in condizioni di campo.

Trasferibilità dei risultati

- Trasferimento del *know-how* e delle procedure analitiche alla rete dell'SSN;
- Caratterizzazione delle fonti ambientali non convenzionali di contaminazione;
- Proposizione di opportune misure per ridurre/abbattere l'esposizione e il conseguente bioaccumulo;
- Proposizione di manuali per le buone pratiche igienico-sanitarie relative alla qualità degli ambienti e dei materiali nella produzione primaria.

Studio multidisciplinare su piante con effetti benefici sull'uomo

Negli ultimi decenni l'interesse per le piante con effetti benefici sull'organismo umano è andato crescendo con un ritmo incalzante come si nota dal numero di preparati a base di erbe che vengono immessi continuamente sul mercato. Tale situazione ha posto dei problemi inerenti alla loro sicurezza di impiego e, vista la tipologia dei prodotti, il rischio deve essere chiaramente trascurabile; è stato quindi necessario avviare un processo di armonizzazione nel settore che ha portato a collocare i derivati di piante, utilizzati negli integratori, nel settore alimentare rendendosi obbligatorio per essi l'adeguamento alle normative vigenti in materia di sicurezza.

Nelle formulazioni di questa categoria di prodotti vengono utilizzate piante o loro estratti per le quali il significato fisiologico dei principi attivi non è stato ancora appieno precisato. Taluni aspetti della fitochimica e farmacodinamica necessitano, alla luce delle recenti acquisizioni scientifiche, ulteriori approfondimenti che potrebbero allargare i campi applicativi della droga vegetale.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio si articolerà in primo luogo sull'identificazione di specie di piante di particolare interesse in quanto:

- di recente introduzione sul mercato europeo;
- recenti studi clinici ne stanno rivalutando le proprietà nutrizionali che potrebbero essere di aiuto per diminuire il rischio di alcune malattie croniche.

In una seconda fase verranno identificati:

- i componenti bioattivi coinvolti nell'azione fisiologica benefica;
- i metodi per la determinazione di *marker* biologici ai fini della valutazione dell'attività fisiologica.

Trasferibilità dei risultati

I dati ottenuti dallo studio di alcune piante, sottovalutate nell'alimentazione giornaliera o utilizzate per particolari preparazioni alimentari del tutto episodiche, potrebbero essere ritenute utili alle finalità salutistiche e contribuire a migliorare la salute umana.

Lo studio delle proprietà chimiche delle sostanze naturali presenti in una preparazione vegetale consentirà di: arricchire la banca dati relativa alla fitochimica delle piante; di definire, in funzione del tenore dei principi attivi, la droga vegetale; di identificare principi potenzialmente tossici capaci di dar luogo a effetti indesiderati.

Sviluppo di biomarcatori per la valutazione del rischio di interferenti endocrini

Lo sviluppo di *biomarker* è un aspetto critico per la valutazione del rischio degli interferenti endocrini (IE, www.iss.it/inte). Il progetto intende caratterizzare *biomarker* di esposizione totale, dose efficace e/o effetto in matrici alimentari e biologiche mediante strategie di biologia molecolare e sviluppo di nuove tecnologie biosensoristiche.

L'esposizione a IE è un aspetto importante in sicurezza alimentare (v. Comitato Nazionale Biosicurezza e Biotecnologie, 2006), per la diffusa esposizione, i diversi meccanismi e bersagli e i possibili rischi a lungo termine, soprattutto per l'età evolutiva. Seguendo le indicazioni dell'EFSA, gli IE prioritari comprendono contaminanti persistenti (es. PCB, cadmio) e/o ubiquitari (es. bisfenolo A), sostanze usate nella filiera agroalimentare (es. fungicidi dicarbosimidi), fitoestrogeni presenti in alimenti o integratori (es. genisteina).

Il progetto prevede, pertanto: i) l'uso di modelli sperimentali atti ad evidenziare specifiche attività associate all'esposizione alimentare a IE: linee cellulari derivate da tessuti vulnerabili (sistema riproduttivo maschile fetale, fegato, colon) e sistemi biosensoristici per identificare attività enzimatiche modulate da IE (es. attività antiossidante); ii) lo studio di IE (v. sopra),

selezionati come sostanze-modello di gruppi più estesi, a livelli di esposizione realistici; iii) una volta identificati i *biomarker* per i singoli IE, il programma si incentrerà sulla *real-life toxicology*: studio dell'effetto-matrice (estratti da matrici reali trattate) e di possibili effetti additivi, mediante esperimenti con miscele a livelli e composizione che mimano l'esposizione tramite la dieta totale.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto produrrà la caratterizzazione di un complesso di *biomarker* di esposizione totale, dose efficace e/o effetto per IE-modello. La validità ai fini della valutazione del rischio sarà rafforzata dagli aspetti *real-life* dello studio, mediante l'indagine di: i) concentrazioni effettivamente riscontrate nelle matrici alimentari e/o in tessuti umani, ii) un eventuale effetto-matrice, iii) eventuali effetti additivi dell'esposizione aggregata a concentrazioni realistiche di IE diversi.

In particolare, gli specifici risultati attesi comprendono:

- screening di *endpoint* funzionali per l'individuazione di matrici critiche e/o esposizioni critiche, mediante un sistema prototipo integrato di sensori e biosensori, a cellule e a enzima, in grado di evidenziare la modulazione di funzioni cellulari e mitocondriali;
- definizione, in linee cellulari umane rappresentative di organi bersaglio, di *biomarker* recettoriali e proteici in grado di evidenziare variazioni associabili a rischi per la salute umana; particolare attenzione verrà data all'uso integrato delle *omics*, mediante la valutazione dell'espressione genica di recettori nucleari e di specifici *marker* proteici funzionali.

In sintesi i prodotti finali del progetto saranno:

- caratterizzazione di biomarcatori di esposizione totale mediante studi di laboratorio e verifica della applicabilità e validazione su matrici reali, sia alimentari sia umane;
- individuare i sistemi cellulari più sensibili a specifiche azioni di IE, incluse le miscele;
- selezionare un panel ristretto di biomarcatori di dose efficace ed effetto sensibili e affidabili per l'identificazione di possibili effetti avversi indotti da IE.

Trasferibilità dei risultati

Le nuove conoscenze e i modelli prodotti e sviluppati costituiranno una integrazione per le strategie adottate nella valutazione del rischio tossicologico degli IE. Lo sviluppo di *biomarker* è anche determinante per ottenere indicatori precoci che permettano di indirizzare azioni di prevenzione e/o gestione del rischio.

In particolare i biomarcatori selezionati potranno essere utilizzati:

- nella gestione di indici di tossicità lungo la catena alimentare produttiva;
- nella sorveglianza sanitaria di popolazioni animali (domestiche o selvatiche) per la gestione tempestiva di possibili esposizioni a contaminanti;
- negli studi di biomonitoraggio di popolazioni umane esposte mediante la dieta;
- nella biosorveglianza in sottopopolazioni più vulnerabili.

Sviluppo di linee guida, e metodologie innovative per la tracciabilità, e il controllo ufficiale degli Organismi Geneticamente Modificati (OGM) nella filiera agro-alimentare

Gli OGM rappresentano una delle sfide più attuali e moderne nella filiera agroalimentare per la loro potenzialità di carattere agronomico, nutrizionale e sanitario. Sotto questo ultimo aspetto risulta promettente la possibilità di riduzione della contaminazione da micotossine nei prodotti OGM. Attualmente la filiera agroalimentare richiede un robusto sistema di diagnostica degli OGM per fronteggiare le problematiche relative all'obbligo di etichettatura e alla possibile

presenza di OGM non autorizzati. Questo progetto intende quindi sviluppare: i) metodiche di campionamento *fit for purpose*; ii) metodi analitici rapidi e multi screening; iii) sistemi di accreditamento a schema flessibile. Relativamente al primo punto verranno effettuati studi, su lotti di mais e soia, per verificare la praticabilità delle procedure di campionamento individuate dalla Rac.EU 787/04. Inoltre verrà effettuato un confronto con metodiche alternative e verranno valutate procedure di campionamento statico e dinamico mediante utilizzo di sistemi sia manuali sia automatici. Relativamente al secondo punto, verranno sviluppate e validate procedure analitiche volte al miglioramento dell'efficienza e dell'efficacia del controllo analitico: metodologie multi-screening, multi-*target* e *array* che consentono di ridurre i carichi di lavoro e di contenere i costi ed i tempi di esecuzione. Infine saranno identificati i requisiti generali e specifici per lo sviluppo di sistemi di accreditamento a schema flessibile.

Risultati attesi nel triennio

Punto 1: Valutazione della praticabilità della procedura di campionamento ed eventuale elaborazione di una procedura pratica basata sulla Racc. 787/2004/EC.

Punto 2: Identificazione di possibili strategie e validazione di metodi volti al miglioramento dell'efficienza e dell'efficacia del controllo analitico in termini di numero di specie botaniche analizzate, numero di eventi GM rilevati e quantificati, riduzione di costi e tempi di risposta delle analisi.

Punto 3: Stesura di linee guida e procedure per l'attuazione un sistema di accreditamento a schema flessibile per metodi di analisi degli OGM mediante tecniche PCR *real time*, con lo scopo di ottimizzare costi e risorse.

Trasferibilità dei risultati

Punto 1: Sarà fornita alle Autorità Competenti per il controllo ufficiale una valutazione della praticabilità della procedura di campionamento ed un protocollo tecnico. Ciò darà un contributo decisivo per armonizzare le procedure a livello nazionale.

Punto 2: Al fine di ottimizzare l'efficienza e l'efficacia del controllo analitico, saranno rese disponibili alla Rete It. dei Laboratori OGM, strategie analitiche per l'ottimizzazione dei tempi e dei costi.

Punto 3: Ai laboratori ufficiali saranno fornite linee guida per implementare l'accREDITAMENTO flessibile per rispondere alle esigenze analitiche del settore OGM in continua evoluzione.

I risultati ottenuti forniranno supporto alle Autorità Competenti per la realizzazione di piani di controllo statisticamente più significativi come richiesto dal Reg. EC 882/04. Le attività di disseminazione saranno: sito web dedicato, convegni e pubblicazioni su riviste scientifiche. Progetto in parte finanziato dall'IP VI FP: CO-EXTRA P.n. 07158.

Sviluppo di metodi per l'individuazione di agenti patogeni umani, batteri e virus, in prodotti vegetali (Sub-task 6.4.1), nell'ambito del progetto BASELINE (seventh Framework programme theme 2 – Food, Agriculture and Fisheries, and Biotechnology KBBE) Task 6.4. Valutazione della necessità di nuovi metodi di analisi per il campionamento

I virus enterici rappresentano un serio problema per la salute del consumatore se ingeriti, poiché possono causare gastroenteriti a volte anche severe. La letteratura riporta numerosi episodi di tossinfezioni alimentari dovute alla presenza di Norovirus e HAV negli alimenti vegetali. L'aumento dei casi di malattia associati al consumo di vegetali crudi rende necessario l'avvio di appositi programmi di sorveglianza, al momento piuttosto carenti, a causa delle difficoltà di determinazione di tali virus dovute a problemi legati ai metodi di analisi nel rilevare sia basse concentrazioni di virus sia alla difficoltà di crescita. Per tali motivi la PCR risulta

sicuramente il metodo più idoneo, per la determinazione dei virus enterici nei campioni sia ambientali sia alimentari in quanto risulta essere sensibile e specifico.

Per queste ragioni lo scopo del lavoro sarà quello di definire, un metodo sensibile, specifico e robusto per la determinazione quantitativa dei virus enterici dai prodotti vegetali. Il metodo si articolerà in una fase che prevederà l'estrazione e concentrazione dei virus enterici dalla matrice vegetale e una seconda fase di determinazione dell'RNA virale mediante l'applicazione della *Real Time* RT-PCR. Il metodo sviluppato potrà essere applicato sia nell'ambito di monitoraggi per verificare l'incidenza dei virus enterici nei prodotti vegetali, considerati ad alto rischio per l'uomo, nonché fornire metodologie per la ricerca di virus enterici (HAV e Norovirus) da inserire nella futura revisione del Regolamento 2073/2004/CE.

Risultati attesi nel triennio

Disponibilità e applicazione di metodiche biomolecolari per la ricerca di virus enterici su alimenti vegetali implicati nelle tossinfezioni alimentari (HAV-Norovirus).

Valutazione della contaminazione naturale da virus enterici nei prodotti vegetali.

Trasferibilità dei risultati

Fornire metodologie per la ricerca di virus enterici (HAV e Norovirus) sui prodotti vegetali da inserire nella futura revisione del Regolamento 2073/2004/CE.

Sviluppo di modelli matematici per lo studio della diffusione di agenti infettivi in popolazioni animali, con particolare riferimento agli agenti di zoonosi

Il progetto approfondirà lo studio della diffusione di agenti infettivi nelle popolazioni animali attraverso: metodiche analitiche tradizionali (serie spaziali e temporali, *cluster analysis*); Sistemi Informativi Geografici; modelli predittivi.

L'elaborazione di modelli matematici che considerino l'effetto di fattori legati all'agente infettivo, alla popolazione ospite e all'ambiente, permette di stimare la potenziale di diffusione spaziale e temporale di una malattia. Ciò consente di identificare i parametri chiave che influenzano l'outcome, e valutare possibili opzioni di intervento e controllo.

I modelli avranno per oggetto la scrapie ovina, le infezioni da *E. coli* O157 e altri STEC nei bovini e le salmonellosi nell'uomo, alimenti e animali.

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 (TSE ovine; Sindrome Emolitico Uremica, EnterNet, EnterVet), dalla letteratura, nonché con eventuali ulteriori dati appositamente raccolti per lo sviluppo e validazione dei modelli.

Per quanto riguarda la scrapie l'implementazione dei modelli sarà attuata nell'ambito di un progetto quinquennale di intervento in provincia di Siena.

Si prevede, inoltre, la possibilità di utilizzare le informazioni epidemiologiche derivanti dagli studi di prevalenza di *E. coli* O157 nella popolazione bovina, che verranno effettuati nel prossimo futuro in ottemperanza al Reg. 2160/2003/CE (*baseline study*).

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.
- Implementazione (sviluppo e validazione) di modelli predittivi per l'analisi della diffusione territoriale e intra-allevamento delle infezioni da *E. coli* O157 e altri VTEC nella popolazione bovina italiana.
- Identificazione dei fattori in grado di influenzare significativamente la diffusione intra-allevamento e territoriale della scrapie e delle infezioni da *E. coli* O157.

- Valutazione di possibili obiettivi e opzioni di controllo per la riduzione della diffusione dei ceppi di scrapie e di *E. coli* O157 e altri VTEC.
- Identificazioni di indicatori sensibili e possibili ambiti nei quali ottimizzare le attività di sorveglianza attualmente attive.
- Individuazione dei deficit informativi e delle aree ove indirizzare ulteriori studi.

Trasferibilità dei risultati

- I 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 degli agenti infettivi oggetto del progetto, 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.
- Lo sviluppo delle competenze nell'ambito della costruzione dei modelli predittivi di diffusione di patogeni a trasmissione alimentare quali *E. coli* O157 e Salmonella consentiranno di poter adattare i modelli, con relativa semplicità, anche ad altri agenti zoonotici a trasmissione alimentare.

Sviluppo di nuovi approcci vaccinali per il controllo delle zoonosi batteriche

Le attività saranno articolate in due sottoprogetti che rappresentano la naturale continuazione delle attività svolte negli anni precedenti.

Il primo sottoprogetto avrà come obiettivo la valutazione delle possibilità di impiego a scopo vaccinale di ceppi attenuati di *Salmonella spp.* Utilizzando un approccio già oggetto di brevetto (ISS-Università di Tor Vergata) si cercherà di valutare l'ambito di sviluppo di tale approccio per allestire ceppi vaccinali per il controllo delle salmonellosi, sia indotte da ceppi adattati (*S. Typhi*, *S. Pullorum*, *S. Choleraesuis*) che da ceppi non adattati (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*). Il progetto si articolerà in attività svolte utilizzando sia modelli sperimentali che animali naturalmente ricettivi all'infezione.

Il secondo sottoprogetto avrà come obiettivo quello di continuare le attività finanziate dal progetto ISS-NIH. In questo contesto, è stato osservato che esiste una sottopopolazione di cellule linfocitarie con fenotipo CD4+CD25+ (cellule regolatorie) che pur svolgendo una funzione fondamentale di prevenzione sulla comparsa dei meccanismi all'origine dei fenomeni autoimmunitari, al contempo svolge un'attività inibente sulla risposta cellulosa mediata indotta da infezioni sostenute da batteri endocellulari facoltativi, favorendone la permanenza in organi e tessuti d'elezione. L'obiettivo delle attività da svolgere sarà quello di valutare se la rimozione di tali cellule, mediante trattamento immuno-modulante selettivo, possa potenziare la risposta immunitaria indotta o da infezioni sostenute da patogeni endocellulari facoltativi o da somministrazione di molecole ad attività antigenica utilizzate a scopo vaccinale.

Risultati attesi nel triennio

I risultati ottenibili per il primo sottoprogetto sono caratterizzati da nuovi protocolli vaccinali per la profilassi delle salmonellosi, utilizzando ceppi batterici a patogenicità attenuata da usare per via mucosale, mentre per il secondo progetto sono lo sviluppo di nuovi protocolli da impiegare per potenziare la risposta immunitaria e migliorare la reazione degli ospiti vertebrati

nei confronti dei batteri patogeni endocellulari facoltativi. Questi risultati inoltre forniranno utili informazioni da utilizzare per la redazione di articoli scientifici.

Trasferibilità dei risultati

La trasferibilità nello sviluppo di nuovi approcci vaccinali per il controllo delle salmonellosi è una possibilità concreta. Infatti è già stato stipulato un progetto per la valutazione di alcune caratteristiche dei ceppi vaccinali coperti da brevetto, finanziato da una ditta farmaceutica interessata ad un possibile sviluppo industriale.

Sviluppo di nuovi metodi biomolecolari per il controllo e la profilassi delle infezioni batteriche a carattere zoonosico

Le attività programmate per il triennio 2009-2011 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. In aggiunta a ciò si intende valutare l'impatto della febbre Q sulla salute pubblica e sulla sanità animale al fine di considerare eventuali rischi emergenti o riemergenti.

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 patogeni (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.

Sviluppo di un biosensore per la determinazione *in vitro* dell'attività proteasica delle neurotossine botuliniche

Le neurotossine botuliniche sono zinco-endopeptidasi in grado di scindere specificamente proteine neuronali coinvolte nel rilascio del neurotrasmettitore acetil-colina: il conseguente blocco del rilascio del mediatore a livello delle giunzioni neuromuscolari periferiche causa la paralisi flaccida del botulismo. Esistono sette tipi di tossine botuliniche, diverse fra di loro antigenicamente e per target cellulari: il metodo più sensibile per rilevarle negli alimenti o nei campioni biologici di pazienti affetti da botulismo rimane attualmente quello effettuato *in vivo*

su topini. Il test è anche specifico, poiché permette l'identificazione del tipo di tossina botulinica, grazie all'uso di antisieri monovalenti che neutralizzano esclusivamente l'azione tossica del tipo corrispondente. Tuttavia, l'uso di animali da laboratorio può essere effettuato solo in strutture dotate di adeguati stabulari, è costoso e richiede tempi lunghi di risposta; inoltre, è stato limitato dalla direttiva europea 86/609/EEC.

Scopo del progetto sarà quello di mettere a punto un sistema *in vitro* di rilevazione e identificazione delle tossine botuliniche basato sulla determinazione della loro attività proteasica nei confronti di peptidi fluorogeni sintetici, le cui sequenze aminoacidiche simulano quelle dei target specificamente riconosciuti dalle diverse tossine.

Risultati attesi nel triennio

La sensibilità e la specificità del test *in vitro* saranno inizialmente valutate e ottimizzate mediante misurazione fluorimetrica della scissione dei substrati peptidici (diversi per lunghezza e marcatori) da parte delle tossine pure. Tali caratteristiche saranno successivamente determinate in diverse matrici alimentari e in campioni biologici contaminati artificialmente e naturalmente con le tossine botuliniche, in parallelo con il gold standard test *in vivo* su topini.

Il biosensore sarà considerato soddisfacente solo nel caso in cui le sue caratteristiche di sensibilità e specificità siano simili o superiori a quelle del metodo *in vivo*.

Trasferibilità dei risultati

La messa a punto e la disponibilità di un test *in vitro* alternativo a quello effettuato sui topini, che sia di semplice svolgimento, ma anche dotato di caratteristiche di sensibilità e specificità simili a quelle ottenute con il test *in vivo*, potrebbe contribuire al coinvolgimento di tutti i laboratori dell'SSN (in particolare, di quelli non dotati di stabulari per la manutenzione degli animali) nel far fronte ad eventuali situazioni di emergenza che potrebbero insorgere in seguito all'uso improprio delle tossine botuliniche, sia in terapia che per altri scopi.

Il test potrà inoltre essere utilizzato dai medici delle strutture ospedaliere che utilizzano la tossina botulinica come farmaco, qualora si renda necessario monitorare la quantità di tossina presente in circolo nei pazienti sottoposti a terapia.

Sviluppo, validazione e applicazione dei metodi di identificazione degli alimenti irradiati

L'irraggiamento è già da tempo utilizzato, in alternativa ad altre tecnologie di conservazione, per ridurre e prevenire il rischio di malattie trasmesse dagli alimenti e per prolungare la *shelf-life* degli alimenti stessi. Le direttive comunitarie prevedono l'obbligo di etichettatura degli alimenti irradiati e il controllo sui prodotti in fase di commercializzazione.

Negli ultimi anni il Comitato Europeo di Normazione ha standardizzato un numero sufficiente di metodi atti a rilevare negli alimenti la presenza di prodotti radio-indotti che rappresentano marker specifici dell'irraggiamento.

Scopo di questo studio è quello di mettere a punto, estendere ad altre matrici alimentari e quindi validare, attraverso circuiti inter-laboratorio, alcuni dei metodi proposti dal CEN. In particolare la ricerca è rivolta ai metodi basati sulle tecniche di GC/MS, ESR e DNA-Comet che trovano ampia applicazione per il controllo di alimenti di origine animale. Il progetto prevede inoltre di applicare i metodi validati per condurre un monitoraggio sugli alimenti presenti sul mercato nazionale.

Questa attività è condotta in collaborazione con il Dipartimento di TES di questo Istituto e con altri enti nazionali (IZS e Università) che partecipano ad un progetto finanziato dal Ministero della Salute.

L'attività di ricerca prevede inoltre lo studio dell'applicabilità della tecnica di termoluminescenza, validata per erbe e spezie, agli integratori a base di erbe irradiati.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si propone di mettere a punto ed ottimizzare il metodo GC/MS basato sull'analisi dei 2-alcilciclobutanoni, composti identificati come *marker* specifici dell'irraggiamento negli alimenti contenenti grassi. In particolare verranno studiati e valutati diversi metodi di estrazione e purificazione di tali composti.

Successivamente verrà studiata l'applicazione del metodo ad altre matrici animali non validate nel protocollo CEN, quali anatra, tacchino, vitello e tonno. Dopo la validazione del metodo, attraverso circuiti inter-laboratorio, si procederà alla stesura del protocollo di analisi. Tale protocollo potrà quindi essere applicato per condurre un monitoraggio sugli alimenti presenti sul mercato nazionale.

Parallelamente verrà studiata l'applicazione del metodo per EPR, basato sulla rivelazione del segnale caratteristico dei radicali radioindotti nella matrice inorganica dell'osso (idrossiapatite), ad altre matrici non ancora validate. La tecnica EPR inoltre verrà studiata per la valutazione della dose di trattamento attraverso il metodo delle dosi aggiuntive.

Trasferibilità dei risultati

- Divulgazione dei risultati ottenuti attraverso rapporti tecnici e workshop;
- Diffusione dei protocolli validati ai laboratori deputati al controllo ufficiale degli alimenti;
- Creazione di un network di laboratori nazionali, di identificazione degli alimenti irradiati, coordinato dall'ISS;
- Comunicazione dei risultati dei controlli effettuati attraverso il monitoraggio sugli alimenti presenti sul nostro mercato, alla Commissione della Comunità Europea così come previsto dalla normativa vigente.

Termogenesi adattativa nel tessuto adiposo bianco (WAT): ruolo dei polifenoli

Il tessuto adiposo ha un ruolo centrale nella regolazione del bilancio energetico che è definito da due componenti: *intake* e dispendio energetico. Nei mammiferi coesistono due tipi di tessuto adiposo: tessuto adiposo bianco (WAT) deputato alla conservazione di energia sotto forma di TG; e tessuto adiposo bruno (BAT) che, mediante UCP1, proteina mitocondriale regolata da PGC1 α , dissipa energia mediante termogenesi adattativa. L'obesità, un eccesso di WAT, predispone allo sviluppo di numerosi disturbi metabolici. La termogenesi adattativa è un importante componente dell'omeostasi energetica e costituisce una difesa metabolica contro l'aumento della massa grassa. Un recente lavoro ha evidenziato che diverse classi di isoflavoni aumentano l'espressione di PGC1 α associata a biogenesi mitocondriale. Inoltre, ratti alimentati con dieta ad alto contenuto di grassi supplementata con oleuropeina mostravano un aumento di UCP1 e della termogenesi in BAT. L'aumentata espressione di UCP1, in adipociti 3T3-L1 riduceva notevolmente l'accumulo di trigliceridi. Si è osservato che l'aumento di PGC1 α in WAT umano induceva l'attivazione di UCP1, l'aumentata espressione delle proteine della catena respiratoria e degli enzimi dell'ossidazione degli acidi grassi, trasformando il fenotipo di queste cellule da deposito di energia a dissipatore di energia. Una maggiore comprensione dei meccanismi d'azione dei polifenoli, nell'ambito della termogenesi adattativa nel WAT, sarebbe di notevole aiuto nello sviluppo di approcci terapeutici antiobesità rivolti ad aumentare il dispendio energetico.

Risultati attesi nel triennio

Dati preliminari da noi ottenuti, mostrano che preadipociti 3T-L1 trattati con miscele di differenziamento in presenza di ox-LDL non differenziano e se stimolati con forskolina esprimono PGC1 α e UCP-1. Scopo del lavoro è quello di valutare, in adipociti murini 3T3-L1 e adipociti umani ottenuto da tessuto adiposo omentale/sottocutaneo, la capacità dei polifenoli

dell'EVOO (oleuropina, acido protocatecuico, ecc.) di promuovere uno *shift* metabolico dalla conservazione dei trigliceridi (WAT) all'utilizzo di energia (BAT). A tale proposito sarà valutata: i) la biogenesi/funzione mitocondriale mediante l'analisi di espressione di PGC1 α e UCP1; COX IV, CytoC, ATP-*synthetase*, molecole coinvolte nella catena respiratoria; ii) la ossidazione degli acidi grassi mediante lo studio di enzimi coinvolti nella ossidazione degli acidi grassi quali CPT1 (*carnitin palmitoyle transferase I*) e MCAD (*medium chain acyl coenzyme A dehydrogenase*) e la valutazione dei trigliceridi cellulari. Inoltre, sarà studiata l'espressione dei fattori di trascrizione PPAR α , δ , γ in quanto fortemente coinvolti nella regolazione della biogenesi mitocondriale e nella ossidazione degli acidi grassi. I risultati attesi da questo studio permetteranno di comprendere se, e con quali meccanismi di azione, i polifenoli naturali possono attivare/modulare il dispendio energetico nel WAT.

Trasferibilità dei risultati

L'obesità è il risultato di un disordine del bilancio energetico. Le attuali strategie rivolte al trattamento dell'obesità, sono focalizzate non solo sulla riduzione dell'*intake* energetico ma anche all'aumento del dispendio energetico promuovendo l'utilizzo degli acidi grassi mediante conversione fenotipica di WAT in BAT. I composti fenolici contenuti nell'EVOO si sono rivelati importanti sostanze in grado di modulare un numero sempre maggiore di funzioni cellulari. Il progetto potrà fornire utili indicazioni: i) sulla comprensione dei meccanismi che governano l'acquisizione, da parte dell'adipocita del grasso bianco, del fenotipo *bruno-like*; ii) e sulla possibilità di utilizzare i polifenoli dell'EVOO come agenti termogenici capaci di aumentare l'attività ossidativa mitocondriale ed il dispendio energetico, rappresentando una nuova strategia per l'obesità e le complicanze ad essa correlate.

Tipizzazione biologica e molecolare dei ceppi di Encefalopatia Spongiforme Trasmissibile degli animali e dell'uomo

Nonostante l'agente eziologico delle EST, il prione, sia 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 PrPSc. 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 PrPSc. Tale ipotesi è corroborata dal fatto che è la PrPSc che accompagna ceppi diversi ha in alcuni casi diverse caratteristiche chimico-fisiche. Tradizionalmente le EST erano considerate patologie a basso potenziale zoonotico in quanto la trasmissione interspecifica dei prioni è limitata dalla barriera di specie. La crisi della BSE ha però evidenziato come alcuni ceppi di prione possano essere trasmessi dall'animale all'uomo. A tal fine una parte consistente del progetto sarà dedicata alla tipizzazione molecolare della PrPSc in tutti i casi di EST ovi-caprina confermati in Italia, allo scopo di escludere/conoscere l'eventuale presenza della BSE.

I ceppi hanno caratteristiche stabili quando trasmesse in animali di laboratorio e attualmente la tipizzazione dei ceppi si basa sulla caratterizzazione fenotipica della malattia in modelli animali sperimentali. Negli ultimi anni abbiamo caratterizzato un modello animale, l'arvicola rossastra, capace di replicare in tempi relativamente rapidi diversi ceppi di EST provenienti dagli animali e dall'uomo. Con questo strumento ci proponiamo di caratterizzare i ceppi di EST presenti nei ruminanti di interesse zootecnico e nell'uomo, con particolare riferimento alle forme sporadiche, al fine di rintracciare ceppi potenzialmente zoonotici.

Risultati attesi nel triennio

- Determinare l'eventuale presenza della BSE nella popolazione ovi-caprina italiana.

- Confrontare le caratteristiche molecolari della PrPSc 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.
- Determinare se alcuni ceppi siano presenti sia negli animali che nell'uomo.
- Mettere a punto protocolli di tipizzazione molecolare capaci di discriminare i ceppi di EST.

Trasferibilità dei risultati

- I risultati di carattere applicativo verranno resi disponibili al Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali 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 Comunità Europea.
- Verrà organizzato un workshop nazionale per la presentazione e discussione dei risultati.

Trasmissione sperimentale di scrapie, BSE e BASE nella pecora: sviluppo di strumenti e strategie di gestione

Obiettivo generale del programma è quello di sviluppare conoscenze, strumenti e strategie utili ai fini dell'efficace gestione delle EST dei piccoli ruminanti. L'attività programmata per il triennio 2009-2011 è incentrata sullo studio delle caratteristiche patologiche della scrapie e della BSE e della BASE in pecore infettate per via orale o per via intracerebrale. Tali studi consentiranno di ottenere informazioni in condizioni "controllate", determinanti per la gestione delle malattie da prioni dei piccoli ruminanti. In particolare la prosecuzione di questi studi permetterà di ottenere conoscenze definitive relativamente al grado di resistenza delle pecore portatrici di genotipi "resistenti", nonché al loro potenziale ruolo di portatori sani. Un ulteriore obiettivo è quello di identificare le vie di eliminazione dell'agente patogeno quali potenziali veicoli dell'infettività per la trasmissione orizzontale, nonché come potenziali strumenti per la diagnosi precoce *in vivo*. I campioni biologici prodotti nel corso delle infezioni sperimentali costituiranno il materiale di studio e consentiranno di costituire una banca di materiali patologici di riferimento. I dati ottenuti dalle pecore sperimentalmente infettate verranno corroborati utilizzando tessuti ovi-caprini da animali naturalmente infetti, provenienti da focolai di scrapie italiani.

Accanto alla sperimentazione sugli ovini, verranno condotti studi in modelli sperimentali di laboratorio per indagare aspetti della patogenesi delle EST, nonché per sviluppare strumenti innovativi per l'attività di sorveglianza.

Risultati attesi nel triennio

- Approfondire sperimentalmente le basi genetiche della suscettibilità alla scrapie e alla BSE ai fini dell'impiego della selezione genetica quale strumento di controllo.
- Sviluppare sistemi diagnostici precoci e sensibili.
- Approfondire gli studi sulla distribuzione della PrPSc e dell'infettività nell'organismo infetto, con particolare riferimento ai tessuti di importanza per la sanità pubblica (per es. i muscoli e il latte).
- Individuare i tessuti infetti che più contribuiscono alla disseminazione ambientale e orizzontale dei prioni al fine di chiarire gli aspetti epidemiologici della scrapie.
- Sviluppare e mettere a punto strumenti di indagine, basati sulla caratterizzazione biochimica della PrPSc, per differenziare la scrapie dalla BSE.

- Sviluppare modelli animali più sensibili per studi di infettività e per caratterizzare biologicamente e discriminare l'agente della scrapie da quello della BSE.

Trasferibilità dei risultati

- 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 Comunità Europea.
- Verrà organizzato un workshop nazionale per la presentazione e discussione dei risultati.

UO nel progetto “Sviluppo di tecnologie biomolecolari innovative per la sorveglianza epidemiologica di contaminanti batterici e virali ai fini della valorizzazione della produzione dei molluschi bivalvi della Sardegna”

Il consumo di molluschi bivalvi vivi o poco cotti è altamente correlato all'insorgenza di infezioni da Norovirus (NoV), virus dell'Epatite A (HAV) e vibriani patogeni. Si ritiene, comunque, che il numero reale di casi riconducibili a tali agenti e ad altri, tra cui il virus dell'Epatite E (HEV), *Campylobacter spp.*, *E. coli* 0157 e *Listeria monocytogenes*, sia di fatto sottostimato, soprattutto in riferimento a forme di media o lieve entità che non richiedono ospedalizzazione.

Il progetto si propone la messa a punto metodi diagnostici innovativi per la ricerca di tali microrganismi in molluschi bivalvi prodotti in Sardegna, basati sulla PCR quali: set di PCR con *primer* specifici per la conferma delle specie batteriche oggetto di indagine e per la verifica dei geni di patogenicità, *Real Time* PCR per la loro quantificazione diretta e identificazione, elettroforesi in campo pulsato (PFGE) per l'analisi di popolazione, tecniche di *microarray* su substrato solido, mediante allestimento di microchip a DNA per l'analisi genomica comparativa di consorzi batterici complessi. La UO contribuirà agli studi su virus enterici e vibriani patogeni, in particolare *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*.

L'attività, svolta sulla base di un monitoraggio sistematico delle aree produttive di maggiore interesse, consentirà di realizzare un modello di database relazionale (RDB) con georeferenziazione delle popolazioni di molluschi bivalvi oggetto di studio e relativi riscontri di contaminanti patogeni.

Risultati attesi nel triennio

- Sviluppo di metodi biomolecolari (metodi di ricerca, quantificazione e caratterizzazione) finalizzati alla realizzazione di una sorveglianza epidemiologica relativa alla diffusione di batteri e virus in molluschi bivalvi prodotti in Sardegna, tra i quali: *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *E. coli* O:157, *Vibrio cholerae*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *L. monocytogenes*, virus dell'Epatite A (HAV) ed E (HEV) e Norovirus (NoV).
- Realizzazione di un modello di database relazionale (RDB o *Relational DataBase*) con georeferenziazione delle popolazioni di molluschi bivalvi oggetto di studio, in relazione ai microrganismi contaminanti di interesse. Il database sarà alimentato con i risultati ottenuti nel corso della ricerca e sarà predisposto per l'aggiornamento costante.
- Valutazione del rischio derivante dalla diffusione nell'ambiente di produzione dei microrganismi contaminanti i molluschi allevati in Sardegna.

Trasferibilità dei risultati

L'ampliamento delle conoscenze scientifiche e metodologiche costituirà un valido supporto per lo sviluppo di tecniche finalizzate alla valutazione della diffusione di microrganismi nelle popolazioni di molluschi. I risultati ottenuti rappresenteranno uno strumento di valorizzazione della produzione di molluschi bivalvi della Sardegna, in quanto indispensabili per la redazione

di disciplinari di qualità basati sul controllo delle caratteristiche di salubrità del prodotto regionale.

Validazione di metodi per la determinazione di additivi e principi attivi negli alimenti per animali.

Il relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali stabilisce che gli organi competenti dovrebbero eseguire i controlli ufficiali usando tecniche appropriate di alta qualità. I laboratori responsabili per l'esecuzione delle analisi su campioni ufficiali dovrebbero lavorare in accordo a procedure approvate internazionalmente o in base a stabiliti criteri standard di prestazioni; inoltre si richiede che tali metodi siano validati.

La norma ISO/IEC 17025 ai fini dell'accreditamento dei laboratori di prova impone (tra gli altri requisiti) la validazione dei metodi di prova; infatti, attraverso la validazione, il laboratorio deve dimostrare che i risultati delle prove siano adatti all'utilizzo previsto e corrispondano alle esigenze del cliente. In questo panorama si colloca l'attività del laboratorio di Metodologie e indicatori per la sicurezza chimica nelle filiere alimentari e salute umana del Dipartimento SPVSA che ha, tra gli altri, il compito di eseguire le revisioni di analisi per il controllo degli alimenti per animali. Il programma di lavoro futuro prevede la validazione di circa 20 metodi chimici di conferma e lo sviluppo di altri metodi a tutt'oggi non disponibili presso il laboratorio.

Risultati attesi nel triennio

Validazione di circa 20 metodi chimici di conferma attraverso la definizione e misura dei parametri obbligatori per la validazione di un metodo analitico in base al Regolamento (EC) No 882/2004.

Trasferibilità dei risultati

I metodi sviluppati/validati potranno essere trasferiti alla rete degli IZS che operano sul territorio; il trasferimento avverrà mediante organizzazione di workshop e/o studi di intercalibrazione. La disponibilità di metodi chimici di conferma per il controllo degli alimenti per animali condivisi tra i laboratori competenti potrebbe risultare in una maggiore uniformità nella capacità di fornire un risultato di conformità/non conformità sul territorio nazionale.

Valutazione chimico/tossicologica della presenza di coccidiostatici nei mangimi a seguito di fenomeni di contaminazione crociata

Il progetto di ricerca si propone, nell'ambito delle problematiche relative alla contaminazione crociata da coccidiostatici nei mangimi, di verificare la reale portata del fenomeno in termini di sanità animale e di salute pubblica. Con l'emanazione del Regolamento (EC) 124/2009 è emersa la necessità di procedere a ulteriori approfondimenti scientifici al fine di acquisire nuove informazioni. La Direttiva(CE) 2009/8 definisce i tenori massimi di coccidiostatici o istomonostatici per effetto di *carry-over* in mangimi destinati a specie non bersaglio. Al fine di ampliare il livello di conoscenze e al tempo stesso garantire un adeguato sistema di controllo diventa determinante sviluppare aree di studio e ricerca in relazione a:

- valutazione dei livelli di sicurezza per il consumatore
- predisposizione di metodi analitici e validazione
- rischio di tossicità per la specie per le quali il principio attivo non è autorizzato.

Il progetto prevede una serie di attività che ricadono in tre diverse aree:

- Area chimico-analitica
Sviluppo e validazione di metodi chimici per la determinazione di coccidiostatici in mangimi e tessuti.

- Area Bio-tossicologica
Utilizzo di modelli sperimentali *in vivo* per lo studio degli effetti a seguito di esposizione con uno o più principi attivi ai livelli d'interesse.
- Area di supporto per la preparazione di materiali
Attività di rifornimento/preparazione di mangimi da utilizzarsi per gli studi di intercalibrazione che per la sperimentazione *in vivo*.

Risultati attesi nel triennio

Conoscenza della reale portata del problema relativo alle contaminazioni crociate da coccidiostatici sul territorio nazionale.

Elaborazione e validazione di metodi chimici idonei al controllo ufficiale di coccidiostatici ai livelli di contaminazione crociata.

Indicazione del livello di sicurezza della contaminazione crociata tollerata per i coccidiostatici per le specie zootecniche e per il consumatore.

Trasferibilità dei risultati

Trasferimento, nell'ambito dell'attività di controllo, di metodi chimici per la determinazione di residui di coccidiostatici in mangimi (specie target e non target) a seguito di fenomeni di contaminazione crociata.

Trasferimento, nell'ambito dell'attività di controllo, di metodi chimici per la determinazione di residui di coccidiostatici in alimenti di origine animale a seguito di alimentazione a base di mangimi contenenti residui di coccidiostatici.

Trasferimento dei dati tossicologici derivanti dagli studi *in vivo* e *in vitro* agli organismi di valutazione del rischio (RFSA).

Trasferimento di idonee procedure di campionamento di mangimi agli operatori dell'SSN al fine di garantire la rappresentatività dei campioni sottoposti al controllo ufficiale (determinazione residui coccidiostatici).

Valutazione dei livelli di piombo negli infusi. Problematiche analitiche e tossicologiche

Il Pb è un elemento tossico presente come contaminante nelle derrate alimentari di origine vegetale e animale. La presenza negli alimenti vegetali dipende dal livello di contaminazione ambientale e dei terreni e dalle caratteristiche di bioaccumulo degli organismi vegetali.

Per preservare la popolazione dai rischi correlati ad una esposizione eccessiva di pb sono stati definiti a livello comunitario i livelli massimi di accettabilità in diversi prodotti alimentari (REG 1881/2006). Attualmente, tuttavia, alimenti importanti sotto il profilo dei consumi, non sono compresi nella norma comunitaria. Tra questi il tè e altri infusi costituiscono, per la loro importanza nelle abitudini alimentari di fasce estese di popolazione, uno dei gruppi alimentari più importante. Si rende quindi indispensabile acquisire tutte le informazioni tecnico-scientifiche necessarie per colmare tale lacuna.

Questo progetto si propone di valutare:

- i livelli di pb nelle diversi tipi di tè presenti sul mercato nazionale;
- i livelli di pb nelle bevande preparate (infusi) considerando le diverse modalità di preparazione (tempi e criteri di infusione/estrazione);
- il contributo che tali prodotti determinano nel contesto dell'*intake* di pb con la dieta.

Saranno perciò analizzati campioni di tè e altri vegetali per infusione (essiccati) rappresentativi della tipologia di prodotti presenti in Italia e i relativi infusi per individuare il range percentuale di trasferimento del pb nelle bevande consumate attraverso AAS e ICP-MS.

Saranno calcolate le loro assunzioni anche per segmenti di popolazione vulnerabile (bambini, soggetti allergici al latte), consumatori abituali di tali alimenti per evidenziare aree di rischio da consumo eccessivo di pb con la dieta.

Risultati attesi nel triennio

Acquisizione dei livelli di presenza di piombo nelle diverse tipologie di tè e altri vegetali per infusione.

Individuazione dei livelli percentuali di trasferimento del piombo dalla foglia all'infuso.

Stima del contributo di questi prodotti alimentari alla esposizione al piombo.

Validazione metodi analitici.

Trasferibilità dei risultati

Definizione limiti massimi di piombo in questi prodotti nella normativa comunitaria.

Trasferimento ai laboratori del Controllo Ufficiale di metodi validati per la determinazione del piombo in tè e prodotti similari.

Valutazione del contenuto di iodio in alimenti pronti preparati utilizzando sale da cucina arricchito con iodio

Lo iodio è un micronutriente essenziale utilizzato dalla tiroide per la biosintesi di ormoni tiroidei quali la tiroxina (T3) e la triiodotironina (T4). Questi ormoni giocano un ruolo importante nello sviluppo mentale, nell'accrescimento e in varie vie metaboliche. Sia una carenza che un eccesso di iodio hanno conseguenze avverse per la tiroide. In particolare la carenza di iodio provoca la comparsa di diverse patologie denominate disordini da carenza iodica. Per prevenire la comparsa di queste patologie l'OMS raccomanda l'aggiunta di iodio al sale da cucina.

Altre fonti di iodio sono presenti nella dieta e includono alimenti di origine animale, vegetali, (esempio alghe marine) e integratori alimentari. Attualmente è in atto da parte del Ministero della Salute una campagna di informazione rivolta sia al consumatore, in cui lo si invita ad utilizzare preferibilmente il sale arricchito con iodio, sia ai produttori di alimenti già pronti, a cui è consentito di poter apporre sui prodotti che utilizzino nella preparazione sale arricchito di iodio un logo approvato dal Ministero.

Alla luce di un possibile incremento nell'uso di questi alimenti arricchiti, si vuole stimare il loro reale contenuto di iodio anche in funzione delle possibili perdite nel corso dei processi tecnologici.

Risultati attesi nel triennio

Sono attualmente utilizzabili diverse metodiche analitiche per determinare il contenuto di iodio negli alimenti; nel caso specifico si vuole mettere appunto una metodica che risenta il meno possibile dell'influenza della matrice. Tale metodica prevede la tecnica della cromatografia a scambio ionico collegata ad un rivelatore ad Amperometria pulsata con elettrodo di argento. Sarà inoltre effettuata preliminarmente una indagine conoscitiva delle varie tipologie di prodotti alimentari pronti all'uso presenti sul mercato in cui viene dichiarato l'uso di sale arricchito di iodio.

Trasferibilità dei risultati

Le informazioni derivanti dal progetto saranno utilizzate per stimare il reale introito di iodio nella dieta giornaliera che queste nuove tipologie di alimenti possono apportare all'individuo; e potranno essere condivise con tutti i soggetti coinvolti nella produzione, valutazione e utilizzo degli alimenti arricchiti (Autorità centrali e operatori dell'SSN, comunità scientifica, industrie produttrici e consumatori).

Valutazione dell'esposizione al rischio derivante da residui di farmaci ad azione antibatterica in alimenti di origine animale e vegetale

Farmaci ad azione antimicrobica sono largamente impiegati nell'allevamento degli animali da reddito e, conseguentemente, il loro uso determina la presenza di residui negli alimenti di origine animale. Ciò desta preoccupazioni per la salute del consumatore tanto da aver indotto l'UE ad introdurre nella propria legislazione concentrazioni massime di residui tollerate note come Limiti Massimi di Residui (LMR). Pur tuttavia, il quadro normativo attuale soffre di talune lacune, quali: i) assenza di LMR per alcune specie animali definite "minori"; ii) assenza di LMR sui prodotti trasformati. Queste carenze non consentono di valutare con precisione il rischio cui il consumatore è esposto. Inoltre, negli ultimi anni, si sta assistendo ad un crescente ricorso a molecole ad attività antibatterica anche in agricoltura, con possibili ricadute sulla salute dei consumatori. Premesso quanto sopra, si ritiene opportuno avviare un'attività di ricerca che si muova lungo le seguenti direttrici principali:

- studi *in vivo* di farmacocinetica e deplezione su specie animali minori;
- monitoraggio su specie vegetali allo scopo di stimare l'attuale esposizione al rischio e rilevare situazioni anomale e/o pericoli emergenti;
- valutazione delle modificazioni quali-quantitative indotte dai processi sui residui in alimenti trasformati;
- sviluppo di metodi idonei al controllo analitico di residui di farmaci ad azione antibatterica in matrici alimentari.

Risultati attesi nel triennio

- Produzione di dati che consentano una rivisitazione delle norme attuali e in particolare la fissazione di LMR più coerenti con una valutazione dell'esposizione al rischio reale. A riguardo si ricorda che gli LMR fissati dal Regolamento CEE 2377/90 o sono assenti o sono frutto di estrapolazione per le specie cosiddette minori e comunque anche nel caso delle specie maggiori sono riferiti ad alimenti non trattati cioè non prendono in considerazione le variazioni quali-quantitative che i diversi processi di produzione inducono sui residui;
- Valutazione dell'esposizione al rischio per i consumatori comprensiva anche del contributo dato dall'ingestione di residui di farmaci ad azione antibatterica eventualmente riscontrabili in alimenti di origine vegetale.
- Messa a punto di modelli sperimentali in cui metodi analitici di screening, post-screening e conferma essendo stati sviluppati e ottimizzati in modo complementare e interdipendente, potranno costituire efficaci ed esaustivi sistemi integrati per la ricerca e la determinazione di residui di farmaci ad azione antibatterica in matrici alimentari diverse.

Trasferibilità dei risultati

I risultati attesi contribuiranno a fornire un supporto metodologico della più ampia flessibilità e applicabilità al Programma Nazionale Residui e alla Autorità preposte al controllo e/o alla verifica dei piani di autocontrollo nel settore alimentare.

Inoltre, il conseguimento dell'obiettivo relativo allo studio delle modificazioni quali-quantitative indotte dai processi sui residui in alimenti trasformati ha come possibile ricaduta la rivisitazione delle norme attuali per renderle maggiormente realistiche e coerenti con le attuali conoscenze. Gli LMR fissati dall'UE non considerano che la trasformazione può indurre variazioni sia qualitative che quantitative nei residui. Emblematico è in proposito il caso dei sulfamidici nelle carni suine fresche che da valori sotto il limite possono superarlo per effetto della stagionatura. La produzione di dati in merito è presupposto indispensabile per l'emanazione di norme che disciplinino la materia in modo più appropriato e puntuale.

Valutazione dell'esposizione da micotossine in soggetti affetti da celiachia

Questo progetto si propone di valutare l'esposizione alle micotossine in gruppi di popolazione potenzialmente a rischio quali i soggetti affetti da celiachia. La possibile correlazione tra micotossine e celiachia nasce dal fatto che la dieta dei pazienti celiaci è generalmente molto ricca di mais, cereale privo di glutine, ma fortemente a rischio di contaminazione da micotossine.

Allo scopo saranno definiti modelli di dieta ad hoc sulla base dei quali si effettuerà sia una valutazione dei consumi alimentari dei prodotti costituenti i modelli di dieta stessa, sia una campionatura di prodotti alimentari destinati ai celiaci e non, in siti di campionamento rappresentativi del territorio nazionale (centri ingrosso, punti vendita). Su tali campioni sarà effettuata l'indagine conoscitiva relativamente alla contaminazione dalle principali micotossine. Sarà sviluppata, inoltre, una metodologia parallela (*duplicate diet*) su un numero ristretto di soggetti volontari ai quali saranno prelevate porzioni dei tre pasti principali e di altri prodotti eventualmente consumati *per die*. Infine, allo scopo di stabilire una correlazione lineare tra l'esposizione valutata secondo quanto sopradescripto e la esposizione calcolata secondo approcci indiretti (biomarcatori), saranno prelevati campioni di latte materno di mamme celiache in allattamento su cui effettuare analisi di micotossine. In tal modo si acquisiranno informazioni sull'esposizione sia della mamma che del bambino.

Risultati attesi nel triennio

Recentemente, con il Regolamento 1126/2007, la Commissione Europea ha ridefinito i limiti massimi tollerabili per le fumonisine, il deossinivalenolo e lo zearalenone; in precedenza il Regolamento 1881/2006 aveva definito i livelli massimi tollerabili anche per aflatossine e ocratossina A. Pertanto molte delle micotossine di maggiore interesse sono attualmente regolate da disposizioni legislative. Non sono ancora regolamentate le tossine T-2 e HT-2, la cui tossicità è stata ampiamente accertata, ma per le quali non è ancora possibile stabilire limiti massimi a causa della mancanza di dati attendibili sull'esposizione della popolazione europea. Va tuttavia rilevato che i limiti vengono spesso stabiliti senza la specifica considerazione di soggetti particolarmente esposti, in quanto spesso mancano dati specifici. Questo progetto si propone di ottenere una reale stima della valutazione della esposizione dei soggetti celiaci alle micotossine in modo da poter consentire una valutazione del rischio formulata *ad hoc* per questa particolare fascia di popolazione e la definizione di eventuali limiti mirati.

Lo studio sul latte materno di mamme affette da celiachia inoltre permetterà di valutare se questo prezioso alimento possa in questo caso essere fonte di rischio per il lattante a causa della maggiore esposizione della mamma, anche in considerazione del fatto che studi precedenti hanno evidenziato nel latte materno la presenza di livelli considerevoli di micotossine.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti verranno trasferiti all'EFSA e alle autorità competenti nazionali e comunitarie incaricate della gestione del rischio, per la relativa considerazione in termini di adeguatezza degli attuali limiti di legge. In altre parole potrebbe essere opportuno che gli alimenti per celiaci, come peraltro già avviene ad esempio per gli alimenti per l'infanzia, abbiano limiti per le micotossine più restrittivi rispetto a quelli della popolazione generale.

I risultati della ricerca saranno inoltre diffusi attraverso gli usali canali di divulgazione scientifica quali pubblicazioni su riviste scientifiche, workshop e congressi.

Valutazione della contaminazione virale nei molluschi eduli lamellibranchi ai fini della prevenzione della trasmissione di infezioni virali all'uomo

La disponibilità di dati sulla prevalenza di virus enterici nei molluschi bivalvi è una necessità espressa a livello europeo, al fine di stabilire i relativi criteri microbiologici da inserire nella

revisione del Reg.CE 2073/2005 e 1441/2007. In collaborazione con gli IZS, le Università e le Regioni, verranno progettati piani di monitoraggio su aree di produzione di molluschi eduli lamellibranchi di interesse nazionale al fine di valutare l'incidenza delle contaminazioni virali (virus dell'epatite A, Norovirus, enterovirus e virus enterici emergenti) anche in relazione ad eventuali altri contaminanti (i.e. di natura batterica), il loro legame con i fattori ambientali e meteorologici e l'impatto di eventuali fonti di contaminazione esogena antropica, agricola e/o industriale sulle aree di produzione. Parallelamente si procederà alla definizione dell'epidemiologia delle infezioni virali a trasmissione alimentare nella popolazione. Saranno usate metodiche di analisi molecolare (inclusa la caratterizzazione dei virus rilevati) e sistemi di georeferenziazione. Lo studio consentirà, oltre alla definizione della rilevanza dei virus come problema sanitario nei molluschi, di migliorare i piani di classificazione e sorveglianza delle aree di produzione, tenendo conto della molteplicità dei fattori in grado di influire sulle caratteristiche igieniche del prodotto, e di utilizzare tali conoscenze a scopi predittivi per la gestione delle modalità di controllo e di chiusura delle aree.

Risultati attesi nel triennio

- Definizione della presenza di virus gastroenterici nei molluschi eduli lamellibranchi in relazione alle caratteristiche delle aree di produzione, alle condizioni ambientali e alle possibili fonti di contaminazione; presenza di eventuali virus emergenti e definizione dei genotipi virali circolanti.
- Definizione di uno schema di ricerca per i virus a trasmissione alimentare nelle feci e nei campioni alimentari.
- Selezione di metodi di ricerca e di caratterizzazione standardizzati e condivisi a livello nazionale; sviluppo degli adeguati controlli per l'applicazione dei metodi secondo gli standard di qualità definiti dalla norma ISO 17025.
- Applicazione di procedure di analisi del rischio per la classificazione delle aree di produzione con possibilità di modulazione delle attività di controllo in funzione delle caratteristiche delle medesime.

Trasferibilità dei risultati

Disponibilità di dati di prevalenza da utilizzare per la definizione dei criteri microbiologici relativi ai virus enterici nei molluschi bivalvi.

Trasferibilità dei risultati alle Autorità Competenti regionali per l'implementazione di piani di monitoraggio per la classificazione e la sorveglianza delle zone di produzione.

Valutazione della esposizione della popolazione italiana e di gruppi vulnerabili alle micotossine presenti nei prodotti alimentari

Le micotossine sono contaminanti frequentemente riscontrabili in un gran numero di matrici alimentari e in grado di esercitare effetti a lungo, medio e breve termine sull'uomo e sugli animali. Questo progetto, sulla base delle conoscenze tossicologiche già disponibili in letteratura, si propone di valutare il rischio da micotossine tramite la valutazione dell'esposizione in campioni alimentari sia attraverso l'approccio deterministico che probabilistico. Ad oggi in Italia non esiste una valutazione del rischio che includa sia una visione dinamica nel tempo e nella distribuzione geografica, sia l'articolazione per gruppi di popolazione e di alimenti. Il campionamento degli alimenti avverrà secondo piani di campionamento *ad hoc*, avvalendosi della collaborazione degli IZS per le fasi di campionamento e analisi. Per i dati di consumo si farà riferimento a quelli attualmente disponibili (INRAN). Nell'arco dei tre anni ci si propone anche di valutare l'esposizione di un gruppo di donne in gravidanza monitorando la loro alimentazione, successivamente verrà

valutata l'esposizione del lattante e durante lo svezzamento ricorrendo anche al dosaggio di biomarcatori come nel caso della aflatossina M1 nel latte materno.

Risultati attesi nel triennio

Il principale risultato del progetto consiste nella possibilità di ottenere una valutazione dell'esposizione basata su dati di incidenza di contaminazione omogenei ottenuti da campioni prelevati e analizzati secondo criteri definiti e adeguati allo scopo. Lo studio sulle donne in gravidanza e sui bambini, oltre a fornire la valutazione della esposizione di un gruppo particolarmente vulnerabile come i bambini sotto i tre anni, permetterà anche una migliore definizione di alcuni processi di *carry over*. La conoscenza delle abitudini alimentari, dei livelli di contaminazione degli alimenti consumati e del latte materno permetterà di valutare la relazione tra la presenza di aflatossina B1 negli alimenti e il livello di contaminazione da aflatossina M1 nel latte materno, insieme alla valutazione della esposizione del lattante.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto prevede di organizzare una giornata conclusiva espressamente dedicata al trasferimento dei dati rivolta a tutti i soggetti a vario titolo interessati. In particolare la collaborazione con gli IZS, prevista per tutta la durata del progetto, fornirà l'occasione ulteriore per uno scambio costante di informazioni e risultati. I piani di campionamento studiati *ad hoc* per la valutazione dell'esposizione alle micotossine, i metodi multi-micotossina validati in seno al progetto, sempre in collaborazione con gli IZS, allo scopo di ottimizzare i tempi di analisi, nonché le valutazioni della esposizione saranno oggetto di pubblicazione su riviste scientifiche internazionali del settore. Sempre in considerazione della collaborazione prevista con gli IZS sarà possibile stendere delle linee guida utilizzando i risultati di questo progetto come *case study*.

Valutazione della esposizione della popolazione italiana al cadmio con la dieta

La presenza dei metalli tossici con la dieta è regolamentata a livello comunitario dal Regolamento 1881/2006 che definisce limiti massimi di tollerabilità dei metalli in diversi gruppi di alimenti.

Recentemente (2009) l'EFSA ha revisionato il limite di assunzione settimanale per il cadmio riducendo in maniera significativa il PTWI.

Risulta pertanto indispensabile, anche alla luce della recente (2009) pubblicazione INRAN dei dati di consumo alimentari nazionali, calcolare le esposizioni della popolazione italiana generale e dei segmenti di popolazione vulnerabile al cadmio al fine di valutare la adeguatezza sanitaria della legge vigente.

Saranno determinati i livelli di cadmio negli alimenti mediante predisposizione campionatura secondo modello *Codex Alimentarius*.

Le determinazioni saranno effettuate con Metodi AAS e ICP-MS.

I livelli di cadmio determinati saranno combinati con i dati di consumo INRAN recentemente aggiornati (2009).

Risultati attesi nel triennio

Ottenimento livelli di contaminazione delle diverse fonti alimentari che contribuiscono all'*intake* di cadmio.

Dati sull'esposizione della popolazione e loro confronto con i recenti limiti tossicologici emanati.

Messa a punto e validazione metodi di analisi per il controllo ufficiale del cadmio negli alimenti in accordo con le disposizioni comunitarie.

Trasferibilità dei risultati

Eventuale revisione dei limiti massimi comunitari di cadmio negli alimenti.
Trasferimento ai laboratori dell'SSN di metodi per il controllo ufficiale.

Valutazione della performance del metodo ISO 22964 e sviluppo di un protocollo di Real Time PCR per la determinazione di *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*) nel latte e nei prodotti a base di latte

Enterobacter sakazakii, bacillo Gram-negativo appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, è stato di recente classificato come *Cronobacter spp*. Si tratta di un patogeno emergente associato a casi di infezioni, piuttosto gravi (meningiti ed enterocoliti necrotizzanti), in neonati alimentati con latte in polvere contaminato. Quest'ultimo, infatti, è un prodotto non sterile in grado di supportarne la crescita. I dati disponibili in letteratura riportano bassi livelli di contaminazione nel prodotto finito; in quest'ultimo però, si può raggiungere rapidamente il valore della dose infettante se sottoposto ad impropria manipolazione. Nasce quindi, la necessità di valutare se il metodo ISO 22964, attualmente disponibile per la ricerca di *E. sakazakii* (*Cronobacter spp*) nel latte e nei prodotti a base di latte è in grado di mettere in evidenza anche bassi livelli del patogeno. A tale proposito, vari autori hanno dimostrato come la fase di pre-arricchimento sia il passaggio critico nella detection del microorganismo, in particolare quando presente con altri coliformi. Lo studio in oggetto si prefigge quindi lo scopo di saggiare l'efficienza di differenti liquid media di pre-arricchimento valutandone la capacità nell'evidenziare il microorganismo presente a differenti concentrazioni, in latti in polvere sperimentalmente contaminati e parallelamente di valutare la performance di differenti terreni selettivi cromogeni, disponibili in commercio, per l'isolamento selettivo di *E. sakazakii* (*Cronobacter spp*).

Nello stesso tempo si metterà a punto un metodo quantitativo, rapido e affidabile non *culture-dependent* sviluppando un protocollo di *Real-Time* PCR basato sulla quantificazione del gene 16S rRNA di *E. sakazakii*.

Risultati attesi nel triennio

Valutazione della performance dei *liquid media* utilizzati nella fase di pre-arricchimento.

Valutazione della performance dei terreni selettivi cromogeni utilizzati per l'isolamento selettivo.

Valutazione della performance del metodo ISO 22964.

Valutazione della performance del protocollo di *Real-Time* PCR nella determinazione di *E. sakazakii* (*Cronobacter spp*).

Trasferibilità dei risultati

Miglioramento della performance del metodo ISO 22964.

Disponibilità di un metodo quantitativo per la rapida determinazione di *E. sakazakii* (*Cronobacter spp*) negli alimenti destinati alla prima infanzia.

Valutazione delle caratteristiche microbiologiche, genetiche e immunologiche di *Brucella spp.* e di *Bacillus anthracis*

Nell'ambito dello studio delle caratteristiche microbiologiche e immunologiche di *Brucella spp.* e *Bacillus anthracis*, responsabili di malattie batteriche a carattere zoonosico, il presente progetto si prefigge di approfondire tematiche legate ai piani di profilassi di Stato per le brucellosi animali e per il carbonchio ematico.

In particolare, le problematiche di interesse riguarderanno lo studio delle interazioni patogeno-ospite, conoscenza indispensabile per la messa a punto di strumenti diagnostici più efficaci e di presidi immunizzanti innovativi.

Gli obiettivi del progetto sono:

- messa a punto e valutazione comparativa della specificità e sensibilità delle tecniche sierologiche e biomolecolari utilizzate per la tipizzazione di ceppi di *Brucella spp* e di *Bacillus anthracis*;
- studio dei geni coinvolti nella sintesi del lipopolisaccaride (LPS) di *Brucella spp.*, considerato uno dei principali fattori di virulenza del microrganismo;
- messa a punto e valutazione, condotta su animali da laboratorio e di elezione, di presidi immunizzanti innovativi per la profilassi vaccinale delle brucellosi animali e del carbonchio ematico. In particolare, verrà convalidata sul campo la capacità protettiva del ceppo rugoso *B. melitensis* B115 che ha dimostrato di possedere caratteristiche favorevoli per un suo uso come vaccino anti-brucellare in animali da laboratorio. Per la profilassi del carbonchio ematico, a seguito della recente autorizzazione all'impiego anche nel nostro Paese del vaccino avirulento "Sterne", in sostituzione dei vaccini di tipo "Pasteur", in collaborazione con il Centro di Referenza Nazionale per l'Antrace di Foggia, verranno condotti studi di approfondimento sui protocolli vaccinali più idonei a garantire una buona capacità protettiva a medio e lungo termine. Contestualmente, verrà valutata l'efficacia di vaccini ricombinanti sperimentali, completamente avirulenti, che saranno testati su animali di laboratorio e su animali target, in parallelo con il ceppo Sterne.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi riguardano:

- la messa a punto test sierologici con elevata performance per il rilievo degli anticorpi diretti verso ceppi brucellari con fenotipo liscio e rugoso;
- l'identificazione di ceppi di *B. melitensis* in fase rugosa con caratteristiche vaccinali favorevoli (attenuazione, immunogenicità, mancanza di interferenza sierologica) da utilizzare nella profilassi ovi-caprina in sostituzione del vaccino classico Rev1 a virulenza residua;
- l'identificazione dei geni responsabili del fenotipo liscio o rugoso di *Brucella spp.* e dei geni coinvolti nei meccanismi di virulenza di *Brucella spp.* e di *B. anthracis*;
- l'identificazione di vaccini ricombinanti completamente avirulenti in grado di indurre una risposta protettiva immediata, da utilizzarsi in situazioni di emergenza in aggiunta o in sostituzione del vaccino ufficiale Sterne.

Trasferibilità dei risultati

Le acquisizioni specifiche che gli studi previsti dal progetto dovrebbero produrre, contribuirebbero significativamente al rafforzamento delle misure di sorveglianza sieropidemiologica previste dai piani di eradicazione delle brucellosi animali e dal piano di profilassi per il carbonchio ematico.

Valutazione di metodi rapidi per la determinazione di batteri e virus negli alimenti

Le tossinfezioni alimentari rappresentano un serio problema di sanità pubblica per l'alto numero di soggetti che possono essere colpiti in un singolo evento epidemico. Nei Paesi industrializzati si stima che fino a circa il 30% della popolazione sia colpito ogni anno da un episodio tossinfettivo.

Gli agenti eziologici più comunemente coinvolti nelle infezioni veicolate da alimenti includono batteri e virus, in particolare Salmonella, per cui esistono programmi di sorveglianza internazionale organizzati al fine di monitorare la frequenza e la distribuzione degli eventi epidemici, *Campylobacter*, *C. botulinum* e virus enterici (HAV e NoV).

Per tale motivo è generalmente sentita la necessità di disporre di metodiche rapide che possano condurre alla risposta nel tempo più breve possibile. Così, inizialmente, si è dato gradualmente spazio a metodiche "rapide" basate sugli stessi procedimenti dei metodi colturali classici, ma

“miniaturizzate”. Tali metodiche, però, non riuscivano a soddisfare le tutte le aspettative. Così, agli inizi degli anni '80 sono stati sviluppati diversi metodi immunologici e tecniche molecolari per l'analisi del DNA, in seguito applicati anche alle analisi microbiologiche di routine.

Il progetto si propone la messa a punto di metodiche innovative con particolarmente riferimento alla *Real Time* PCR. Per la determinazione e quantificazione di agenti patogeni potenzialmente contaminanti le varie derrate alimentari di origine vegetale quali *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* termotolleranti ed *Escherichia coli* 0157:H7 e virus enterici (epatite A, norovirus ed enterovirus).

Queste metodiche devono essere sottoposte a circuiti di validazione, che prevedono una valutazione del metodo alternativo in comparazione dei metodi ISO (laddove disponibili) oppure di metodi di riferimento internazionalmente riconosciuti in accordo alla ISO 14140:2003.

Questa attività rientrano nell'ambito di progetti europei (progetto *Biotracer* e *Baseline*) e nell'ambito di progetti nazionali finanziati dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali.

Risultati attesi nel triennio

Elaborazione e validazione di metodiche analitiche rapide per la determinazione e quantificazione di agenti patogeni potenzialmente contaminanti le varie derrate alimentari.

Trasferibilità dei risultati

Lo sviluppo di nuovi metodi armonizzati e validati per la determinazione dei patogeni batterici e virali, oltre ad essere condiviso con tutta la rete degli IZS verrà reso disponibile per i differenti laboratori dell'SSN operanti nel controllo degli alimenti.

Il pannello di analisi condivise tra IZS e ISS contribuirà al miglioramento e all'integrazione delle attività istituzionali di entrambe le tipologie di Enti coinvolti, e forniranno un presupposto scientifico all'SSN nelle analisi finalizzate alla raccolta di informazioni organizzate, presupposto per una reale sorveglianza epidemiologica, spendibile anche a livello comunitario.

Valutazioni nutrizionali in relazione all'assunzione di acque minimamente mineralizzate

In Italia il consumo medio annuo *pro capite* di acqua minerale è di circa 190 litri, tra i più alti in Europa e nel mondo. Non esiste un'acqua minerale migliore di tutte le altre, ma si può trovare quella più consona alle proprie esigenze metaboliche verificando i valori dei sali riportati in etichetta. Comunque esistono delle controindicazioni e limitazioni all'uso di alcuni tipi di acqua legate alla loro composizione e alle condizioni individuali del consumatore, tale dato importante non è mai riportato in etichetta. Le acque minimamente mineralizzate aumentano la diuresi, sono indicate nelle calcolosi delle vie urinarie, favoriscono l'eliminazione di acido urico e dei prodotti del catabolismo, vengono utilizzate in età pediatria per la ricostituzione del latte in polvere in quanto non modificano la sua composizione salina. Tuttavia bisogna considerare che numerosi studi hanno evidenziato gli effetti benefici di riduzione del rischio di patologie cardiovascolari associati al consumo di acqua con elevati livelli di calcio e magnesio; inoltre l'assunzione di acque con bassi livelli di questi elementi è stata associata all'aumento del rischio di fratture nel bambino, di alcune malattie neurodegenerative, di disturbi della gravidanza e di certi tipi di cancro. Scopo di questo studio è quello di raccogliere dati sulla composizione di acque minimamente mineralizzate per valutare il potenziale rischio legato ad un'assunzione continua da parte di un individuo che non ha bisogno di utilizzare questo tipo di acque.

Risultati attesi nel triennio

Saranno esaminati i contenuti salini delle 335 acque minerali riconosciute in Italia, tali dati sono ottenuti dalle analisi condotte dai laboratori autorizzati dal Ministero della Salute e che annualmente le aziende imbottigliatrici debbono presentare agli organi di controllo ufficiale.

Saranno estrapolate le acque minimamente mineralizzate con un contenuto salino inferiore a 50 mg/l, saranno considerati i livelli di calcio, magnesio e altri ioni eventualmente correlati quali lo stronzio. Verrà calcolata la quantità di *intake* giornaliero di questi elementi dovuta all'acqua assunta, considerando sia la quantità media di acqua ingerita dalla popolazione italiana sia quella raccomandata. Insieme ai dati relativi all'apporto dei diversi alimenti si valuterà *intake* giornaliero e l'eventuale potenziale rischio associato ad una elevata ingestione di tale categoria di acque da parte di gruppi di popolazione a rischio.

Trasferibilità dei risultati

Le informazioni ricavate dal progetto potranno essere condivise con tutti i soggetti coinvolti nella produzione, valutazione e utilizzo delle acque minerali (autorità centrali e operatori dell'SSN, comunità scientifica, industrie imbottigliatrici, consumatori) attraverso pubblicazioni scientifiche, seminari, comunicazioni a congressi, informazioni sul sito web del Dipartimento. I risultati ottenuti potrebbero essere utili per una riformulazione dell'etichetta delle acque minerali, esplicitando specifiche avvertenze d'uso.

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 Istituti Zooprofilattici (IZS) e il Reparto di Profilassi e controllo delle zoonosi batteriche del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare dell'ISS.

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.

Piano triennale

Si riporta in dettaglio l'attività specifica che costituirà la base dell'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) nel triennio 2009-2011:

- 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 farmacovigilanza 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'Unione Europea, Farmacopea Italiana ed Europea, EMEA (Agenzia Europea per la Valutazione del Farmaco), OMCL (*Official Medicines Control Laboratories*).
- Attività di intervento ispettivo presso gli IZS per produzione 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 il raccordo con quelle svolte dagli Stati membri dell'Unione Europea, nonché con i Paesi membri dell'*Organisation for Economic Co-operation and Development* 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.

Piano triennale

Anche per il triennio 2009-2011 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

- 1a. Ricerca di residui e contaminanti negli animali e negli alimenti.
- 1b. Ricerca degli additivi nei mangimi.
2. Controllo dei medicinali veterinari in commercio in base all'accordo Ministero della Salute e Istituto Superiore di Sanità.
3. Analisi di conferma.

Piano triennale

Anche nel triennio 2009-11 continuerà l'attività di controllo di residui e contaminanti negli animali e negli alimenti. In particolare: ricerca degli additivi nei mangimi; controllo dei medicinali veterinari in commercio in base all'accordo Ministero della Salute e ISS; analisi di conferma. In questo contesto, saranno messi a punto e validati metodi di analisi per la loro determinazione negli alimenti e in campioni biologici.

Diagnosi e caratterizzazione di ceppi microbiocci isolati o da isolare

Al Dipartimento SPVSA pervengono richieste da parte di laboratori del controllo ufficiale o da altre istituzioni dell'SSN di ricerca, di tipizzazione e caratterizzazione di ceppi patogeni sia in relazione a controlli ufficiali che a episodi di tossinfezioni alimentare. In maniera particolare 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 vibriani 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. Nel caso del *C. botulinum*, 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, gli unici metodi attualmente riconosciuti e validati, sono un metodo colturale (ricerca di spore di *Clostridium botulinum* e altri clostridi neurotossigeni) e un metodo biotossicologico (*mouse bioassay*), che prevede l'uso di animali da laboratorio (ricerca di tossine botuliniche).

Piano triennale

Il Dipartimento continuerà a far fronte alle richieste che perverranno dai laboratori del controllo ufficiale o da altre istituzioni dell'SSN di ricerca di tipizzazione e caratterizzazione di ceppi patogeni sia in relazione a controlli ufficiali che a episodi di tossinfezioni alimentare. 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 (acidi grassi con più di 24 atomi di carbonio) rappresentano una piccolissima quota degli acidi grassi totali del plasma e il loro incremento, dovuto a deficit della loro degradazione, è considerato un *marker* per le malattie perossisomiali. In seguito ad una collaborazione scientifica nata nel 1992 con l'Ospedale pediatrico Bambino Gesù, l'ISS è interessato allo studio di alcuni aspetti, tra i quali quello diagnostico, dell'adrenoleucodistrofia, la più frequente delle malattie perossisomiali. Per superare la difficoltà di interpretazione dei risultati dovuta alla bassa concentrazione dei VLCFA nel plasma, è stato identificato un parametro biochimico più affidabile per l'identificazione del difetto perossisomiale. (Di Biase,

et al. C24:0/C22:0 ratio in plasma sphingomyelin as a practical tool for the diagnosis of adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. *Clin Chem Enzym Comms* 1995;7:35.40). Dal 1995 vengono effettuati circa 100 dosaggi annuali di VLCFA su richiesta di ASL, Cliniche universitarie e IRCCS.

Piano triennale

Anche nel triennio 2009-2011 continuerà l'attività di dosaggio di acidi grassi a catena molto lunga (*Very Long Chain Fatty Acids*, VLCFA) su campioni di siero per la diagnosi di adrenoleucodistrofia, una patologia caratterizzata dall'accumulo di VLCFA nel Sistema Nervoso Centrale e nel surrene.

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 (esempio epatite A a Napoli), per verificare la presenza di Norovirus o HAV in prodotti della pesca.

Piano triennale

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 colture cellulari.

Interrogazioni parlamentari

Il Ministro del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali è chiamato spesso a rispondere in sede parlamentare a quesiti su problemi di sanità pubblica correlati alla sicurezza alimentare.

Il Dipartimento SPVSA provvede alla stesura di pareri, per la parte di propria competenza, su problematiche concernenti la contaminazione e i rischi alimentari. Si tratta di pareri che, per l'urgenza (dieci giorni) e la complessità della risposta, necessitano di un notevole impegno da parte di più ricercatori.

Piano triennale

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 Buone Pratiche di Laboratorio (BPL) in base al DL.vo 120/1992;
- valutazione degli impianti di irraggiamento nei Paesi terzi;
- verifica di conformità alla norma ISO 17025 dei laboratori pubblici (DL 156/97) nell'ambito dell'attività del ORL (Organismo di Riconoscimento dei Laboratori);
- verifica dei laboratori degli IZS che svolgono controllo dei prodotti alimentari destinati all'esportazione verso gli USA (su incarico Ministero della Salute);
- ispezione, e reispesione quinquennale, degli stabilimenti che producono alimenti dietetici e integratori alimentari ai sensi del DL 111/92 (su incarico del Ministero della Salute).

Piano triennale

Verrà proseguita l'attività delle visite ispettive e in particolare:

- verifica ministeriale (Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali) dei laboratori che effettuano analisi ai fini dell'autocontrollo alimentare;
- valutazione dei centri di saggio per prove sperimentali non cliniche secondo le Buone Pratiche di Laboratorio (BPL) in base al DL.vo 120/1992;
- valutazione degli impianti di irraggiamento nei Paesi terzi;
- verifica di conformità alla norma ISO 17025 dei laboratori pubblici (DL 156/97) nell'ambito dell'attività del ORL (Organismo di Riconoscimento dei Laboratori);
- verifica dei laboratori degli IZS che svolgono controllo dei prodotti alimentari destinati all'esportazione;
- ispezione, e reispesione quinquennale, degli stabilimenti che producono alimenti dietetici e integratori alimentari ai sensi del DL 111/92 (su incarico del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali).

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 del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali. Per quel che concerne gli aspetti tecnico-scientifici il Ministero si avvale della collaborazione dell'ISS e in particolare del Dipartimento SPVSA.

Piano triennale

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 Nazionale di Riferimento per: i) Analisi e prove sul latte e prodotti a base di latte; ii) Controllo della contaminazione microbiologica e virale dei molluschi bivalvi; iii) Residui limitatamente a Micotossine, Antibiotici e sulfamidici e Metalli in traccia; iv) Botulino, il Dipartimento SPVSA deve organizzare e/o partecipare ai circuiti interlaboratorio organizzati dai rispettivi Laboratori Comunitari di Riferimento (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.

Piano triennale

Nell'ambito dei diversi Laboratori Nazionali di Riferimento verranno proseguite le attività proprie di queste strutture (assistenza ai laboratori di controllo territoriali, sviluppo di nuove procedure, preparazione materiali di riferimento, ecc.).

Lo svolgimento di tali attività richiede la disponibilità di ricercatori e tecnici altamente qualificati e anche adeguate risorse finanziarie.

Si prevede, inoltre, l'organizzazione di un programma di confronto interlaboratorio per la valutazione esterna di qualità relativa al dosaggio di metalli (As, Cd e Pb) nel latte vaccino.

Pareri

In qualità di organo tecnico dell'SSN, l'ISS è investito da varie istituzioni nazionali di richieste di parere su problematiche attinenti a varie aree e in particolare quella della qualità e

sicurezza degli alimenti. Spesso tali pareri conseguono ad allerte alimentari e non sempre si esauriscono in una relazione tecnica; in alcuni casi infatti i dati necessari alla risposta debbono essere prodotti attraverso specifiche indagini di laboratorio. A tutt'oggi i pareri hanno riguardato le seguenti problematiche: i contaminanti chimici e biologici di origine ambientale (metalli tossici, IPA, organoalogenati, alchilfenoli, micotossine, ficotossine, batteri patogeni e virus), i contaminanti da processo (acrilamide, IPA, Sudan), i contaminanti conseguenti ai trattamenti farmacologici di colture e allevamenti (residui di antibiotici e sulfamidici, nitrofurani), nuove tecnologie per la produzione (OGM), la trasformazione (alte pressioni, bioconservanti, fermenti lattici, enzimi, irraggiamento), il trasporto degli alimenti (sistemi di protezione). Sono stati altresì elaborati pareri sulla sicurezza ed efficacia di nutrienti funzionali ad attività antiossidanti, di estratti vegetali e sull'ingannevolezza dei messaggi pubblicitari.

Piano triennale

Verrà proseguita l'attività di consulenza al Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali e ad altre strutture dell'SSN in merito a problematiche di competenza del Dipartimento. Prevedibilmente verranno affrontati problemi di emergenza di sicurezza alimentare (contaminazioni chimiche e microbiologiche) e di sanità pubblica veterinaria.

Questa attività richiede l'intervento di alta professionalità da parte dei ricercatori del Dipartimento.

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 al 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 del WTO e dell'Unione Europea, 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 del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali 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* – partecipazione Gruppi: Igiene degli alimenti, Additivi e contaminanti, Latte e prodotti derivati, Carne e derivati, Pesce e prodotti della pesca, Biotecnologie, Prodotti dietetici.
- OECD – Gruppi Biotecnologie e Sicurezza.
- Commissione Europea – gruppi tecnici: Gruppo esperti Criteri microbiologici, Contaminanti industriali, Contaminanti agricoli.
- Unione Europea – CEN: Micotossine, OGM, Contaminazione microbica, Validazione metodi microbiologici, Metodi per la determinazione dei microrganismi utilizzando PCR, Determinazione dei virus negli alimenti.
- Unione Europea – Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA): *Advirosy Forum e Focal Point*.
- Unione Europea – *European Network of GMO Laboratories* (ENGL).

– EMEA – 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 del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali e il Ministero delle Politiche Agricole.

Piano triennale

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 e alla sanità pubblica veterinaria.

Programmi di valutazione esterna di qualità in medicina preventiva e sicurezza alimentare

In tutti i settori di attività, comprese quelle di interesse per la salute pubblica, la maggior parte delle decisioni si basa su dati obiettivi ottenuti attraverso misurazioni di grandezze fisiche, chimiche o biologiche. È quindi essenziale garantire e documentare la qualità e la confrontabilità di risultati di misurazioni ottenuti in tempi e/o luoghi diversi. I programmi di prove valutative o programmi di valutazione esterna di qualità (VEQ), che consistono nell'analisi, da parte di più laboratori, di campioni identici o simili per una grandezza determinata e nella valutazione, da parte dell'organizzatore, dei risultati ottenuti in base a criteri di accettabilità prestabiliti, sono uno dei mezzi più efficaci per valutare la qualità delle misurazioni di routine. 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). Oltre al confronto dei propri risultati con quelli di altri laboratori, la partecipazione a programmi di VEQ può fornire: una verifica periodica e indipendente delle prestazioni del laboratorio; informazioni di ritorno che il laboratorio può utilizzare per il miglioramento delle proprie attività; opportunità per la formazione e l'addestramento del personale; informazioni per il confronto delle prestazioni di metodi e strumenti; informazioni in merito alla qualità di analisi specifiche in particolari settori, nazioni o aree geografiche.

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.

Attualmente il servizio offerto include 14 analiti in tre diverse matrici, per ciascuno dei quali vengono distribuiti a ciascun richiedente tre campioni in ciascuna di quattro diverse occasioni nel corso di un anno. I risultati vengono raccolti, sottoposti ad elaborazioni statistiche definite (analisi parametriche e non parametriche) e valutati per confronto con criteri di accettabilità prestabiliti. Tutti i partecipanti ricevono un rapporto individuale sull'esercizio.

Da ormai dieci anni è in atto una collaborazione a livello internazionale con organizzatori di analoghi programmi 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.

Piano triennale

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 (8) nelle urine) con le modalità già stabilite. All'inizio di ogni anno si eseguirà l'arruolamento, su base volontaria dei partecipanti, che consiste nell'invio di materiale informativo e nella raccolta delle

registrazioni ai singoli programmi e di informazioni specifiche sulle attività svolte dal laboratorio (numero di determinazioni effettuate per ciascun misurando nell'anno precedente e metodo utilizzato per la stima dell'incertezza di misurazione). Contestualmente si svolgeranno le attività di definizione della tipologia di campioni da utilizzare per le prove, in termini di concentrazioni, e il loro approvvigionamento. La strategia di distribuzione consiste nell'invio a ciascun laboratorio di campioni identificati con codici fittizi, diversi per ciascun laboratorio, e include la distribuzione di doppio non noti. Le operazioni di codifica e di distribuzione verranno registrate in modo tale da garantire la rintracciabilità dei campioni distribuiti. I laboratori partecipanti potranno analizzare i campioni con un metodo di propria scelta e dovranno riportare i risultati ottenuti su schede appositamente predisposte. In accordo alle norme internazionali nel corso del triennio è prevista l'introduzione della richiesta che i partecipanti riportino i risultati accompagnati dall'incertezza di misura. Per ciascun programma verranno effettuati quattro invii, ciascuno costituito da tre campioni. Al termine di ciascun invio, i dati verranno registrati ed elaborati con metodologie statistiche in accordo alla norma ISO 13528, inclusa la stima dell'incertezza del valore atteso. Al termine di ciascun invio ogni partecipante riceverà un rapporto sulla propria prestazione. In aggiunta all'attività di valutazione delle prestazioni dei singoli laboratori, verranno proseguite le attività volte ad armonizzare e migliorare le attività di VEQ nel settore mediante il confronto con analoghe iniziative a livello internazionale. 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'articolo 1 della Legge 30 aprile 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; proprio per questa ragione di recente si è proceduto all'accreditamento con l'ente nazionale ad esso preposto di alcune prove sia microbiologiche che chimiche. È evidente la necessità che questo riconoscimento venga esteso anche ad altre prove analitiche.

Piano triennale

Il Dipartimento proseguirà l'attività di revisione di analisi affidata all'ISS in base alla Legge n. 283 del 30 aprile 1962 con l'esperienza e la professionalità di ricercatori e tecnici, e la disponibilità di attrezzature e materiali specifici.

Ripetizioni di analisi

Il Dipartimento SPVSA esegue ripetizioni di analisi su campioni alimentari di provenienza estera su richiesta degli organi periferici del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali preposti alla vigilanza (PIF, UVAC, USMA).

Piano triennale

L'attività di ripetizione di analisi su campioni alimentari verrà proseguita da ricercatori e tecnici del Dipartimento.

Sistema di Assicurazione della Qualità

Al Dipartimento SPVSA, istituito nel dicembre 2007, afferiscono le competenze precedentemente ripartite tra il Dipartimento di Sanità Alimentare e Animale (SAAN) e il Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari (CNRA). Entrambe le strutture si erano dotate di un proprio Sistema di Gestione della Qualità (SGQ) ed erano state accreditate dal Sistema nazionale per l'accreditamento dei laboratori (SINAL):

- Con accreditamento n. 0779 l'ex Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale
- Accreditamento n. 0665 l'ex Centro Nazionale Qualità Alimenti e Rischi Alimentari.

Nel corso del 2008 il SGQ dell'ex CNRA e dell'ex Dipartimento SAAN sono stati sottoposti a verifica di sorveglianza SINAL che in entrambi i casi ha avuto esito positivo. A seguito del contingentamento nella nuova struttura del personale precedentemente afferente al Dipartimento SAAN e al CNRA avvenuto in data 12 maggio 2008, la Direzione ha nominato un Responsabile e un Sostituto Responsabile Assicurazione Qualità del Dipartimento SPVSA. È stato inoltre definito un piano del cambiamento, approvato dal SINAL, secondo il quale si prevede di realizzare l'unificazione dei due SGQ e dei relativi accreditamenti entro il 2009.

Piano triennale

La pianificazione delle attività relative all'SGQ per il triennio 2009-2011 prevede il completamento dell'unificazione degli SGQ dell'ex CNRA e dell'ex Dipartimento SAAN e dei relativi accreditamenti, nonché il processo di informatizzazione di alcune attività quali la gestione delle apparecchiature, l'accettazione campioni e la gestione della documentazione ufficiale inerente l'attività di prova. La Direzione ha inoltre identificato 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). Già nel corso dell'anno 2009 sono di conseguenza previste una verifica di sorveglianza SINAL per la conferma dell'accREDITAMENTO delle prove già accreditate e una verifica di estensione dell'accREDITAMENTO. Al fine di garantire il costante aggiornamento del personale impegnato nelle attività relative all'SGQ e la formazione del personale di nuovo inserimento, è prevista inoltre l'organizzazione di seminari di formazione interni.

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 EC 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 Laboratorio

Nazionale di Riferimento per le infezioni da *E. coli* e dalla Commissione Europea quale *Community Reference Laboratory (CRL) for E. coli, including Verotoxigenic E. coli (VTEC)*.

Piano triennale

Le attività dei Laboratori di Riferimento continueranno nel triennio 2009-11 e includeranno:

- il coordinamento delle attività dei Laboratori Nazionali di Riferimento 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 stipti di *E. coli* e indagini diagnostiche su pazienti con sospetto di infezione da VTEC, in particolare casi di sindrome emolitico uremica.

Il coordinamento delle attività dei Laboratori Nazionali di Riferimento 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'Autorità europea per la Sicurezza Alimentare (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'*European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)* per le infezioni da VTEC.

Sorveglianza e profilassi delle EST animali

Il Dipartimento esercita la funzione di "Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) per la caratterizzazione dei ceppi e la genetica delle EST animali". In particolare, in base al Reg. (CE) 999/2001, il Laboratorio Nazionale di Riferimento (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 (Encefalopatia Spongiforme Trasmissibile) 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'LNR 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 Laboratorio di Riferimento Comunitario (Weybridge,

UK) su incarico della Commissione Europea, 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.

Piano triennale

Nel corso del triennio 2009-2011, salvo modifiche dell’attuale assetto normativo o organizzativo, il Dipartimento continuerà a svolgere le funzioni di “Laboratorio Nazionale di Riferimento per la caratterizzazione dei ceppi e la genetica delle EST animali”. In base all’attività analitica svolta nel corso del precedente triennio, si stima che l’attività di controllo nel corso del triennio 2009-2011 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 analogamente 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, Commissione Europea), l’LNR fornirà consulenza su problematiche di propria competenza.

Proseguirà, in base alla vigente normativa 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 maggio 2004 n. 169 art. 13) il Dipartimento SPVSA è coinvolto nel piano di vigilanza sugli integratori alimentari (quali ad esempio probiotici, estratti vegetali, ecc.) al fine di stabilirne la conformità sia in termini di salubrità che di sicurezza e di corretta informazione ai consumatori.

Piano triennale

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 del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, il Dipartimento SPVSA partecipa a piani di vigilanza per evidenziare eventuali trattamenti non dichiarati in etichetta.

Piano triennale

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.

**Dipartimento
Tecnologie e Salute**

Attività di ricerca

Analisi e modulazione della risposta cellulare indotta da agenti infettivi

I rapporti tra patogeni e cellula ospite sono molto diversi e complessi, coinvolgendo componenti e funzioni cellulari. È noto che l'infezione virale e/o batterica provoca una risposta da parte dell'ospite che può portare alla morte o alla sopravvivenza cellulare. L'apoptosi, o morte cellulare programmata, è un processo fisiologico che prevede il coinvolgimento di specifiche proteasi (caspasi) e di organelli cellulari. L'apoptosi è responsabile del corretto sviluppo dell'organismo, dell'omeostasi tissutale e della risposta cellulare a stress o patogeni in assenza di infiammazione. La piroptosi è un tipo di morte cellulare caspasi-1 dipendente indotta da vari stimoli patologici. La piroptosi, in cui sono presenti fenomeni infiammatori, gioca un ruolo chiave nel controllo delle infezioni microbiche. La necrosi, o morte cellulare incontrollata, è un evento accidentale causato da agenti chimici, fisici o infettivi. Il processo necrotico interessa un numero elevato di cellule di un tessuto ed è causa d'infiammazione. L'autofagia è un processo fisiologico, altamente regolato e conservato in tutti gli eucarioti, che contribuisce a mantenere l'omeostasi tra sintesi, degradazione e riciclo di molecole. Lavori recenti dimostrano un ruolo attivo dell'autofagia nelle infezioni batteriche e virali. Lo scopo di questo progetto è valutare la risposta cellulare a diversi stimoli infettivi e identificare sostanze naturali in grado di modulare tale risposta e quindi di inibire l'infezione.

Risultati attesi nel triennio

In questo progetto saranno analizzate le interazioni tra agenti infettivi, sia batterici che virali, e sistemi cellulari *in vitro* attraverso indagini di tipo biochimico, molecolare e morfologico. Quest'ultimo aspetto sarà affrontato mediante l'impiego di tecniche di microscopia ottica, a fluorescenza e di microscopia elettronica a trasmissione e a scansione. La microscopia elettronica a trasmissione rappresenta, ad oggi, una metodica d'elezione per questo tipo di indagine, soprattutto per quanto riguarda l'identificazione del processo autofagico. In particolare saranno studiate 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. Inoltre 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 infine studiate sostanze di origine naturale in grado di modulare tali processi cellulari indotti dagli agenti infettivi allo scopo di trovare le condizioni ideali per inibire l'infezione.

Trasferibilità dei risultati

Lo studio della modulazione del rapporto patogeno-cellula, volto all'analisi di ogni singolo caso, ci permetterà di comprendere meglio sia la patogenesi delle infezioni che i meccanismi coinvolti nella regolazione dell'apoptosi, della piroptosi, della necrosi e dell'autofagia. I risultati di questo progetto di ricerca contribuiranno ad aumentare le conoscenze sul ruolo di questi processi cellulari nelle infezioni virali e batteriche. Una migliore comprensione dei meccanismi molecolari che regolano i diversi processi potranno essere utili per un più razionale approccio terapeutico nelle malattie infettive. Inoltre, l'identificazione di sostanze naturali capaci di proteggere la cellula dall'ingiuria degli agenti patogeni potrà fornire importanti informazioni per la cura delle malattie infettive, comprese le patologie neoplastiche causate da virus oncogeni.

Basi radiobiologiche dell'adroterapia

Per adroterapia si intende l'impiego di particelle subatomiche (principalmente protoni e ioni carbonio) nella terapia delle patologie neoplastiche, sfruttando le loro particolari proprietà fisiche e radiobiologiche. Il razionale dell'adroterapia risiede principalmente nella particolare selettività spaziale che consente di ottenere una radioterapia altamente conformazionale con

metodiche relativamente semplici e con una dose integrale ai tessuti sani sensibilmente inferiore rispetto a quella che viene erogata anche con le più avanzate tecniche di radioterapia convenzionale. In particolare, l'uso dei protoni riveste una particolare importanza nei tumori pediatrici. Le variazioni delle proprietà radiobiologiche dell'adroterapia sono concentrate nella parte distale del bersaglio per i protoni, mentre per gli ioni carbonio sono importanti in tutto il bersaglio.

Scopo del progetto è il miglioramento della conoscenza delle proprietà radiobiologiche degli adroni carichi e dei meccanismi alla base della loro azione biologica, nonché l'identificazione di possibili test predittivi della risposta al trattamento con adroni.

L'attività di ricerca prevede studi di radiobiologia a livello molecolare e cellulare, inclusi i fenomeni cosiddetti extra-bersaglio (*non-targeted effect*) rivolti alla determinazione della risposta ai protoni e agli ioni carbonio, confrontata con quella ai raggi X e gamma. Parallelamente, verrà implementato un modello teorico mirato a predire l'effetto di fasci terapeutici.

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 l'Università di Pavia, con il CNAO, l'ENEA e con l'INFN (LNS).

I risultati attesi sono i seguenti:

- Curve dose-risposta per l'inattivazione di cellule umane coltivate *in vitro* indotta da protoni e da fasci di ioni carbonio.
- Valutazione della riparabilità del danno al DNA di cellule umane coltivate *in vitro* in funzione della qualità della radiazione.
- Valutazione dell'Efficacia Biologica Relativa (RBE) sia per l'inattivazione cellulare che per il danno al DNA.
- Implementazione di un modello teorico per la valutazione degli effetti cellulari indotti da fasci terapeutici modulati di ioni carbonio.

Trasferibilità dei risultati

I risultati radiobiologici ottenuti forniranno informazioni propedeutiche e/o complementari alla ricerca radiobiologica clinica. Potranno essere utilizzati per predire e/o valutare i potenziali vantaggi e le proprietà dei fasci per l'adroterapia, e per ottimizzare i piani di trattamento.

Le conoscenze acquisite potranno inoltre contribuire allo sviluppo di test predittivi della risposta al trattamento radioterapeutico.

Il trasferimento dei risultati avverrà attraverso pubblicazioni scientifiche, relazioni a congressi scientifici e attraverso gli strumenti informatici dell'ISS.

Biofilm microbici e infezioni nosocomiali

1. Studio delle modalità di formazione di biofilm microbici sulla superficie di dispositivi medici impiantati e su ulcere da pressione in pazienti ricoverati in strutture ospedaliere di neuroriabilitazione.

Le indagini riguarderanno la produzione di biofilm da parte di specie batteriche sia gram-positive (*Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, ecc.) che gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, ecc.), nonché di specie fungine (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, ecc.), su cateteri vascolari, *stent* biliari, protesi ortopediche e ulcere da pressione.

2. Sviluppo di sistemi-modello polimero-antimicrobico capaci di inibire la colonizzazione microbica e la produzione di biofilm.

Tali sistemi prevederanno l'adsorbimento e/o l'incorporazione in matrici polimeriche di sostanze antimicrobiche (antibiotici, antifungini, ioni argento, ecc.) che, adsorbite e/o rilasciate a dosi opportune, siano in grado di agire al livello del sito di infezione, quale ad esempio il sito di impianto di un catetere.

3. Studio di agenti in grado di disaggregare biofilm microbici.
L'attenzione verrà rivolta alla messa a punto di modelli di studio *in vitro* che consentano di valutare sostanze con attività inibente la produzione di biofilm e/o capaci di disaggregare biofilm maturi.
4. Messa a punto di una strategia di attacco precoce del biofilm microbico che si sviluppa sulla superficie di un dispositivo biomedico impiantato (ad esempio un catetere o una protesi ortopedica) basata sulla veicolazione, tramite l'applicazione di campo magnetico, di nanoparticelle magnetiche in grado di rilasciare molecole antimicrobiche nel sito presumibilmente soggetto ad infezione.
La strategia, che verrà messa a punto in un idoneo modello animale in collaborazione con il Servizio Biologico e per la Gestione della Sperimentazione Animale dell'ISS, prevede l'iniezione intravenosa di nanoparticelle magnetiche caricate con antibiotico che vengono guidate e concentrate, tramite l'applicazione di un campo magnetico esterno, nell'area di impianto del dispositivo medico oggetto di sperimentazione.

Risultati attesi nel triennio

1. Caratterizzazione di fattori favorenti la formazione di biofilm:
 - qualità di superficie dei dispositivi
 - deposito di biofilm proteico
 - interazione adesine batteriche-proteine dell'ospite
 - produzione di esopolisaccaridi microbici
2. Valutazione, in collaborazione con il Dipartimento di Chimica dell'Università Sapienza di Roma, dell'efficacia anti-biofilm di poliuretani con adsorbiti:
 - antibiotici insolubili in acqua;
 - antibiotici sistemici di classi diverse;
 - ioni metallici antimicrobici come adiuvanti di antibiotici;
 - *pore-formers*;
 - antifungini
3. Validazione, come agente disaggregante di biofilm microbici, di un enzima batterico, brevettato presso l'Università del New Jersey, USA, e per il quale è stato sottoscritto dal Presidente dell'Istituto uno specifico *Research Materials Transfer Agreement*.
4. Validazione di un metodo innovativo per prevenire e contrastare lo sviluppo di biofilm microbici in corrispondenza dei siti di impianto di dispositivi medici a media-lunga permanenza.

Trasferibilità dei risultati

1. Implementazione delle misure igienico-sanitarie volte a prevenire le infezioni associate all'impianto di dispositivi medici a larga diffusione e lo sviluppo di biofilm sulle ulcere da pressione in pazienti neurolesi.
- 2-3. Sviluppo di innovativi dispositivi medici impiantabili anti-biofilm.
4. Individuazione di nuove strategie di prevenzione e trattamento delle infezioni alternative alla rimozione dei dispositivi medici.

Biomateriali e dispositivi impiantabili: caratterizzazione biomeccanica e morfometrica

In base agli accordi di collaborazione scientifica tra l'ISS e:

- l'Istituto di Clinica Odontoiatrica dell'Università Cattolica del S. Cuore di Roma, su studi anatomici e biomeccanici in endodonzia;
- il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche dell'Università di Roma Tor Vergata, su biomateriali e dispositivi impiantabili in ingegneria medica;
- il Dipartiment di Scienze Odontostomatologiche dell'Università Sapienza di Roma, su biomeccanica e morfologia 3D in odontoiatria protesica e implantologia;
- il Dipartimento di Scienze Applicate ai Sistemi Complessi, Università Politecnico delle Marche di Ancona, su osservazioni e studi tramite microtomografia 3D di nuovi biomateriali e tessuti di origine biologica.

L'attività di ricerca svolta nell'ambito degli accordi proseguirà, rispettivamente, con:

- indagini sperimentali finalizzate alla conoscenza dell'anatomia dell'endodonto per migliorare la progettazione sia di strumenti sia di tecniche e materiali utilizzabili nella restaurazione di elementi dentali;
- studi nel campo dello sviluppo di nuovi materiali e impianti dentali, della biomeccanica del sistema tessuto-impianto e della relativa struttura 3D, di campioni *in vitro* sottoposti a sollecitazione meccanica e analisi microCT in comparazione con metodiche tradizionali;
- attività di ricerca nel campo della biomeccanica e della morfologia 3D di materiali e dispositivi utilizzati in protesica;
- studi sperimentali riguardanti le applicazioni della microCT 3D all'indagine strutturale di sostituti ossei allo scopo di indagare nuove metodiche terapeutiche o riabilitative nel caso di gravi patologie.

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 endodontici meno traumatici nei confronti dei tessuti dentali come anche di nuove tecniche restaurative più affidabili e meno invasive, con indagini microCT 3D, condotte *in vitro* sulle lavorazioni canalari pre e post. Inoltre i risultati ottenuti nel campo dei perni endocanalari creati *ad hoc*, tramite microCT 3D, potranno supportare una loro più adeguata realizzazione (1);
- di valutare la BIC (*Bone Implant Contact*), 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 (2);
- di indagare, tramite tecnica microCT 3D, le potenzialità rigenerative di sostituti 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 (3);
- di ottenere, in base ad uno studio combinato tra prove biomeccaniche simulanti l'attività orale e acquisizioni microCT 3D, l'individuazione sia del materiale più affidabile come prestazioni meccaniche nell'ambiente orale, sia di quello meno traumatico e distruttivo per i tessuti dentali eventualmente contrapposti (3);
- di approfondire la caratterizzazione strutturale e morfometrica 3D dell'osso umano anche in condizioni patologiche (ad esempio l'osteoporosi) e di *scaffold* innovativi utilizzati in ingegneria dei tessuti a supporto di tecniche terapeutiche e riabilitative (4).

Trasferibilità dei risultati

In base ai risultati prodotti sarà possibile supportare l'applicazione clinica ambulatoriale delle tecniche ricostruttive endodontiche indagate *in vitro* e fornire indicazioni ai costruttori di strumentazione per lavorazioni canalari al fine di ottenere una minore distruzione tissutale.

Le continue indagini sulla BIC e la comparazione tra metodiche diverse permette di ottenere conoscenze atte a formare e informare l'implantologo al fine del miglioramento dell'osteointegrazione degli impianti dentali, oggi diffusamente utilizzati 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 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 sia in medicina ricostruttiva sia in 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 Dispositivi Medici per il sistema cardiovascolare, l'apparato locomotore e gli ausili protesici per assistenza (ad esempio acustici e motori), di telemetria e *technology assessment*, dei servizi di riabilitazione e telemedicina.

Si intende promuovere l'integrazione delle competenze con altri Reparti del Dipartimento 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 ICT).

L'attività che si intende svolgere riguarderà in particolare i seguenti ambiti:

- Sviluppo e accreditamento di laboratori sperimentali per la valutazione tecnologica di dispositivi medici (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, 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

- Valutazione dei rischi connessi con l'uso *on-* e *off-label* di DM
- Soluzioni innovative di ingegneria tissutale per la sostituzione protesica cardiovascolare e come ausilio alla cardiologia interventistica
- Assetto e accreditamento di laboratori di prova per dispositivi medici a supporto dell'autorità competente
- Messa a punto di linee guida, percorsi di validazione/certificazione e rapporti di HTA nel caso di tecnologie sanitarie (ad 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 e protesiche, ad es. ortesi per la

prevenzione del rischio ulcerativo nel diabetico, protesi acustiche, sistemi di ossigenazione e ventilazione polmonare)

- Progetto e realizzazione di DM indossabili per il monitoraggio di parametri fisiologici, e loro integrazione WAN per il monitoraggio domiciliare (ad es ottimizzazione della terapia medica grazie allo sviluppo di contapassi wireless per soggetti con disabilità motoria)
- Qualificazione dei parametri utilizzabili per la misura dell'effetto della turbolenza associata a impianto cardiovascolare e sviluppo di controlli clinici o domiciliari efficaci
- Fluidodinamica sperimentale e *in silico* per la valutazione dei DM cardiovascolari e per la validazione di procedure chirurgiche ricostruttive o terapie innovative con micropompe circolatorie
- Supporto della diagnostica Echo e RMN mediante modellistica biomeccanica e fluidodinamica.

Trasferibilità dei risultati

Sarà curata l'integrazione tra competenze di differenti unità e Reparti dei Dipartimenti (come peraltro già in essere) e 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, specie nell'ambito della domiciliazione dei servizi (teleassistenza e teleriabilitazione) a supporto dell'ISS quale referente istituzionale per una guida nazionale.

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 (ad es software *Open Source*).

Calcolo avanzato e modellistica per applicazioni in fisica medica e per la stima dei rischi: metodi di ottimizzazione e simulazioni MonteCarlo per valutazione di dose in esposizioni mediche

Le nuove tecnologie introdotte nella pratica clinica per il trattamento radioterapeutico dei tumori (come ad esempio la *Intensity Modulated Radiation Therapy*, IMRT) possono aumentare il rischio di incidenza di tumori secondari. 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 in attività di ricerca che forniscano una valutazione accurata della distribuzione di dose nei tessuti sani durante un trattamento radioterapeutico. Questo progetto di ricerca vuole contribuire 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 MonteCarlo. I codici MonteCarlo 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) già presenti nel gruppo di ricerca proponente.

Risultati attesi nel triennio

Nel progetto verranno modellizzati almeno due acceleratori utilizzati in radioterapia utilizzando il codice MonteCarlo GEANT4. Con questo primo passo si potranno simulare delle situazioni di irraggiamento di interesse clinico. Le simulazioni verranno effettuate su fantocci composti da materiali eterogenei: una prima applicazione sarà su fantocci composti da materiali che riproducano le densità polmonari in diverse fasi respiratorie. La valutazione della dose al polmone è di particolare interesse perché in questo caso gli algoritmi di calcolo convenzionali, rispetto ai codici MonteCarlo, mostrano dei grossi limiti di tipo fisico legati alla corretta valutazione dell'equilibrio elettronico.

Verranno quindi applicate procedure di ottimizzazione che tengano conto di parametri fisici e radiobiologici per stimare il danno agli organi sani nei trattamenti radioterapeutici con IMRT. Questo progetto sarà in collaborazione con laboratori di Fisica Sanitaria di strutture cliniche. In particolare la collaborazione è con l'IRCCS Regina Elena e il San Camillo di Roma, con l'Istituto Scientifico Romagnolo per lo Studio e la Cura dei Tumori (IRST) e con l'Ospedale Santa Croce e Carle di Cuneo. Per le attività legate all'uso di codice GEANT4 è in corso già da anni una collaborazione con l'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare. Infine su questo tema è attiva una convenzione con ISS/ISPESL ("Calcolo avanzato e modellistica per applicazioni in campo sanitario e per la stima dei rischi" 2008-2012).

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni scientifiche, comunicazioni a convegni, corsi di formazione per i fisici medici ospedalieri, codice di calcolo ad uso dell'SSN.

Dalla descrizione teorica dell'attività nervosa a livello di popolazione alla emulazione in dispositivi microelettronici neuromorfi accoppiati con il tessuto nervoso

L'attività del triennio si articolerà secondo le seguenti linee, tra loro dipendenti:

1. Analisi del substrato neuronale dei processi di decisione motoria da dati registrati in aree premotorie e prefrontali di primati.
2. Sviluppo di dispositivi innovativi per la registrazione dell'attività nervosa e per la stimolazione diretta del tessuto nervoso: trasferimento dell'attuale prototipo (su Kapton) su supporto polimerico flessibile.
3. Sviluppo di elettronica direttamente accoppiata al tessuto nervoso, nell'ambito di un progetto europeo (ReNaChip): studio di un dispositivo microelettronico neuromorfo, interfacciato *in vivo* con una porzione del cervelletto di un roditore, che ne emula il funzionamento dinamico e la plasticità, allo scopo di dimostrare la possibilità di sostituire funzionalmente una porzione lesa di tessuto cerebellare.
4. Studio della interazione tra cervelletto e corteccia premotoria tramite TMS.
5. Progettazione e costruzione di dispositivi di ausilio percettivo per non vedenti. La componente innovativa che ci si propone di sviluppare è un supporto attivo basato su polimeri ionici per la trasduzione di pagine di testo in Braille.

Collaborazioni: Dipartimento di Fisiologia Umana e Farmacologia e Dipartimento di Chimica, Università di Roma Sapienza; Università Pompeu Fabra di Barcelona; Università di Magdeburg; *Sensorimotor Research National Eye Institute* (NIH); Politecnico di Torino; Istituto Nazionale di Fisica Nucleare; Istituto IMM CNR (Roma).

Risultati attesi nel triennio

Ricerca di base: l'integrazione tra le ricerche di cui ai punti 1) e 2) ci doterà di capacità innovative nell'analisi dell'attività nervosa associata a comportamenti motori su scale multiple

spaziali e temporali, e di una descrizione sperimentale dell'attività nervosa idonea al confronto con la teoria sviluppata.

Ricadute di interesse in sanità pubblica: l'attività di cui ai punti 3) e 4) hanno come prospettive a lungo termine lo sviluppo di tecniche innovative di neuroriabilitazione basate sulla stimolazione diretta del tessuto cerebrale.

Lo studio di fattibilità di cui al punto 5) mira alla progettazione di un "libro elettronico Braille", la cui disponibilità sarebbe di grande interesse per l'utente non vedente.

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni scientifiche, formazione, prototipi pre-ingegnerizzati.

Definizione e sperimentazione di un modello per la gestione tecnica e la verifica di conformità delle strutture e della strumentazione ospedaliere utilizzate nel processo di trapianti

I requisiti tecnici delle strutture utilizzate nei programmi di trapianto di organo sono da molto tempo oggetto di speciale attenzione e controllo. Nel complesso percorso assistenziale del paziente, questi requisiti appaiono maggiormente critici, rispetto all'esigenza di garantire la sicurezza e l'affidabilità della procedura. La divisione delle competenze tra diverse unità operative dell'ospedale e i processi di esternalizzazione di molte attività tecniche fanno sì che i Centri Trapianto e i Centri di Riferimento incontrino particolari difficoltà nel vigilare sulla funzionalità delle strutture tenuto conto dei continui progressi tecnologici, degli alti livelli richiesti e del carattere di urgenza degli interventi. A fronte di tale premessa, si evidenzia la necessità di un efficace metodo di gestione e coordinamento delle strutture.

Il principale obiettivo del progetto, sarà quello di sviluppare e sperimentare sul campo un modello organizzativo che permetta ai Centri di Riferimento di tenere sotto controllo gli aspetti strutturali e strumentali dell'attività di trapianto, identificando ruoli e responsabilità dei soggetti interessati all'interno dell'ospedale, e stabilendo modi e contenuti dello scambio di informazioni.

Saranno inoltre sviluppati metodi efficaci e trasparenti per la verifica, interna o esterna, dell'aderenza ai requisiti formulati nelle linee guida e normative applicabili, anche al fine di favorire l'uniformità delle prestazioni nella rete nazionale.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si rivolge in generale alle strutture dei centri di trapianto della rete nazionale, e potrà coinvolgere in particolare uno o più centri su obiettivi specifici e sperimentazioni.

- Sulla base dei requisiti strutturali e strumentali definiti dalle linee guida, definire e sperimentare un modello per la gestione tecnica e la verifica delle strutture dei centri, applicabile alle diverse tipologie dei centri nazionali, con individuazione, per ognuno dei settori tecnici e clinici coinvolti, dei fattori critici da monitorare, delle metodologie di verifica e analisi, dei flussi di scambio delle informazioni.
- Aggiornare e sistematizzare il quadro dei riferimenti tecnici (linee guida e specifiche), con riferimento anche al settore dei tessuti e delle cellule.
- Verifica dell'applicabilità del modello, con sperimentazioni in realtà ospedaliere selezionate, con il contributo diretto di personale dei settori area tecnica e prevenzione e igiene ospedaliera.

Collaborazioni esterne: Centro Nazionale Trapianti; Centro Trapianti, Direzione Sanitaria, Direzione Tecnica, Servizio Igiene e Prevenzione di un'Azienda Ospedaliera pubblica.

Trasferibilità dei risultati

Disseminazione dei risultati, nell'ambito delle riunioni della Consulta Nazionale Trapianti, ai Centri Regionali di Trapianto, agli Assessorati alla Sanità delle Regioni. Potranno essere inoltre

organizzati dei meeting rivolti al personale tecnico e clinico delle strutture ospedaliere coinvolte nell'attività di trapianto.

Dispositivi innovativi nel settore cardiovascolare

L'attività di ricerca ha l'obiettivo di valutare le criticità di alcuni dispositivi innovativi nel settore cardiovascolare al fine di minimizzare i rischi connessi con il loro utilizzo: si studieranno dispositivi di ultima generazione che consentono il trattamento non-invasivo di alcune patologie con evidenti potenziali vantaggi sia in termini economici che di minore tempo di ospedalizzazione del paziente.

Una patologia importante è l'aneurisma dell'aorta addominale (più di 2.000 morti/anno in Italia).

I dispositivi innovativi utilizzati per questa patologia sono le protesi endovascolari che mettono insieme la tecnologia di uno stent con quella di una protesi vascolare.

I principali rischi associati con questi impianti sono l'inadeguatezza strutturale della protesi a varia distanza di tempo dall'impianto dovuta ad es. a fenomeni di corrosione.

Per quanto concerne i DM impiantati con chirurgia tradizionale, la ricerca avrà come obiettivo lo sviluppo e l'utilizzo di metodiche innovative di ingegneria dei tessuti per la realizzazione di interfacce cellula-dispositivo.

L'ingegneria dei tessuti permette la produzione di DM con caratteristiche preferibili alle comuni protesi attualmente disponibili. Si propongono metodi finalizzati alla valutazione della risposta cellulare a determinate condizioni sperimentali e tecnologie per la produzione di supporti per colture cellulari da impiegare come sostituti protesici (*scaffold* polimerici realizzati mediante *elettrospinning*).

Risultati attesi nel triennio

La ricerca permetterà di studiare l'inadeguatezza tecnico/strutturale delle protesi endovascolari a varia distanza di tempo dall'impianto, con particolare riferimento ai problemi di corrosione della struttura metallica (nitinolo o altre leghe). Le competenze già in essere presso l'ISS nel campo sia delle protesi vascolari che degli stent potranno essere utilmente impiegate nello svolgimento dell'attività proposta. Inoltre la ricerca permetterà di ottenere supporti polimerici per *elettrospinning* da impiegare come substrato per colture cellulari, permettendo di variarne le caratteristiche morfologiche modulando opportunamente i parametri di processo. Successivamente la metodica di impedenziometria cellulare potrà essere impiegata per valutare e ottimizzare le condizioni di crescita cellulare in condizioni statiche. Per ottenere dati sperimentali in condizioni fisiologiche, si simuleranno le caratteristiche fluidodinamiche del torrente ematico tramite camere di flusso innovative per valutare la risposta cellulare a specifiche condizioni di *shear stress*. L'impiego di bioreattori permetterà di valutare la risposta cellulare su costrutti tridimensionali macroscopici come vasi e valvole cardiache.

Si potranno, in ultimo, definire nuove funzionalità mediante l'accoppiamento di polimeri elettrofilati con leghe metalliche validate dal punto vista della corrosione (trattamento interventistico delle dissezioni).

Trasferibilità dei risultati

Disponibilità di strumentazione innovativa in ISS per poter eseguire misure di corrosione su determinati materiali metallici e portare avanti studi di ingegneria dei tessuti, campo di ricerca all'avanguardia come dimostrano i numerosi lavori scientifici reperibili in letteratura di settore. Possibilità di definire nuove funzionalità mediante l'accoppiamento di polimeri elettrofilati con leghe metalliche validate dal punto vista della corrosione.

Dosimetria dei campi elettromagnetici

Per la valutazione dei rischi per la salute connessi alle esposizioni ai campi elettromagnetici è necessario determinare le grandezze fisiche interne al corpo esposto direttamente connesse agli effetti biologici. Tali grandezze (dette dosimetriche) sono la densità di corrente elettrica alle frequenze più basse (alle quali prevalgono gli effetti di stimolazione elettrica dei tessuti eccitabili nervosi e muscolari), e il SAR (*Specific Absorption Rate*), potenza elettromagnetica assorbita dall'unità di massa dei tessuti e convertita in calore, alle frequenze più alte (alle quali prevalgono gli effetti di natura termica). La valutazione delle grandezze dosimetriche verrà effettuata mediante tecniche di calcolo, analitiche e numeriche, sulla base di opportuni modelli del corpo umano per realizzare i quali è necessaria la conoscenza delle caratteristiche elettriche dei tessuti che compongono il corpo umano che possono essere misurate alle varie frequenze di interesse (spettroscopia dielettrica).

Il Reparto Radiazioni non ionizzanti è in possesso di strumentazione per misure di spettroscopia dielettrica in campioni liquidi o allo stato di gel nell'intervallo 10 kHz – 3 GHz. Si studieranno nuove soluzioni sperimentali per la misura di altri tipi di campioni biologici. Anche sulla base dei dati così ottenuti, verranno effettuate valutazioni dosimetriche relative a varie situazioni espositive, con particolare riferimento ai campi elettromagnetici utilizzati in Risonanza Magnetica.

Risultati attesi nel triennio

Caratterizzazione di tessuti biologici per i quali le informazioni, a seguito di analisi della letteratura scientifica, risulteranno carenti.

Valutazioni dosimetriche relative alle esposizioni del paziente e dei lavoratori ai campi elettromagnetici utilizzati in Risonanza Magnetica.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti potranno contribuire ad una migliore caratterizzazione dei rischi connessi alle esposizioni umane ai campi elettromagnetici.

Dosimetria in radioterapia

L'introduzione di tecniche altamente conformazionali quali IMRT, IMPT, Stereotassi, ecc., caratterizzate da piccoli campi di radiazioni, elevati gradienti di dose, variazioni spaziali e temporali dell'intensità di dose assorbita e di composizione spettrale del fascio di radiazione, ha permesso l'utilizzo di dosi sempre più elevate (*dose escalation*) rispetto alle tecniche convenzionali. Tuttavia, la complessità delle distribuzioni di dose generate con queste tecniche, con presenza spesso di concavità, ha posto l'accento su problematiche nuove dal punto di vista dosimetrico alle quali i dosimetri usati tradizionalmente non sono in grado di rispondere e vengono quindi richieste soluzioni dosimetriche adeguate. La presente attività di ricerca, in linea con quelle che sono le esigenze poste dall'utilizzo di queste nuove tecniche di radioterapia, è incentrata sullo sviluppo e caratterizzazione di sistemi potenzialmente idonei a fornire una soluzione ai problemi specifici posti dall'uso di tecniche altamente conformazionali. L'attenzione è rivolta a sistemi commerciali e non, con l'obiettivo di determinarne caratteristiche e limiti e individuando la loro possibile applicazione nella dosimetria di base e clinica in queste tecniche. Tra i sistemi dosimetrici investigati, l'interesse è maggiormente focalizzato su: alanina, TLD, diamante naturale e sintetico cresciuto con tecnica di *Chemical Vapour Deposition* e *High Pressure High Temperature*. Inoltre, allo scopo di valutare l'uniformità nei trattamenti tra le varie realtà italiane che impiegano tecniche ad intensità modulata, è in programma la progettazione, realizzazione ed esecuzione, ristretta ad un numero limitato di Centri di Radioterapia, di interconfronti dosimetrici.

Risultati attesi nel triennio

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 ad intensità modulata. Sviluppo e ottimizzazione dei sistemi dosimetrici a base di diamante CVD e HPHT. Determinazione su scala nazionale del livello di accordo tra la dose dichiarata dal Centro di Radioterapia e la dose misurata con il sistema dosimetrico di riferimento, in fasci IMRT. Valutazione delle azioni correttive in caso di superamento delle tolleranze.

Trasferibilità dei risultati

Il trasferimento, alla comunità scientifica, dei risultati della ricerca avverrà attraverso pubblicazioni su rivista internazionale e comunicazioni a convegni. I risultati ottenuti saranno di utilizzo presso i Centri di Radioterapia per una corretta dosimetria dei campi utilizzati nei trattamenti conformazionali. L'industria potrà avvalersi delle caratterizzazioni dosimetriche dei rivelatori CVD e HPHT in sviluppo per la produzione ed ingegnerizzazione di un prodotto commerciale. Per gli interconfronti dosimetrici, il dato dosimetrico determinato per ciascun Centro di Radioterapia potrà venire usato dal Centro stesso per la definizione e applicazione di azioni correttive.

Dosimetria retrospettiva e risposta di emergenza

In situazioni di esposizione accidentale alle radiazioni, che possono spaziare da incidenti nucleari su larga scala a malfunzionamenti di singole apparecchiature radiologiche o all'uso ostile di radiazioni ionizzanti, i metodi dosimetrici convenzionali sono spesso assenti o inadeguati. In questi casi diventa necessario ricorrere a metodi di ricostruzione retrospettiva della dose ricevuta dagli individui esposti. La presente attività di ricerca è indirizzata allo sviluppo e all'utilizzo di metodi fisici del danno indotto in matrici sia biologiche che inerti, ma comunque esposti insieme al soggetto durante l'incidente, da utilizzare come indicatori della dose ricevuta dall'individuo. Questi metodi sono ampiamente utilizzati sia nella verifica di dati dosimetrici negli studi epidemiologici finalizzati all'analisi del rischio sanitario da radiazioni ionizzanti, che nella risposta di emergenza nelle esposizioni radiologiche non controllate, soprattutto nella fase di *triage*. Le tecniche che si intende utilizzare principalmente sono la risonanza paramagnetica elettronica, la termoluminescenza e la luminescenza otticamente stimolata. Si prevede che questa attività sarà finanziata nel triennio 2009-2011 da due progetti europei e da un progetto INFN. Inoltre si svolge nell'ambito di collaborazioni internazionali, con i principali enti di ricerca del settore (IRSN, HMUG, SCK-CEN, HPA) e soprattutto attraverso la rete Eurados. Sono attive anche collaborazioni nazionali con numerose università (PA, MI, PV, RM1).

Risultati attesi nel triennio

- 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 nuove matrici, biologiche e non, da utilizzare come indicatori della dose in soggetti potenzialmente esposti.
- Elaborazione di un questionario, sponsorizzato dall'Eurados, per la raccolta di informazioni sullo stato corrente della ricerca europea sulla dosimetria retrospettiva da inviare a istituzioni scientifiche e autorità.
- Organizzazione di un interconfronto internazionale di dosimetria retrospettiva EPR.

Trasferibilità dei risultati

- I risultati ottenuti saranno trasferiti alla comunità scientifica attraverso pubblicazioni su rivista internazionale e comunicazioni a convegni. La disseminazione dei risultati avverrà anche attraverso due convegni internazionali di cui l'ISS sarà organizzatore.
- I risultati relativi alla validazione dei modelli dosimetrici saranno trasferiti nell'ambito delle collaborazioni internazionali per gli studi di valutazione dei coefficienti di rischio alle basse dosi.
- I metodi sviluppati per la misura retrospettiva della dose individuale potranno essere utilizzati nella gestione delle emergenze radiologiche, sia a livello nazionale che europeo. Si valuterà anche un possibile coinvolgimento di partner industriali.
- I risultati del questionario saranno utilizzati per elaborare delle indicazioni Eurados sulle necessità della ricerca europea nel settore della dosimetria nella risposta a emergenze radiologiche.
- L'esperienza acquisita sarà trasferita nell'elaborazione della norma ISO sui requisiti minimi per la dosimetria retrospettiva con EPR.

Dosimetria tridimensionale per radioterapia con rivelazione ottica di dosimetri Fricke-gel

I sistemi gel dosimetrici hanno suscitato molto interesse in radioterapia in quanto sistemi in grado di ricostruire mappe in tre dimensioni della dose impartita, caratteristica necessaria per verificare la qualità dei trattamenti di radioterapia.

La nostra attività è rivolta all'utilizzo in radioterapia di dosimetri che sfruttano le proprietà del classico dosimetro di Fricke immerso in una matrice di gel, quale il gel di agarosio (Fricke-gel). Il sistema Fricke-gel è relativamente facile nella preparazione rispetto ad altri sistemi gel, che hanno costituenti tossici e richiedono un ambiente anossico durante la preparazione e prima dell'irraggiamento. Il sistema prescelto è inoltre tessuto equivalente in un largo intervallo di energia e la composizione può essere modificata con l'introduzione di altri componenti per renderlo più simile a tessuti come ossa o polmoni. L'inclusione del colorante Arancio Xilenolo ha lo scopo di permettere la formazione di un complesso con gli ioni ferrici formati dall'irraggiamento che ha il picco specifico di assorbimento ottico nel visibile. Questa caratteristica permette di determinare la dose con maggiore sensibilità e specificità, rispetto ad altri sistemi. Inoltre, la presenza del complessante/colorante rallenta la diffusione degli ioni ferrici, che tende a distruggere l'informazione 3D.

La nostra attenzione si è concentrata sulle tecniche di rivelazione ottica per i vantaggi rappresentati dal minor costo della strumentazione e dalla relativa facilità d'uso, oltre che dalla maggiore rapidità di misura, caratteristiche che possono diventare determinanti per il loro uso in ambiente clinico.

Risultati attesi nel triennio

Nonostante la numerosità degli studi e le ottime qualità dimostrate dai questi sistemi e pubblicate nella letteratura corrente, l'uso di questi dosimetri nella pratica quotidiana è tuttavia ancora difficile a causa della mancata standardizzazione in termini di accuratezza e precisione. L'introduzione dei dosimetri gel nella routine di radioterapia è infatti fortemente rallentata a causa dello sviluppo incompleto del sistema dosimetro-sistema di lettura-ricostruzione della dose e dell'insufficiente caratterizzazione delle risposte dosimetriche.

Il nostro studio si propone di portare un ulteriore contributo allo sviluppo dei gel dosimetri sia a livello del sistema gel che del sistema di rilevazione, con l'obiettivo di fornire uno strumento con risposte meglio caratterizzate anche dal punto di vista dosimetrico. Viene utilizzato un sistema Fricke gel costituito da un gel di agarosio contenente la soluzione di Fricke

e il colorante Arancio Xilenolo. La dose in 3D è determinata mediante un sistema a lettura ottica basato su CCD. In relazione a questo ultimo problema, la rilevazione della distribuzione di ioni ferrici e quindi della dose impartita si avvale dei moderni dispositivi che utilizzano le camere CCD con caratteristiche di rapidità e sensibilità molto convenienti per l'acquisizione di una singola proiezione 2D.

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni scientifiche.

Protocolli di preparazione per dosimetri Fricke-gel.

Ausilio per l'implementazione di scanner ottici per la lettura dei dosimetri.

Effetti biologici di esposizioni a dosi basse e/o protratte alle radiazioni ionizzanti

La comprensione degli effetti biologici delle basse dosi di radiazioni ionizzanti è base essenziale per la quantificazione dei rischi connessi al crescente uso di queste radiazioni. Ciò richiede un cambiamento di prospettiva della radiobiologia. La risposta biologica alle basse dosi è oggi considerata come il risultato di un processo perturbativo sull'attività cellulare. Da una visione DNA-centrica si è passati a considerare effetti cosiddetti *non targeted* quali l'effetto *bystander*, l'instabilità genomica e la risposta adattativa, che mostrano un andamento non lineare alle basse dosi e dipendono fortemente dalla comunicazione intra- inter ed extra-cellulare. Tali effetti hanno messo in discussione la stima del rischio di cancerogenesi alle basse dosi basata sull'estrapolazione lineare senza soglia dei dati epidemiologici relativi a dosi maggiori.

L'obiettivo generale del progetto è quello di studiare con un approccio integrato sperimentale e teorico, le risposte cellulari indotte dall'esposizione di dosi basse e/o protratte alle radiazioni ionizzanti e i meccanismi cellulari correlati a tali risposte, in relazione alla qualità della radiazione. Particolare attenzione verrà rivolta all'effetto *bystander* e alla risposta adattativa, studiati in sistemi biologici costituiti da cellule di origine umana coltivate *in vitro*. Verranno studiati effetti sia a livello molecolare (induzione e riparazione del danno al DNA; induzione di micronuclei) che cellulare (morte riproduttiva e induzione di mutazioni letali). Saranno confrontati gli effetti indotti da diversi tipi di radiazione, quali raggi gamma, particelle alfa e altre particelle cariche. Verrà inoltre studiata l'influenza del fondo naturale di radiazione sulla funzionalità e sulla risposta cellulare ad agenti genotossici, con particolare riferimento alla possibilità che l'esposizione al fondo naturale sia in grado di rendere la cellula più resistente a successive esposizioni acute a radiazioni ionizzanti.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto verrà svolto in collaborazione con altri Reparti del Dipartimento TES, in particolare il Reparto di Modelli di sistemi complessi e applicazioni alla stima dei rischi e il Reparto di Tecnologie fisiche in biomedicina, con l'Università di Pavia e con l'INFN (LNS, LNGS, LNF).

I risultati attesi sono i seguenti:

- caratterizzazione del danno DNA, in particolare rotture della doppia elica (DSB), con particolare riguardo al ruolo giocato dalla qualità della radiazione;
- informazioni sulla riparabilità delle DSB in funzione qualità della radiazione;
- informazioni sull'induzione di micronuclei in funzione qualità della radiazione;
- informazioni sulla morte riproduttiva e sull'induzione di mutazioni letali in funzione qualità della radiazione;
- informazioni sui meccanismi dell'effetto *bystander* (che si manifesta con danni a livello molecolare e cellulare in cellule non direttamente colpite dalla radiazione a seguito di segnali emessi dalle cellule colpite) mediato dal terreno di coltura;

- informazioni sul ruolo di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (ROS e RNS) come possibili segnali *bystander*;
- informazioni sui meccanismi coinvolti nella risposta adattativa;
- modellizzazione della risposta adattativa.

Trasferibilità dei risultati

L'attività s'inserisce in uno sforzo internazionale mirante a risolvere le incertezze sul rischio associato alle esposizioni a dosi basse e protratte, cioè ai livelli 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 due fondamentali aspetti: i) ottenere informazioni più realistiche circa i fattori di peso della radiazione utilizzati in radioprotezione, in particolare per particelle cariche; ii) approfondire i meccanismi dell'azione biologica delle radiazioni ionizzanti che governano la risposta cellulare alle dosi basse e protratte.

Il trasferimento dei risultati avverrà prevalentemente attraverso pubblicazioni scientifiche e relazioni a congressi scientifici, nonché mediante gli strumenti informatici dell'ISS.

Effetto della lattoferrina e del *tea tree oil* sui determinanti di virulenza di ceppi batterici isolati da pazienti con fibrosi cistica

Il controllo delle infezioni nei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC) risulta particolarmente difficile a causa delle numerose specie batteriche coinvolte; alcune di queste, come *P. aeruginosa* e *B. cenocepacia*, possono indurre un notevole peggioramento della sintomatologia clinica. Il quadro viene ulteriormente aggravato dal fatto che i pazienti con fibrosi cistica vengono sottoposti a cicli ripetuti di terapia antibiotica che può portare a un'incrementata resistenza antimicrobica e all'emergenza di microrganismi multiresistenti. Per questo motivo, è utile orientare la ricerca verso lo studio di farmaci innovativi che possano coadiuvare e/o aumentare l'efficacia della terapia antibiotica. Tra questi i derivati del latte e gli oli essenziali rivestono un interesse particolare a causa della loro ben nota azione antimicrobica. La lattoferrina è un antibatterico naturale, la cui attività antimicrobica si esplica soprattutto tramite sequestro di ioni ferro e legame al lipopolisaccaride (LPS) batterico, mentre il *tea tree oil* (TTO) e i suoi componenti costituiscono un ben noto esempio di composti naturali con spiccate azioni antinfettive basate sul danneggiamento di strutture microbiche di superficie. Obiettivo del progetto è quello di studiare l'azione della lattoferrina e del *tea tree oil* su ceppi di *P. aeruginosa*, *B. cenocepacia*, *S. maltophilia* e altri, isolati da pazienti FC, per un loro eventuale utilizzo in sinergia o in alternativa agli antibiotici della terapia convenzionale.

Risultati attesi nel triennio

L'attività della lattoferrina e del TTO (e dei loro componenti) verrà analizzata, con approcci multidisciplinari (microbiologici, biochimici, molecolari e ultrastrutturali), sia direttamente sul batterio che sulle interazioni batteri-cellula. L'effetto diretto sul batterio verrà valutato analizzando sia le strutture batteriche di superficie come l'LPS, le *outer membrane protein* (OMP), i pili e i flagelli, che le variazioni del metabolismo batterico. L'attività sulle interazioni batteri-cellula verrà invece valutata in rapporto alle capacità adesive e invasive dei batteri in cellule in coltura. Parallelamente sarà analizzata l'attività modulante dei due composti sulla formazione di biofilm e sull'espressione di fattori batterici responsabili della colonizzazione e quindi della persistenza.

Trasferibilità dei risultati

Disponibilità di dati sulla eventuale azione antibatterica della lattoferrina e del TTO, usati singolarmente o in combinazione, su ceppi batterici isolati da pazienti FC. Identificazione dei fattori di virulenza batterici sottoposti alla modulazione da parte di questi composti in rapporto

alla produzione di biofilm, all'adesione e all'invasione dei microrganismi su cellule epiteliali respiratorie derivate da pazienti con FC. I dati eventualmente ottenuti sul ruolo regolatorio svolto dai due composti potrebbero indirizzare verso l'utilizzo della lattoferrina e del TTO, da soli o in combinazione con i chemioterapici disponibili, nella terapia delle infezioni opportunistiche in pazienti FC.

Esposizione a nanoparticelle e suscettibilità all'infezione da parte di virus responsabili di patologie oculari

Gli studi sui potenziali effetti dannosi sulla salute umana dell'esposizione a nanoparticelle (NP), sempre maggiormente presenti in prodotti di largo consumo, si sono finora principalmente concentrati sul sistema respiratorio, il tratto gastrointestinale e la cute, trascurando altri distretti che potrebbero essere esposti alle NP durante il processo di produzione, il trasporto, il commercio o l'uso di prodotti che le contengono. L'occhio è sicuramente esposto al contatto con NP di vario tipo, da quelle presenti nell'ambiente a quelle utilizzate nella cosmesi o aggiunte alle soluzioni per lenti a contatto. A causa delle loro piccolissime dimensioni, le NP potrebbero essere in grado di superare le barriere protettive dell'occhio e interagire con le cellule epiteliali provocando uno stato infiammatorio cronico costituente un substrato favorevole per lo sviluppo d'infezioni virali e batteriche. Il virus dell'herpes simplex di tipo 1 (HSV-1) e l'adenovirus sono tra i più diffusi agenti responsabili d'importanti infezioni oculari quali la cheratite erpetica e la cheratocongintivite epidemica. È probabile che stati d'infiammazione o irritazione dell'occhio causati dal contatto con NP possano causare riattivazioni di infezioni latenti, aggravamenti di infezioni lievi o asintomatiche nonché predisporre a nuove infezioni da parte di questi virus. Lo scopo di questo progetto sarà valutare l'effetto dell'esposizione a NP di diversa origine su modelli *in vitro* di infezioni oculari.

Risultati attesi nel triennio

Come modelli di infezione oculare verranno utilizzati linee cellulari di cornea umana e virus responsabili di patologie oftalmiche quali HSV-1 e adenovirus. Inizialmente sarà valutato l'effetto tossico di NP sulla morfologia e la funzionalità delle cellule valutando diversi parametri sub-cellulari, la produzione di citochine infiammatorie e lo stress ossidativo. L'effetto dell'esposizione a NP sulla suscettibilità a infezioni oculari sarà valutato infettando le cellule pre-trattate con varie concentrazioni di NP (caratterizzate per forma, dimensioni e composizione chimica) per vari periodi di tempo e analizzando le diverse fasi del ciclo infettivo (adsorbimento, espressione di antigeni virali precoci e tardivi, produzione di particelle virali infettanti). Le cellule esposte a NP e infettate verranno anche analizzate tramite microscopia elettronica a trasmissione che permette di studiare gli effetti del trattamento a livello sub-cellulare (alterazione di compartimenti quali citoplasma, membrane, nucleo) e di visualizzare simultaneamente virus, NP e cellule, valutando le loro interazioni reciproche. Infine sarà determinata la maggiore o minore sensibilità delle cellule già infettate da virus all'effetto di NP, tramite studi sui medesimi modelli cellulari pre-infettati e quindi trattati con varie concentrazioni di NP a diversi tempi dall'infezione. Lo studio sarà condotto in collaborazione con il Reparto di Ultrastrutture dei contaminanti e dei materiali di questo Dipartimento.

Trasferibilità dei risultati

Lo studio preventivo dei potenziali rischi di maggiore suscettibilità alle infezioni oculari causate da virus in seguito a esposizione della popolazione a NP presenti in prodotti d'uso quotidiano, si rivelerebbe di estrema utilità per garantire il massimo grado di sicurezza a questa nanotecnologia emergente, consentendone la piena potenzialità.

Per una completa comprensione dell'impatto sulla salute pubblica dell'uso di nanomateriali risulta essenziale acquisire conoscenze, non solo sull'esposizione umana attraverso le diverse

possibili vie, ma anche sulle interazioni delle NP con altri agenti con cui gli stessi individui vengono normalmente in contatto, quali ad esempio gli agenti infettivi. L'esame di NP di diversa composizione e struttura permetterà di individuare quali tra queste, non costituendo un rischio aggiuntivo di contrarre infezioni oculari, potranno essere utilizzate nella produzione industriale di prodotti cosmetici o impiegati nella pulizia di lenti a contatto.

Estrazione di fenotipi di aritmie cardiache mediante un approccio multiscala

Diversi approcci sono utilizzati per migliorare la comprensione dei meccanismi alla base delle aritmie cardiache e per ottimizzarne le terapie. L'approccio classico è basato sull'analisi dei segnali elettrici cardiaci, ottenuti mediante diverse metodiche di mappaggio elettrofisiologico. Un approccio più moderno è invece basato sull'analisi della predisposizione genetica all'aritmia. Questi due approcci hanno percorso traiettorie parallele, pur avendo lo stesso obiettivo. Tuttavia è dimostrato che varianti genetiche provocano effetti funzionali a livello di elettrofisiologia cardiaca. Il progetto si propone quindi di utilizzare l'elaborazione dei segnali cardiaci come un metodo per ottenere nuovi fenotipi facilmente utilizzabili nella pratica clinica. L'obiettivo principale del progetto è di estrarre nuovi fenotipi clinici di aritmie cardiache a partire dall'elaborazione di segnali cardiaci, e di trovare l'associazione con i relativi genotipi. Per raggiungere questo scopo dovrà essere impiegato un approccio interdisciplinare multiscala. Partecipano alla ricerca: Dipartimento di Tecnologie e Salute, ISS; Leslie Tung (*John Hopkins University – School of Medicine*); Antonio Zaza (Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze – Università di Milano Bicocca).

Risultati attesi nel triennio

Il risultato principale riguarda la messa a punto di nuovi fenotipi clinici di diverse aritmie cardiache e la conseguente associazione con il relativo genotipo. I fenotipi saranno estratti da segnali cardiaci rilevabili mediante la strumentazione diagnostica comunemente utilizzata nella pratica clinica, risultando quindi di immediata applicazione clinica. Il risultato a lungo termine è la spinta verso la ricerca interdisciplinare per superare le limitazioni della ricerca classica basata sull'utilizzo di fenotipi legati ai sintomi, che sono eterogenei, ridondanti e poco trasferibili alla pratica clinica. Altri risultati del progetto saranno: la messa a punto di un laboratorio per studi *in vitro* di elettrofisiologia cardiaca; lo sviluppo di un modello integrato dell'attività elettrica cardiaca a livello cellulare, tissutale e di organo; la progettazione e realizzazione di un modello bio-fisico dell'attività cardiaca; la messa a punto di nuove metodiche di elaborazione dei segnali cardiaci.

Trasferibilità dei risultati

La fenotipizzazione delle patologie è da considerarsi una sfida importante per la medicina traslazionale contemporanea, viste le potenziali applicazioni delle tecniche genomiche nella pratica clinica. La determinazione di nuovi indicatori di predisposizione verso un'aritmia, 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 fenotipi è da considerarsi un prerequisito per lo sviluppo della medicina genomica, nella quale dettagliate informazioni genetiche sono utilizzate per sviluppare regimi terapeutici personalizzati. L'approccio del progetto è di estrarre i fenotipi da informazioni comunemente estratte nella pratica clinica, e di affidare l'estrazione delle caratteristiche discriminanti all'elaborazione automatica di tali informazioni.

Fluidodinamica sperimentale e *in silico* per la valutazione di sicurezza e prestazioni dei dispositivi medici e per la validazione di procedure chirurgiche ricostruttive per il sistema cardiovascolare

L'uso di dispositivi medici (DM) innovativi ha permesso importanti progressi nel trattamento delle patologie del sistema cardiovascolare. Ciononostante, va ricordato che l'impianto di una protesi non è privo di complicanze, a causa dell'interazione con l'ospite (es. fenomeni di tromboembolismo ed emolisi, nel caso di dispositivi di assistenza circolatoria e valvole cardiache). Pertanto, è di importanza fondamentale ottimizzare sia la biocompatibilità dei materiali con cui è fabbricato il DM, sia la fluidodinamica associata al DM stesso. L'aspetto fluidodinamico è particolarmente critico in quanto, a differenza ad esempio della valvola nativa, gli occlusori di una valvola meccanica presentano sempre una proiezione non nulla sulla sezione del flusso sanguigno, determinando così alti gradienti spaziali di velocità e conseguente produzione di turbolenza. Come evidenziato dalla letteratura, 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 (2D/3D PIV, 2D/3D LDA). Un altro obiettivo di ricerca sarà l'indagine su procedure chirurgiche per il trattamento di patologie congenite del sistema cardiovascolare (es. circolazione univentricolare), 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 il Dipartimento, che consente un'agevole visualizzazione del flusso da più punti di vista; pertanto, il modello è ottimizzato per indagini con la tecnica stereo-PIV, che prevede la ricostruzione del campo tridimensionale di velocità tramite analisi di immagini sincrone di particolare, riprese da due telecamere.

Più generalmente, si intende qualificare i parametri proposti in letteratura per la valutazione dell'impatto degli sforzi associati alla turbolenza (*Reynolds shear stress*, *turbulent viscous stress*), in relazione alla possibilità di definire soglie critiche per il danno ematico.

Gli studi sperimentali offriranno inoltre una base di confronto per le indagini computazionali, nel caso di alto numero di *Reynolds*, condizione in cui l'approccio *in silico* non garantisce ancora in certi casi 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 morfo-anatomici 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, doppia vena cava, 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 i centri di diagnostica per immagini di strutture ospedaliere.

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 perseguiti dalla ricerca in campo oncologico. Tra questi i liposomi cationici costituiscono una classe di *nanocarrier* potenzialmente utili per il miglioramento del *delivery* e dell'*uptake* dei farmaci da parte delle cellule tumorali.

In questo progetto di ricerca verranno effettuati studi, *in vitro* e *in vivo*, sull'efficacia terapeutica di diverse formulazioni di liposomi cationici unilamellari (100 nm), opportunamente formulati al fine del loro impiego quali *carrier* di agenti antitumorali. Altro obiettivo sarà quello di valutare l'effetto sulla proliferazione cellulare e/o citotossico, quali fattori di rischio sanitario delle nanoparticelle metalliche (ZnO, TiO₂, Au, Fe₃O₄) e nanotubi di carbonio in sistemi *in vitro*. Questo tipo di nanoparticelle viene utilizzato nella formulazione di materiali polimerici, prodotti cosmetici e per la diagnostica medica mediante tecniche di *imaging*. Verranno infine effettuati gli studi sugli effetti immunologici ed immunopatologici generati dall'interazione delle nanoparticelle e dei nanotubi con gli elementi figurati del sangue (globuli rossi, piastrine, linfociti) ottenuti dal sangue periferico di donatori sani.

Risultati attesi nel triennio

- Disegno di nuovi sistemi liposomiali 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.
- Dati sulla citotossicità, stress ossidativo, induzione di infiammazione e genotossicità dei diversi tipi di nanomateriali su linee tumorali gastrointestinali e linfoblastoidi. Tali dati saranno correlati con quelli provenienti dalla caratterizzazione chimico fisica delle nanoparticelle in termini di dimensioni, forma e composizione.
- 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.

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 coinvolti.

I dati sperimentali che si otterranno dal nostro studio consentiranno di valutare i potenziali effetti negativi associati all'impiego di nanoparticelle ingegnerizzate e non, e quindi consentiranno di valutare l'adeguatezza delle metodologie di preparazione. Inoltre, i dati provenienti dagli studi *in vitro* e *in vivo* sulla tossicità, sull'efficienza di *drug delivery* e sull'efficacia dei liposomi cationici permetteranno di trasferire i risultati nelle prime fasi della ricerca clinica.

Individuazione di marcatori tumorali come bersaglio di nuove terapie antitumorali

Alcuni caratteri acquisiti dalle cellule tumorali nel corso della progressione neoplastica, quali la perdita di farmacoresistenza, la capacità di infiltrare i tessuti adiacenti e formare metastasi a distanza, costituiscono gli ostacoli maggiormente incontrati nel corso della terapia antitumorale e, frequentemente, 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 eventuali 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.

In particolare nel corso del prossimo triennio ci si prefigge di:

- Valutare la relazione tra i marcatori molecolari della farmacoresistenza (trasportatori ABC) e quelli coinvolti nei processi di invasione tumorale (CXCR4/CXCL12; MMP, molecole di adesione, Wnt e HGF/Met *pathway*) su modelli cellulari tumorali *in vitro* (linee stabilizzate), *ex vivo* (cellule tumorali staminali) o *in vivo* (modelli tumorali sperimentali).
- Individuare i meccanismi molecolari che portano alla morte cellulare (apoptosi, necrosi e/o autofagia) e le modalità di clearance dei corpi apoptotici da parte dei macrofagi in modelli tumorali *in vitro* (es. fibrosarcoma e carcinoma laringeo) e *in vivo* (fibrosarcoma del topo), in seguito al trattamento con il composto fotosensibilizzante Hypocrellina B.

Risultati attesi nel triennio

- I meccanismi biologici alla base della disseminazione metastatica rimangono ancora poco chiari a fronte del fatto che le metastasi dei tumori solidi rappresentano la causa principale dell'esito infausto di questa patologia. I risultati ottenuti permetteranno di definire le caratteristiche genotipiche e fenotipiche associate *in vitro* e *in vivo* ad un alto potenziale invasivo di cellule tumorali di diversa origine istologica con particolare riferimento a: espressione di marcatori di farmacoresistenza, comportamenti migratori e invasivi, *pathway* di segnali intracellulari.
- I risultati ottenuti permetteranno di valutare i tipi di morte cellulare (apoptosi, necrosi/o autofagia) coinvolti nel meccanismo citotossico del composto fotosensibilizzante HypB-acetato e successivamente di studiare i marcatori molecolari di riconoscimento tra macrofagi epatici e peritoneali e le cellule morte (apoptotiche e/o autofagiche) mediante tecniche di inibizione della fagocitosi. Saranno utilizzati tumori sperimentali *in vivo*, ottenuti mediante inoculo di cellule di fibrosarcoma nel topo, per uno studio dettagliato del processo apoptotico e di *clearance*.

Trasferibilità dei risultati

Questo studio potrà contribuire a chiarire i meccanismi subcellulari e molecolari alla base del fenomeno della polifarmacoresistenza e delle caratteristiche di invasività delle cellule tumorali. 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. Nella pratica clinica i fenomeni della farmacoresistenza e della invasività sono spesso associati: i risultati di questo studio potranno fornire utili suggerimenti per l'ottimizzazione dei protocolli terapeutici. Poiché lo scopo dei trattamenti antitumorali, compresa la terapia fotodinamica, è generalmente quello di indurre morte cellulare, è importante conoscere le molecole coinvolte nella regolazione di necrosi, apoptosi e autofagia, al fine di poter modulare tali meccanismi e, quindi, aumentare l'efficacia terapeutica dei trattamenti.

Marcatore di radiosensibilità cellulare con RMN

Lo sviluppo della radiobiologia, tipicamente in stretto contatto con la radioterapia e la radioprotezione, è stato caratterizzato dal concetto che il danno al DNA sia all'origine dei vari effetti cellulari, inclusa la morte cellulare. Tuttavia, negli ultimi due decenni si è assistito ad un radicale cambio di prospettiva: da una visione estremamente DNA-centrica, si è passati ad una visione più "cellulare", nella quale hanno un ruolo anche target "complementari", i quali presiedono a varie funzioni cellulari, inclusa la riparazione e la duplicazione del DNA stesso.

La nuova era della conoscenza è integrata dallo studio delle molecole alle quali precedentemente erano stati riconosciuti principalmente ruoli ripetitivi e che ora si affacciano all'attenzione della comunità scientifica nella regolazione di funzioni più complesse. È oggi noto che l'esposizione a radiazioni ionizzanti implica modulazioni del metabolismo cellulare, includendo anche l'osservazione di componenti del metabolismo lipidico e glucidico. L'identificazione di modificazioni nella concentrazione di queste tipologie di metaboliti in risposta all'irraggiamento può mettere in evidenza nuovi *biomarker* o fornire informazioni nuove sulla risposta cellulare. Nuovi metodi di indagine che permettono di mettere in evidenza modificazioni di questo metabolismo possono essere importanti per completare il quadro metabolico e fornire informazioni sull'evoluzione della risposta cellulare all'irraggiamento.

Risultati attesi nel triennio

L'esposizione di cellule alle radiazioni ionizzanti produce la formazione di radicali liberi con vita media di qualche millisecondo, che in seguito innescano una serie di processi metabolici che possono durare minuti ore o giorni, dando luogo ad effetti protettivi o dannosi.

La spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare, in particolare la spettroscopia protonica (¹H NMR) si è affermata come strumento in grado di dare maggiori informazioni di valore diagnostico e prognostico, oltre a fornire un valido supporto per la comprensione delle vie metaboliche a livello cellulare, in particolare nello studio sistematico delle molecole piccole e dei loro profili metabolici, includendo tutti i metaboliti. Il profilo metabolico cellulare è infatti oggi oggetto dello studio della metabolomica, che affianca la genomica e la proteomica: tali studi si avvalgono anche delle potenzialità della spettroscopia NMR. Si provvederà quindi all'assegnazione di segnali a molecole finora poco studiate, per allargare le conoscenze sui cammini metabolici in seguito a risposte della biochimica cellulare a stimoli esterni, principalmente radiazioni. Come tipologie di molecole legate al metabolismo e in linea con i più recenti orientamenti, si studieranno:

- molecole legate allo stress ossidativo;
- molecole legate al metabolismo lipidico;
- molecole legate al metabolismo glucidico.

Trasferibilità dei risultati

La risposta metabolica studiata con NMR permetterà di ottenere informazioni su: i) metabolismo lipidico come indice di risposta biologica, ii) identificazione di *biomarker* per la quantificazione del metabolismo glucidico, iii) risposta allo stress ossidativo radio indotto, iv) identificazione di molecole attive nel *signalling* intra ed extracellulare.

Tali informazioni verranno utilizzate sia nell'ambito della radioprotezione che della radioterapia per limitare i danni collaterali connessi all'uso medico delle radiazioni che per comprendere la natura dei possibili effetti nocivi delle radiazioni.

Metodi e modelli di analisi multivariata per dati e segnali biofisiologici

Il progetto nasce come estensione di un'attività iniziata negli scorsi anni all'interno del Reparto Valutazione e qualità delle tecnologie biomediche con lo studio di algoritmi mirati

all'applicazione di metodi di analisi multivariata a segnali fisiologici. Per analisi multivariata si intende una serie di tecniche matematiche, nate in seno alla statistica, in cui l'oggetto dell'analisi è formato da almeno due (ma spesso molte) componenti. 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 (Giacomozzi C, Martelli F, Nagel A, Schmiegel A, Rosenbaum D. *Gait & Posture* 2009;29:220-4; Giacomozzi C, D'Ambrogi E, Uccioli L, Nagel A, Rosenbaum D, Martelli F. Abstracts of the SIAMOC 2008 Congress; Martelli F, Giacomozzi C, Schmiegel A, Nagel A, Rosenbaum D. ESM 2006, Munich, Germany, July 25-28, 2006; Giacomozzi C, Martelli F. *Gait & Posture*. 2006;23:464-70), già inserite nelle attività di Reparto 2007, hanno prodotto una serie di studi incentrati sull'utilizzo della *Cluster analysis* come tecnica non supervisionata ed esploratoria su dati multivariati, provenienti tipicamente da registrazioni di dati biometrici in ambito clinico (analisi del movimento, analisi delle immagini).

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, 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

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 dove saranno disponibili collaborazioni esterne adatte e qualificate.

Metodi fisici per l'identificazione di alimenti irradiati

Al momento attuale sono in corso due progetti di ricerca finalizzata finanziati dal Ministero della Salute relativi alla problematica degli alimenti irradiati.

Il primo, proposto dall'Istituto Zooprofilattico della Puglia e della Basilicata, ha la durata di due anni a partire dal 15 novembre 2007 e si propone di estendere i protocolli europei per l'identificazione degli alimenti irradiati di origine animale (carni e pesce) basati su tecniche di tipo fisico a matrici per le quali non esiste una validazione dei metodi a livello nazionale o internazionale. L'obiettivo è quello di stilare protocolli operativi da proporre agli enti deputati al controllo ufficiale degli alimenti. Il progetto prevede una validazione interlaboratorio delle procedure operative e il loro utilizzo per un monitoraggio sugli alimenti irradiati presenti sul mercato nazionale.

Il secondo progetto, proposto dall'Istituto Zooprofilattico della Sicilia, ha una durata di due anni a partire dal 15 gennaio 2009. L'obiettivo è l'implementazione del metodo basato sulla tecnica della gascromatografia per la ricerca di alimenti irradiati di origine animale (carni e

pesce). L'utilizzo in parallelo della tecnica ESR sulle stesse matrici consentirà di confrontare le prestazioni dei due metodi (soglia di rivelazione, stabilità del segnale, dipendenza dalla dose) e di ricostruire la dose di trattamento.

È in corso anche un'attività di ricerca sulle matrici vegetali (integratori a base di erbe, frutta secca, ecc.) per l'estensione dei protocolli basati sulle tecniche di luminescenza. Le diverse attività sono condotte in collaborazione con il Dipartimento di SPVSA di questo Istituto e con altri enti nazionali ed europei.

Risultati attesi nel triennio

Per quanto riguarda il primo progetto si prevede la stesura e la validazione interlaboratorio dei protocolli operativi per l'identificazione di diverse matrici alimentari di origine animale e lo svolgimento di un monitoraggio sugli alimenti irradiati presenti sul mercato nazionale. Nel corso del secondo progetto verrà messo a punto e validato il metodo di identificazione basato sulla gascromatografia, applicabile agli alimenti contenenti grassi. 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, nella fase finale dei progetti 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.

Nanoparticelle ingegnerizzate: caratteristiche fisico-chimiche e attività biologica

Sono definite nanoparticelle ingegnerizzate (NP) quelle particelle progettate e sintetizzate in maniera tale da avere almeno una dimensione inferiore ai 100 nm. Tali NP possiedono proprietà fisico-chimiche, quali elevato numero di particelle e grande sviluppo superficiale per unità di massa, elevata reattività, che le rendono particolarmente interessanti per applicazioni industriali, ambientali e biomediche. Tuttavia la maggiore reattività delle NP può causare un'attività biologica che differisce dalle proprietà dei costituenti chimici dei materiali massivi o dalle particelle più grossolane. Pochi sono i dati in letteratura sull'interazione delle NP con i sistemi biologici. In particolare sono insufficienti i dati sulla modulazione delle proprietà tossicocinetiche e tossicodinamiche delle NP in relazione alle loro caratteristiche strutturali e fisico-chimiche. L'obiettivo del progetto è quello di indagare il ruolo delle principali caratteristiche fisico-chimiche (distribuzione dimensionale, forma, sviluppo di superficie, struttura cristallina e composizione chimica) nell'induzione di citotossicità, stress ossidativo, rilascio di mediatori dell'infiammazione da parte di NP su colture cellulari *in vitro*. NP commercialmente disponibili saranno caratterizzate mediante microscopia elettronica a scansione munita di spettrometria a raggi X a dispersione di energia e microscopia elettronica a trasmissione. Saranno inoltre esaminate le modificazioni morfologiche e ultrastrutturali indotte dalle NP su colture cellulari *in vitro*.

Tale progetto di ricerca sarà svolto in collaborazione con i Reparti Metodi ultrastrutturali per terapie innovative antitumorali e Patologia infettiva ultrastrutturale del Dipartimento di TES.

Risultati attesi nel triennio

L'analisi morfologica e ultrastrutturale delle NP mediante microscopia elettronica analitica consentirà l'acquisizione e la descrizione di una serie di caratteristiche fisico-chimiche (diametro medio, diametro di Feret, distribuzione dimensionale, forma, numero di particelle,

sviluppo di superficie, struttura cristallina e composizione chimica) coinvolte nei processi di interazione con i sistemi biologici a livello cellulare e subcellulare.

Gli studi *in vitro* consentiranno di determinare le proprietà tossicologiche delle NP, in particolare quali di esse sono citotossiche, inducono necrosi, apoptosi, stress ossidativo e risposta infiammatoria.

I dati della caratterizzazione chimico-fisica e delle proprietà tossicologiche delle NP saranno correlati. Le correlazioni individuate consentiranno la determinazione della curva dose-risposta, in cui la dose sarà espressa in termini di massa, sviluppo di superficie delle NP. I dati sperimentali ottenuti consentiranno una migliore comprensione del meccanismo di azione delle NP.

Trasferibilità dei risultati

Le limitate conoscenze delle caratteristiche delle NP collegate agli effetti sanitari, come anche dei meccanismi alla base di tali effetti, rendono ad oggi difficile la valutazione del rischio per le popolazioni esposte e di conseguenza la programmazione di efficaci iniziative, anche a livello normativo, per la prevenzione.

Fornire risposta a questa problematica può consentire una più attendibile valutazione del rischio sanitario associato alle NP, la definizione di razionali standard di qualità e la programmazione di più efficaci interventi di prevenzione. Inoltre l'approfondita conoscenza a livello subcellulare e molecolare delle eventuali alterazioni ultrastrutturali e funzionali indotte dall'interazione *in vitro* tra nanoparticella e cellula potrà fornire utili indicazioni per la formulazione di nuove nanostrutture a più elevata attività biologica con minori effetti tossici collaterali.

Politiche di protezione dalle radiazioni non ionizzanti

L'ISS è da vari decenni impegnato nell'elaborazione di criteri e linee guida per la protezione dall'esposizione a campi elettromagnetici, in ambito nazionale e internazionale. Di particolare rilievo è la partecipazione al Progetto internazionale Campi Elettromagnetici della WHO, sia con la presenza nel Comitato Consultivo Internazionale, sia con il ruolo di esperto di riferimento per l'Italia. Il responsabile della ricerca è attualmente il Presidente della Commissione Internazionale per la Protezione dalle Radiazioni Non Ionizzanti (ICNIRP), istituzione riconosciuta come il più importante riferimento a livello mondiale per l'elaborazione di norme e politiche di protezione. Tutte le suddette attività forniscono una base fondamentale per le attività istituzionali di consulenza in materia agli organi dello Stato e alle Regioni. Esse si connettono anche direttamente al Progetto "Campi elettromagnetici e salute" del Ministero della Salute – Centro Controllo Malattie, rivolto particolarmente alla valutazione e comunicazione del rischio in ambito nazionale. La conclusione del progetto è prevista per il novembre 2009, ma alcune attività proseguiranno oltre tale data.

Risultati attesi nel triennio

Nell'ambito del Progetto "Salute e campi elettromagnetici" è prevista la produzione di un documento che esprima la posizione del Ministero della Salute sugli effetti sanitari dell'esposizione. In campo internazionale, la collaborazione nel Progetto CEM della WHO prevede una valutazione generale dei rischi dei campi elettromagnetici a radiofrequenza, mentre la commissione ICNIRP prevede di emanare nuove raccomandazioni per l'esposizione a campi elettrici e magnetici a bassa frequenza, nonché dei documenti di analisi delle modalità di esposizione e dei possibili rischi connessi con nuove tecnologie. Si prevede inoltre un continuo aggiornamento del database scientifico e del sito web creati nel contesto del progetto, anche oltre la scadenza dello stesso, prevista per il novembre 2009.

Trasferibilità dei risultati

Tutti i documenti prodotti, sia a livello nazionale sia come frutto delle collaborazioni internazionali, possono servire come base scientifica e metodologica per lo sviluppo di normative e per la scelta di eventuali altre misure di protezione. In particolare, le linee guida ICNIRP sono state trasferite pressoché integralmente in una direttiva europea che gli stati membri dovranno recepire entro aprile 2012.

Reti, Strutture, Biosistemi

In concomitanza alla dirompente crescita di Internet si è avuta un'analogica crescita nello studio delle reti nei contesti più disparati. Un punto di riferimento è l'articolo di Watts e Strogatz "*Collective dynamics of small world networks*" pubblicato su *Nature* nel 1998 e oggi possiamo tranquillamente dire che quello che stiamo osservando è un nuovo e sorprendente paradigma che riguarda anche il mondo della ricerca biomedica e della sanità pubblica; tale paradigma tocca pressoché ogni ordine di grandezza: dalle reti nei sistemi fisiologici, le reti proteiche e metaboliche, le strutture di cellule e tessuti, sino alle reti nell'organizzazione delle strutture sanitarie passando anche per le strutture e i sistemi cognitivi.

Lo studio della profonda interazione dinamica tra reti, strutture e sistemi è pertanto lo scopo di questa linea di ricerca che verrà condotta facendo riferimento allo studio dei seguenti temi: i) Realizzazione di strumenti hardware e software per la simulazione della dinamica di reti e strutture in generale. ii) Proprietà strutturali di proteine amiloidee, una famiglia di proteine coinvolte in varie malattie neurodegenerative. iii) Caratterizzazione strutturale del sistema percezione-azione. iv) Processi sottostanti la dinamica della formazione e della "resilienza" della Riserva Cognitiva.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio modellistico di reti, strutture e biosistemi verrà condotto con il cluster di calcolo in funzione presso il Dipartimento TES. Il *cluster* stesso è una *small world network* e la sua architettura, isomorfa al sistema da simulare, è oggetto di studio di questa linea; verrà potenziato e verranno differenziate le tecnologie hardware-software del *cluster* stesso per adattarne l'utilizzo ai campi applicativi sopra elencati.

Lo studio riguardante le proteine amiloidee cercherà di individuare quali siano le caratteristiche strutturali della proteina (*misfolding* e oligomerizzazione) e della membrana cellulare (*raft* lipidici o proteine di membrana) che controllano i meccanismi di neurotossicità. Infine, in collaborazione con il Dipartimento BCN, si cercherà di correlare queste informazioni con quelle provenienti da studi realizzati su linee cellulari neuronali primarie.

Nelle tematiche iii) e iv) si punta all'individuazione degli stimoli sensoriali più efficaci per l'induzione programmata della plasticità cerebrale (in collaborazione con l'Università Tecnologica di Helsinki) e allo sviluppo di nuovi approcci per la valutazione, il mantenimento e, eventualmente, il potenziamento della riserva cognitiva dell'anziano. Si intende pervenire alla definizione di protocolli preventivi e di recupero fondati sull'impiego efficace della riserva cognitiva individuale.

Trasferibilità dei risultati

L'utilizzo di *tool* computazionali, in particolar modo di calcolo parallelo, è un fattore decisivo in tutta la ricerca biomedica moderna. I trasferimenti immediati saranno nel campo della biologia dei sistemi, delle tecnologie di imaging, nell'analisi e rappresentazione dei dati. L'intento di questa attività è anche quello di proporre e, comunque, stimolare sinergie e collaborazioni all'interno del Dipartimento TES e più in generale nell'ISS.

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.

Le ricerche comportamentali unite a tecniche di oggettivazione dell'attività mentale per rilevare conservazione, adattabilità e flessibilità delle capacità cognitive potranno avere una ricaduta di ricerca e clinica nell'ambito della convenzione instaurata con il consorzio Cirid al quale fanno capo competenze anche cliniche della Sapienza Università di Roma (Facoltà di Psicologia, Psichiatria e Ingegneria). In tale ambito si potranno trasferire e applicare i risultati della ricerca e in particolare la definizione di profili di rischio in relazione alla riserva cognitiva individuale e l'applicazione di programmi di allenamento individuali tesi a rallentare il decadimento cognitivo e prevenire l'insorgere di patologie neuropsicologiche.

Simulazione Monte Carlo del danno molecolare prodotto nelle cellule dalle radiazioni ionizzanti: correlazione con gli effetti cellulari

Il danno molecolare causato al DNA dalle radiazioni ionizzanti viene processato dai sistemi enzimatici di riparo. I danni residui, o non correttamente riparati, in particolare le doppie rotture (DSB) del DNA, sono responsabili dei successivi effetti cellulari, quali la morte o le aberrazioni cromosomiche. L'evidenza sperimentale ha mostrato che tali effetti, a parità di dose, variano molto con la qualità della radiazione: gli effetti dovuti a particelle cariche di alto LET (*linear energy transfer*) sono maggiori di quelli causati dai raggi gamma. Tuttavia, i dati sul numero di DSB hanno mostrato una variazione molto minore, e spesso non si è trovata una sostanziale differenza tra particelle cariche e raggi gamma. La differenza di effetti cellulari è così attribuita alla diversa distribuzione del danno iniziale, che si traduce in una diversa efficacia di riparazione.

In collaborazione con il Reparto di Biofisica della radiazioni ionizzanti e con l'Università di Pavia, l'obiettivo di questo progetto è l'utilizzo del codice Monte Carlo PARTRAC per simulare il danno radioindotto sul DNA dalle radiazioni ionizzanti. Questo codice simula l'intero processo fisico e fisico-chimico dalla deposizione di energia da parte della radiazione fino alla formazione delle rotture del DNA. Esso permette naturalmente di rivelare anche danni "complessi" inaccessibili all'osservazione sperimentale, cioè DSB molto vicine. Si ritiene che questo tipo di danno è quello più difficilmente riparabile.

Risultati attesi nel triennio

Il confronto tra diversi dati sperimentali sul danno radioindotto sul DNA e i risultati ottenuti con PARTRAC ha validato il codice, giustificando il suo utilizzo per ricavare dati non accessibili all'osservazione. Questa validazione è stata eseguita anche nell'ambito del precedente piano triennale che verteva sulla stessa tematica. L'obiettivo che si intende raggiungere si può riassumere come segue.

Si mirerà ad ottenere una caratterizzazione più completa possibile delle proprietà statistiche della distribuzione delle DSB, in funzione della dose rilasciata, del LET e della carica delle particelle incidenti, con particolare attenzione allo studio del danno complesso, sopra definito. Questo richiederà un programma sistematico di un gran numero di simulazioni. La focalizzazione sul danno complesso, che come detto è quello non osservabile, è giustificata non solo dal fatto che esso è direttamente connesso agli effetti cellulari tardivi, ma anche dall'importanza che esso riveste a basse dosi, argomento sul quale il proponente e i colleghi con cui collabora sono impegnati nell'ambito di un progetto europeo. Infatti, DSB molto vicine sono causate, quasi sempre, da singole tracce, e quindi sono presenti anche alle dosi più basse nelle cellule effettivamente attraversate dalla radiazione. I risultati previsti saranno quindi utili sia per la radioterapia che, nel campo della ricerca di base e della radioprotezione, per una migliore comprensione degli effetti a basse dosi.

Trasferibilità dei risultati

Pubblicazioni scientifiche, partecipazione a convegni.

Sistema di controllo di un fascio di protoni per terapia oncologica

Il presente progetto riprende e intende completare gli sviluppi avviati più di dieci anni fa con il programma TOP (Terapia Oncologica con Protoni).

Esso è condiviso dai ricercatori del Reparto e strettamente legato al progetto di diagnostica di fascio di protoni.

A differenza della radioterapia convenzionale (con elettroni e fotoni), pur tenendo conto dei progressi degli ultimi anni, un fascio di protoni, e più in generale di ioni, permette una elevata conformazione della dose rilasciata alla regione tumorale e quindi una migliore preservazione dei tessuti sani circostanti.

Questa specificità è combinata con le caratteristiche di un acceleratore lineare, in cui è possibile – a differenza di altre tipologie acceleranti – una completa modulabilità (in tempi minori del tempo tipico di movimento degli organi) dei parametri rilevanti del fascio e quindi la possibilità di ottenere uno *scanning* attivo 4-dimensionale: posizione trasversa del fascio (scansione trasversa), energia (scansione in profondità), intensità (scansione in dose). L'acceleratore lineare pertanto è il sistema naturalmente votato alla terapia altamente conformazionale.

Il progetto consiste nella progettazione e realizzazione del sistema di controllo dell'acceleratore lineare per la produzione di un fascio di protoni impulsato per protonterapia.

Tale acceleratore utilizzerà l'iniettore – proprietà dell'ISS – già sviluppato nell'ambito del richiamato progetto TOP. Tale acceleratore fornirà un fascio di protoni da 237 MeV (140 MeV nella prima fase di realizzazione della durata di tre anni) impulsato (200 Hz), con intensità, direzione (e in qualche misura energia) variabile e controllabile.

Il sistema di controllo dovrà innanzitutto salvaguardare la sicurezza del paziente. In secondo luogo dovrà garantire il rilascio della corretta dose.

Per questa ragione dovrà soddisfare criteri di affidabilità, facilità di manutenzione, automazione, pronta risposta (tenuto conto della frequenza del fascio), avendo cura di contenere i costi.

Risultati attesi nel triennio

Il sistema di controllo dovrà aver cura di tutti i componenti attivi dell'apparato di protonterapia: l'acceleratore con tutti i suoi sottosistemi, le eventuali linee di estrazione ed eventuali attrezzature nelle sale di terapia.

I suoi componenti provvederanno a controllare il sistema di diagnostica (oggetto di un progetto parallelo), il sistema di raffreddamento e di vuoto, il sistema dei magneti e di radiofrequenza, la temporizzazione del fascio e i sistemi di sicurezza e di radioprotezione.

Nell'ottica di realizzare un sistema modulare, si intende introdurre tre livelli hardware: livello 0 o di apparato che raccoglie l'eventuale elettronica di *front-end*, i sensori e gli attuatori, in prossimità delle attrezzature controllate; livello 1 o di raccolta, che provvede a collezionare i dati provenienti dal o destinati al livello precedente, nonché di provvedere all'opportuna elaborazione locale degli stessi. In questo livello opereranno sistemi microcontrollori e le relative interfacce ai livelli precedente e successivo.

Livello 2 o di operatore, provvede all'interfaccia verso l'operatore e alle elaborazioni di alto livello (tra cui la visualizzazione dei dati nella forma più opportuna).

L'infrastruttura di interconnessione è prevista essere di tipo *fieldbus* ai livelli 0 e 1 e di tipo LAN tra 1 e 2.

Il software, che riveste un aspetto rilevante dell'intero sistema sarà anch'esso sviluppato sulla base di criteri di modularità e affidabilità, tenendo conto della architettura hardware distribuita.

Particolare attenzione verrà dedicata all'ottimizzazione delle funzionalità uniche dell'acceleratore LINAC e in particolare ad una stretta integrazione con il sistema di diagnostica.

Trasferibilità dei risultati

Il nuovo acceleratore lineare per protonterapia che si intende realizzare è il primo al mondo, promette di essere relativamente economico, compatto e con performance uniche e adeguate per una radioterapia conformazionale ottimale.

Il sistema di controllo a sua volta presenterà delle funzionalità che riflettono le peculiarità dell'acceleratore.

Un'eventuale sviluppo di acceleratori lineari per protonterapia o acceleratori pulsati potranno usufruire del sistema di controllo proposto per migliorare le loro performance.

Inoltre, alcune delle soluzioni che verranno adottate potranno probabilmente essere estese a sistemi di controllo in altri settori.

Sistema di diagnostica di un fascio di protoni per terapia oncologia

Il presente progetto intende completare gli sviluppi avviati più di dieci anni fa dal programma TOP (Terapia Oncologica con Protoni). Esso è condiviso dai ricercatori del Reparto e correlato allo sviluppo del sistema di controllo del fascio di protoni.

A differenza della radioterapia convenzionale, un fascio di protoni (ioni pesanti), permette una elevata conformazione della dose rilasciata alla regione tumorale e quindi una migliore preservazione dei tessuti sani circostanti.

Questa specificità, combinata con le caratteristiche di un acceleratore lineare di protoni, dovrebbe permettere uno *scanning* attivo 4-dimensionale: posizione trasversa del fascio (scansione trasversa), energia (scansione in profondità), intensità (scansione in dose). L'acceleratore lineare pertanto è il sistema naturalmente votato alla terapia altamente conformazionale.

Il presente progetto consiste nello sviluppo e realizzazione di un sistema di diagnostica nell'ambito del programma di sviluppo e realizzazione di un acceleratore lineare, che utilizzerà l'iniettore – proprietà dell'ISS – già sviluppato nell'ambito del richiamato progetto TOP.

Il sistema di diagnostica dovrà essere in grado di misurare, indirettamente, la dose rilasciata e la regione del rilascio.

Esso sarà composto da piccole camere (dimensioni di circa 10x10 cm²) a ionizzazione a *micropattern* (passo da circa 0,5 mm) con elettronica di lettura multiportata per avere accuratezza relativa costante su ampio intervallo.

Risultati attesi nel triennio

Il sistema di diagnostica dovrà essere in grado di:

- inibire il fascio qualora sia raggiunta la dose prescritta
- correggere in modo automatico eventuali derive dei parametri del fascio dal loro punto ottimale di lavoro.

Soprattutto il secondo obiettivo permetterà di sfruttare in modo ottimale le specificità dell'acceleratore e la sua flessibilità nella modulazione dei parametri del fascio.

Il sistema di diagnostica dovrà interfacciarsi con il sistema di controllo, i magneti per il rilascio del fascio, il sistema di radio frequenza e il sistema di sicurezza.

Tenuto conto della frequenza degli impulsi di protoni (circa 200 Hz), l'acquisizione ed elaborazione dei dati sul fascio e la generazione dell'eventuale comando ai predetti sistemi dovrà avvenire entro il millisecondo.

Ciascuna camera che si intende realizzare sarà composta da un sandwich di fogli di mylar alluminizzato e di kapton ramato per uno spessore complessivo di circa 0,015 g/cm².

Considerato l'ampio range dinamico, l'elettronica sarà basata sulla raccolta della carica in condensatore a capacità variabile (automaticamente) a seconda del segnale di ingresso.

In definitiva ci si attende un sistema composto da camere a ionizzazione con elettronica dedicata in grado di coprire un ampio range dinamico e avere una risposta temporale compatibile con le necessità sopra menzionate.

Trasferibilità dei risultati

Il nuovo acceleratore lineare per protonterapia che si intende realizzare è il primo al mondo, promette di essere relativamente economico, compatto e con performance uniche e adeguate per una radioterapia conformazionale ottimale.

D'altro canto, gli attuali sistemi di diagnostica per fasci terapeutici sono generalmente basati su camere a ionizzazione con lettura corrente-frequenza, intrinsecamente non idonei per fasci impulsati rapidi.

Al contrario, il sistema di diagnostica del presente progetto, pensato proprio per fasci impulsati, contribuisce ad utilizzare al meglio le peculiarità del fascio.

Un'eventuale sviluppo di acceleratori lineari per protonterapia o acceleratori pulsati potranno usufruire del sistema di diagnostica proposto per migliorare le loro performance.

Inoltre, l'elettronica a ampio range dinamico potrebbe facilmente trovare applicazione anche in altri settori, al momento non specificatamente individuati.

Sostanze naturali e terapie innovative

L'impiego dei prodotti naturali, quale potenziale approccio terapeutico alternativo per il trattamento di alcune patologie cronico-infettive e per lo sviluppo di terapie innovative in oncologia, è una delle più recenti priorità della ricerca biomedica internazionale. Questa nuova prospettiva è sorta sotto la spinta pressante di notevoli problemi correlati all'insorgenza della farmacoresistenza sia nella terapia anti-tumorale che anti-microbica. I due fenomeni in alcuni casi condividono meccanismi biologici e quindi eventuali target farmacologici filogeneticamente conservati.

In questo contesto si ritiene possa essere utile un'attività di ricerca mirata alla comprensione del meccanismo di azione e alla valutazione dell'efficacia farmacologica di alcune sostanze naturali di origine vegetale e animale su modelli sperimentali *in vitro* (eucarioti inferiori, cellule tumorali) e su modelli tumorali *in vivo*. Le sostanze naturali di origine vegetale di cui si valuterà l'attività provengono da: *Aloe barbadensis*, *Mentha suaveolens*, *Melaleuca alternifolia* e *Peschiera fuchsiaefolia*. Si valuterà inoltre l'attività di una sostanza naturale di origine animale, la monoaminossidasi da siero bovino. Di tali sostanze sarà valutata l'attività citotossica e/o chemiosensibilizzante. Allo scopo di modulare il fenotipo farmacoresistente dei tumori, verrà facilitato l'*uptake* del chemioterapico doxorubicina e della sostanza naturale voacamina (*Peschiera fuchsiaefolia*) ricorrendo all'impiego dell'elettroporazione (*in vitro* e *in vivo*).

Risultati attesi nel triennio

- Definizione delle concentrazioni sub-citossiche potenzialmente utili per aumentare l'attività dei farmaci anti-microbici e anti-tumorali convenzionalmente utilizzati in clinica, allo scopo di ridurre le dosi impiegate in terapia nell'uomo.
- Delucidazione dei meccanismi molecolari responsabili degli effetti biologici (morte cellulare, attività citostatica) indotti da queste molecole sia *in vitro* (su ceppi farmaco-

resistenti) sia *in vivo* mediante studi pre-clinici eseguiti su animali. 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.

- Valutazione *in vitro* e *in vivo* sull'efficacia dell'elettroporazione, nel potenziare l'effetto citotossico indotto dalla doxorubicina e dal trattamento combinato voacamina-doxorubicina su cellule tumorali farmaco-resistenti. L'elettroporazione sarà utilizzata anche per aumentare l'efficacia di silenziamento dei principali geni coinvolti nel processo autofagico in quei tumori, come il carcinoma mammario, in cui l'autofagia ne favorisce la crescita. Per il raggiungimento di questo obiettivo verranno utilizzate tecniche morfologico-ultrastrutturali, immunoistochimiche, citofluorimetriche e di biologia molecolare.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti potranno avere un impatto importante sulla salute pubblica offrendo indicazioni utili per l'ottimizzazione dell'impiego terapeutico di alcuni "farmaci naturali". In particolare, 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.

Stima del rischio connesso con la produzione di energia nucleare: reattori di III generazione

È attualmente in esame al Senato il DDL 1195 "Disposizioni per lo sviluppo e l'internazionalizzazione delle imprese, nonché in materia di energia", che all'art. 14 delega il Governo ad emanare uno o più decreti legislativi di riassetto normativo recante criteri per la disciplina della localizzazione di centrali nucleari, le procedure autorizzative e i requisiti per la costruzione, esercizio e disattivazione. Vengono inoltre stabiliti i principi che deve rispettare la delega e in particolare viene ribadito che devono essere soddisfatte "le esigenze di tutela della salute della popolazione e dell'ambiente" e viene prevista l'"acquisizione di dati tecnico-scientifici predisposti da enti pubblici di ricerca e università". In previsione di un futuro riutilizzo in Italia della fonte nucleare appare quindi particolarmente importante analizzare le problematiche connesse con l'utilizzo di reattori di nuova generazione. Si intende in particolare utilizzare il modello RANA (*Radiological Assessment of Nuclear Accident*), messo a punto presso l'ISS, al fine di valutare le conseguenze sanitarie di eventi incidentali in centrali nucleari di III generazione, che dovrebbero essere costruite in Italia. Questa tipologia di reattori, pur utilizzando le tecnologie dei reattori attualmente in funzione, è caratterizzata da miglioramenti in termini di sicurezza, con l'obiettivo di limitare i rilasci radioattivi all'esterno della centrale anche in caso di incidenti con fusione del nocciolo.

Risultati attesi nel triennio

La prima fase del progetto sarà rivolta allo studio delle caratteristiche degli impianti di III generazione, focalizzando l'attenzione sull'analisi di sicurezza e sulla produzione di rifiuti radioattivi. Successivamente dovrà essere aggiornata la banca dati del modello RANA, attualmente basata sui reattori in esercizio in Europa. Infatti, a seguito della moratoria nucleare decisa nel 1987 in Italia, il modello RANA è stato fino ad oggi essenzialmente utilizzato per il calcolo delle conseguenze sanitarie di eventi incidentali severi in centrali nucleari in esercizio oltre in confine italiano o in impianti nucleari di altra natura. Individuato uno scenario incidentale di riferimento per una centrale della filiera EPR (*European Pressurized Reactor*)

verranno calcolate la struttura spaziale e temporale della contaminazione radioattiva in aria e al suolo per le diverse condizioni di diffusione atmosferica e le dosi previste per gli individui della popolazione in funzione della distanza dalla centrale nucleare. Si intende analizzare sia la fase immediatamente successiva all'incidente sia la fase intermedia per quanto riguarda in particolare la contaminazione degli alimenti.

Le stime del rischio radiologico connesso all'utilizzo dell'energia nucleare per la produzione di elettricità hanno un ruolo importante ai fini sia della scelta dei siti ove localizzare gli impianti, sia della pianificazione degli interventi di emergenza.

Studio dei meccanismi di defibrillazione mediante terapia elettrica: realizzazione di un defibrillatore a forma d'onda arbitraria

La defibrillazione elettrica è una delle metodiche per il ripristino di un ritmo sinusale nelle camere cardiache, ma le limitazioni della tecnologia esistente è ampiamente riconosciuta in letteratura. Il progetto ha come obiettivo, a partire da quanto suggerito dalla letteratura più recente (Malkin, *et al. IEEE Trans BME* 2006) e dall'esperienza accumulata dai ricercatori del Reparto, la realizzazione di un defibrillatore a forma d'onda arbitraria. Il primo anno sarà dedicato all'analisi della letteratura, degli attuali limiti tecnologici e delle possibili soluzioni per superarli. In questa fase ci si avvarrà inoltre dei risultati provenienti dall'utilizzo di un prototipo recentemente sviluppato e attualmente in uso presso i laboratori della *Food and Drug Administration* (FDA). I successivi 12 mesi verranno impiegati per la realizzazione di uno o più prototipi e del software necessario per il controllo del sistema. Ci si avvarrà dell'esperienza e della competenza dei ricercatori e dei tecnici del Reparto in materia di utilizzo di microcontrollori e di codice Labview. Nell'ultimo anno è previsto l'utilizzo dei sistemi realizzati in prove di defibrillazione su colture cellulari o organi perfusi, l'eventuale ingegnerizzazione dei prototipi e la pubblicazione dei risultati conseguiti.

Risultati attesi nel triennio

Output principale del progetto sarà la realizzazione di più prototipi di defibrillatori a forma d'onda arbitraria e il loro utilizzo in esperimenti di defibrillazione su colture cellulari e in cuori *ex vivo*. Ci si aspettano inoltre nuove informazioni relativamente all'eventuale effetto proaritmico di impulsi di durata relativamente lunga (>10msec) e sui meccanismi alla base del cambiamento di impedenza elettrica durante lo shock (elettroporazione delle membrane cellulari). L'utilizzo dei prototipi in laboratori di elettrofisiologia e di *imaging* elettrofisiologico rappresenterà un momento significativo di crescita scientifica del personale coinvolto nella ricerca.

Ulteriore ricaduta delle attività del progetto sarà rappresentata dal miglioramento delle capacità progettuali e realizzative del personale tecnico e di ricerca in un settore dell'elettronica (dispositivi medici di supporto vitale e dispositivi medici impiantabili attivi) di importanza anche per le attività istituzionali del Reparto.

Trasferibilità dei risultati

L'oggetto della ricerca è brevettabile. La disponibilità di un tale dispositivo consentirà l'esecuzione di protocolli sperimentali per lo studio dei meccanismi alla base della defibrillazione elettrica, a tutt'oggi non realizzabili. Gli esperimenti realizzati consentiranno di acquisire informazione di base sui meccanismi di defibrillazione e sulla possibilità di ridurre le energie attualmente utilizzate, riducendo di conseguenza i rischi per i pazienti.

Studio dell'accoppiamento neuro vascolare mediante tecniche di elettrofisiologia della visione

Il progetto nasce dagli sviluppi delle ricerche svolte nel passato triennio di attività, riguardanti l'impiego di tecniche elettrofisiologiche nel monitoraggio di trattamenti laser termici della retina e nello studio delle maculopatie degenerative. Le tecniche sviluppate verranno impiegate per raccogliere dati sulle dinamiche temporali della risposta elettrofisiologica in soggetti sottoposti a stimolazione visiva protratta nel tempo (circa tre min., stimolo *flicker* o *pattern*). Alcune evidenze emerse nei precedenti studi suggeriscono che tali dinamiche siano legate a soggiacenti meccanismi di adattamento metabolico (iperemia funzionale) mediante i quali la retina cerca di sostenere il costo energetico dell'attività nervosa evocata dallo stimolo.

L'approfondimento di questi studi, che si trovano oggi in una fase preliminare, richiede in primo luogo di perfezionare il metodo, per raggiungere un maggiore livello di confidenza nella stima della risposta, senza compromettere la risoluzione temporale. Allo scopo verranno sperimentate tecniche innovative di acquisizione ed elaborazione del segnale ERG, associate ad elaborazione di immagini funzionali della retina, ottenute con metodi riflettometrici o laser doppler.

Dovranno inoltre essere messi a punto idonei strumenti statistici (statistica circolare), per poter valutare correttamente i dati espressi in termini di componenti vettoriali di Fourier.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto permetterà in primo luogo di mettere a punto un protocollo sperimentale per valutazioni funzionali retiniche sull'uomo, particolarmente adatto per lo studio dell'accoppiamento neurovascolare. Lo studio sperimentale sarà completato dallo sviluppo di un modello bioingegneristico, che comprenderà principalmente gli aspetti di bilancio energetico.

La migliore comprensione di questi meccanismi fisiologici e la loro caratterizzazione mediante modelli validati e dati normativi permetterà di indagare le alterazioni in situazioni patologiche, in primo luogo nel caso della retinopatia diabetica. L'importanza che è stata recentemente riconosciuta agli aspetti neurologici di questa patologia rende particolarmente interessante la possibilità di test clinici che evidenzino l'accoppiamento neurovascolare ed eventuali effetti di farmaci neuroprotettori.

Collaborazioni esterne:

Dipartimento di Oftalmologia, Università Cattolica, Roma.

Fondazione G.B. Bietti, Roma.

Bascom Palmer University, Miami (FL)

Institut de Recherche en Ophtalmologie, Sion, Svizzera

Director National Eye Institute, NIH Bethesda (MD)

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 è tra gli obiettivi della ricerca, e verrà sperimentata fin dalle prime fasi, nell'ambito delle collaborazioni esterne previste dal progetto.

Gli aspetti tecnologici, riguardanti lo sviluppo di programmi e strumenti elettronici, potranno essere oggetto di specifiche pubblicazioni su riviste di bioingegneria o dar luogo a brevetti industriali.

Date le caratteristiche di generalità e applicabilità dei metodi considerati è ipotizzabile una più ampia diffusione a livello dell'SSN.

Studio dell'attività della lattoferrina sull'infezione da virus influenzale

Le infezioni da virus influenzale costituiscono un problema clinico rilevante con un notevole impatto sanitario, economico e sociale. In particolare i virus dell'influenza A, a causa dell'emergenza periodica di nuovi tipi antigenici, possono causare pandemie caratterizzate da elevata morbilità e mortalità. La vaccinazione rappresenta la principale misura preventiva contro l'influenza ma, poiché ci vuole tempo per produrre un prodotto antigenicamente appropriato e immunogenico e distribuirlo all'intera popolazione, i farmaci antivirali costituiscono la principale contromisura per ridurre l'impatto di una nuova pandemia. Il trattamento con i farmaci in commercio spesso non è in grado di bloccare completamente l'infezione e presenta alcuni svantaggi legati a fenomeni di tossicità e alla selezione di ceppi virali resistenti. Appare quindi evidente che è necessario individuare urgentemente efficaci terapie antivirali alternative per affrontare eventuali pandemie. È noto che i bambini allattati al seno contraggono infezioni respiratorie in misura significativamente minore rispetto ai bambini allattati con latte artificiale. È stato dimostrato che l'attività protettiva del latte umano, per lungo tempo attribuita esclusivamente alla presenza di IgA secretorie, è mediata anche da altri componenti proteici, quali ad esempio la lattoferrina (Lf). In base a quanto premesso lo scopo di questo progetto è quello di analizzare l'effetto della Lf sull'infezione da virus influenzale.

Risultati attesi nel triennio

Sarà studiata l'attività anti-influenzale della lattoferrina di origine umana e bovina utilizzando differenti sottotipi di virus dell'Influenza A e diversi modelli cellulari. In particolare gli studi saranno rivolti a individuare e caratterizzare una o più componenti della lattoferrina che, a concentrazioni fisiologiche, siano in grado di prevenire il processo infettivo nei suoi stadi precoci e quindi possano essere utilizzate per la messa a punto di interventi terapeutici mirati. Essendo la lattoferrina una proteina bilobata, questi studi hanno come obiettivo la caratterizzazione dell'attività dei due lobi (lobo N e lobo C) e dei diversi frammenti peptidici ottenuti in seguito a digestione enzimatica della lattoferrina allo scopo di identificare in modo più preciso le sequenze aminoacidiche dotate di attività biologica. Inoltre saranno utilizzate preparazioni di lattoferrina diversamente modificata (deglicosilata, desialilata o saturata con diversi metalli) al fine di identificare il potenziale ruolo degli zuccheri e dei metalli nell'azione antivirale della glicoproteina. In particolare sarà analizzata l'attività di preparazioni di lattoferrina differenzialmente sature in ferro per valutare l'eventuale importanza di questo metallo nel modulare l'infezione virale nei nostri sistemi sperimentali. Lo studio sarà condotto in collaborazione con il Reparto di Malattie virali e vaccini inattivati del Dipartimento MIPI che fornirà i diversi ceppi virali impiegati nella ricerca.

Trasferibilità dei risultati

L'identificazione delle componenti della lattoferrina responsabili dell'attività anti-influenzale aggiungerà informazioni essenziali per la caratterizzazione delle proprietà chemioterapiche di questa molecola. L'individuazione delle fasi del processo infettivo virale (attaccamento, internalizzazione, sintesi di componenti virali, rilascio di virioni) sensibili all'azione della molecola intera, o di parti di questa, porterà a comprenderne il meccanismo d'azione. Nell'insieme questo studio potrà produrre informazioni importanti per possibili applicazioni terapeutiche della lattoferrina, una sostanza naturale di facile reperimento e a basso costo, da sola o in combinazione con altre sostanze ad azione antivirale nota, in malattie di rilevanza sanitaria quali l'influenza. Infine, 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 questa patologia.

Studio della radioattività ambientale artificiale e naturale modificata da attività umane

1. Dopo l'incidente alla centrale nucleare di Chernobyl, analogamente a quanto avvenne dopo il *fallout* radioattivo negli anni '60, l'ambiente è diventato un laboratorio ove studiare il trasferimento dei radionuclidi da un compartimento all'altro dello stesso e alle persone e i loro escreti. L'ISS ha sviluppato sin da quegli anni un'attività di ricerca sulle conseguenze, 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. Si intende ora sviluppare, in collaborazione con il *German Research Center for Environmental Health (Helmholtz Zentrum, München)*, una modellizzazione dei dati di contaminazione del latte materno, misurati negli anni successivi all'incidente, al fine di studiare il trasferimento dei radionuclidi dalla dieta della madre al suo latte.

2. Tra i problemi di sanità pubblica derivanti dalla radioattività ambientale la comunità scientifica internazionale e le autorità di radioprotezione europee considerano attualmente importante studiare le esposizioni dei lavoratori e della popolazione a NORM, materiali di origine naturale che, per le lavorazioni a cui sono sottoposti, concentrano il loro contenuto di radionuclidi naturali. Il progetto, in collaborazione con ISPESL e ISPRA (ex APAT) intende sviluppare, in particolare, 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.

Risultati attesi nel triennio

1. La modellizzazione dei dati di contaminazione del latte materno permetterà di studiare il trasferimento dei radionuclidi dalla dieta della madre al suo latte, valutandone la variabilità interindividuale, dato quasi assente in letteratura.

2. L'analisi dei materiali da costruzione permetterà di preparare un inventario dei dati di radioattività naturale nei materiali europei – analogamente a quanto è già stato fatto in passato per i materiali italiani – e di valutare la dose gamma per i cittadini europei. Lo studio del contenuto di radionuclidi naturali nelle fosforiti e nei fosfogessi permetterà di studiare la situazione di estremo disequilibrio che si crea nella catena dell'uranio e torio e la significatività dei diversi radionuclidi, ai fini della stima della dose alla popolazione.

Trasferibilità dei risultati

I risultati del lavoro di inventario sul contenuto di radionuclidi naturali nei materiali da costruzione, dopo pubblicazione sulla letteratura internazionale, saranno messi a disposizione della Commissione Europea e saranno una base fondamentale per l'elaborazione della direttiva EURATOM in preparazione sullo stesso argomento.

Le discariche italiane di fosfogessi sono state definite "siti di bonifica di interesse nazionale" e i pareri di radioprotezione emanati in merito saranno la base per la messa in sicurezza definitiva di tali siti e, ove necessario, per lo smantellamento definitivo degli impianti di produzione contaminati.

L'esperienza scientifica di ricerca nello studio della 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 di questo progetto partecipa da anni come esperta italiana con nomina personale.

Studio delle sorgenti di radioattività naturale e dell'uranio impoverito

1. Sorgenti di radioattività naturale negli ambienti chiusi: attività di ricerca articolata in quattro linee: i) sviluppo di procedure di analisi di spettrometria gamma finalizzate alla misura del contenuto di radioattività naturale di un campione; analisi degli aspetti specifici, messa a

punto e utilizzo di uno spettrometro a geometria planare per la misura di emettitori gamma di bassa energia; ii) validazione e utilizzo, nell'ambito di indagini epidemiologiche, di un metodo per la valutazione del rateo di dose da radiazione gamma indoors sulla base di misure eseguite all'esterno di un edificio; iii) sviluppo e utilizzo di varie tecniche per misurare la concentrazione di attività di toron e determinazione di un protocollo standard per la misura di questo gas; analisi di modelli (*room model*) specifici per il toron e i suoi prodotti di decadimento; iv) studio della radioattività naturale nelle acque destinate al consumo umano in quanto sorgente di esposizione della popolazione.

2. 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; inoltre si sta avviando un progetto per la realizzazione di un portale dove siano reperibili informazioni bibliografiche (tipo PubMed) per la comunità scientifica, e divulgative per il largo pubblico.

Collaborazioni: AIEA, ENEA-Casaccia, ARPA Lombardia.

Risultati attesi nel triennio

1. Analisi ed elaborazione dei dati di dose gamma *outdoor* per la stima della dose gamma *indoor* dovuta ai materiali da costruzione; 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; messa a punto di tecniche sperimentali per la misura di radionuclidi naturali nell'acqua.

2. 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 corrette ma accessibili. Si prevede inoltre l'applicazione della spettrometria gamma e l'inizio di un'analisi di fattibilità sul possibile utilizzo all'uranio impoverito del sistema HPLC.

Trasferibilità dei risultati

1. Possibilità di effettuare indagini epidemiologiche sugli effetti dell'esposizione ai raggi gamma dovuti ai materiali da costruzione senza necessità di accedere nelle abitazioni selezionate. Stima della dose alla popolazione per l'esposizione a significative sorgenti di radioattività naturale.

2. Diffusione presso la comunità scientifica di referenze bibliografiche con la creazione di una sorta di PubMed per l'uranio impoverito. Trasferimento al largo pubblico di materiale divulgativo corretto.

Sviluppo di soluzioni per l'Ingegneria Biomedica basate sui modelli e i sistemi sensoriali

Sulla base dell'attività già svolta, si intende conseguire esperienze rilevanti nei settori riguardanti la modellistica e i sistemi sensoriali.

Attualmente i filoni di studio riguardano

- Il sistema termoregolatorio: le ricerche effettuate si sono concentrate a partire da studi di simulazione sullo sviluppo di sistemi indossabili per il monitoraggio termografico.
- Il tatto: sviluppo di attuatori vibrotattili per la restituzione di parametri del cammino

- La cinestesi e la propiocezione: sviluppo di sistemi di *Biofeedback* audio e vibrotattili tramite sistemi indossabili per la restituzione di parametri dell'equilibrio posturale in forma audio.
- Il sistema uditivo: studio del sistema uditivo con particolare riferimento agli aspetti relativi alla protesizzazione con impianti cocleari a conduzione ossea e tradizionali.
- La messa a punto di protocolli di validazione di nuovi modelli di telemedicina basati su *tele-imaging* e telemonitoraggio anche con indossabili (quali tele-ecocardiografia, telepatologia, monitoraggio domiciliare).

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi per ciascun filone sono i seguenti:

- Il sistema termoregolatorio: il sistema termoregolatorio svolge un ruolo importante in ambito sanitario visto come centrale di controllo della termoregolazione. Si procederà all'ottimizzazione di sistemi di calibrazione. Dal monitoraggio termografico scaturisce la possibilità di diagnosticare alcune patologie del sistema vascolare neuronale e la presenza di neoplasie.
- Il tatto: la restituzione vibrotattile permette la ricostruzione mentale ottima del passo in soggetti post-ictus. I soggetti non hanno più bisogno di controllare le fasi del passo dato che queste vengono restituite con degli attuatori vibrotattili posti al livello del bacino.
- La cinestesi e la propiocezione: i sistemi di *biofeedback* permettono il miglioramento dell'equilibrio su pazienti vestibolari in termini di spesa energetica, come valutato preliminarmente tramite segnali da sensori di velocità angolare.
- Il sistema uditivo: da questo filone (più recente) ci si aspetta risultati a partire dalla modellistica relativa agli impianti cocleari fino a modelli di riabilitazione dell'impiantato.
- Con riferimento agli studi relativi alla telemedicina verranno sviluppate delle metodologie *ad hoc* di HTA con particolare riferimento ai settori di *teleimaging* e telemonitoraggio basate su questionari tecnici, *checklist*, fascicoli tecnici/dossier, relazioni costo-beneficio, questionari di soddisfazione utente.

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 per ciascuna polarità la trasferibilità:

- Il sistema termoregolatorio: indici di correlazione tra monitoraggio termico d'area e patologie (neurologiche, oncologiche, vascolari).
- Il tatto: indici di ottimizzazione della riabilitazione con protesi sensorizzate con attuatori vibrotattili.
- La cinestesi e la propiocezione: indici di ottimizzazione della riabilitazione con *biofeedback*.
- Il sistema uditivo: in collaborazione con le autorità internazionali. Ottimizzazione dei modelli di coclee. Linee guida per le assegnazioni delle protesi acustiche e per la riabilitazione.
- Studi di telemedicina: la disseminazione scientifica avverrà principalmente attraverso congressi, riviste internazionali.

Tecniche di misura, valutazione dell'esposizione, stima e prevenzione dei rischi sanitari connessi alla radioattività naturale, incluso il Piano Nazionale Radon

Attività suddivise in: A) sviluppo tecniche di misura; B) valutazione dell'esposizione; C) stima dei rischi; D) prevenzione dei rischi.

- A) Sviluppo tecniche di misura della concentrazione di radon e toron, con diversi rivelatori a tracce (LR115 e CR39) in diverse configurazioni.
 - B1) Prosecuzione studio variazioni annuali livelli di radon in abitazioni, implicazioni su stime di rischio e normative.
 - B2) Studio variabilità spaziali e temporali in edifici ad uso lavorativo e conseguenze su normativa.
 - B3) Prosecuzione collaborazione con Telecom-Italia per studi sul radon nel sottosuolo, in edifici lavorativi e in abitazioni, e su radiazione gamma all'aperto e in edifici.
 - B4) Analisi della varianza della concentrazione di radon in diversi dataset italiani.
 - B5) Indagine su radon nelle scuole della Serbia.
 - C1) Completamento analisi dati studio caso-controllo su tumore polmonare ed esposizione a radon e radiazione gamma in abitazioni del Lazio.
 - C2) Completamento analisi dati studio epidemiologico SETIL su leucemie infantili e radiazione gamma nei soggetti di Lazio, Campania e Piemonte.
 - D1) Prosecuzione attività di prevenzione del progetto CCM Avvio del Piano Nazionale Radon per la riduzione del rischio di tumore polmonare in Italia.
 - D2) Partecipazione a progetto europeo "Radon Prevention and Remediation-RADPAR".
- Collaborazioni: CNESP; Dipartimento Epidemiologia ASL RM E; INMRI; ISPESL; Gruppo Coordinamento Nazionale Radon; 11 partner progetto RADPAR, VINCA Institute, Belgrade.

Risultati attesi nel triennio

- A) i) Caratterizzazione risposta a radiazione alfa; ii) valutazione *aging* e *fading*; iii) sviluppo tecniche per elevate concentrazione di radon; iv) sviluppo dispositivo per misura concentrazione di toron.
- B1) Determinazione variazioni temporali su 15 anni della concentrazione di radon in abitazioni.
- B2) Stima variabilità livelli di radon in edifici ad uso lavorativo e valutazione possibili implicazioni normative.
- B3) Completamento mappatura livelli di radon nel sottosuolo urbano e in edifici Telecom in Italia. Mappatura radiazione gamma *outdoor* in Italia.
- B4) Analisi dei fattori che influenzano la concentrazione di radon presente nelle abitazioni di diverse regioni e mappatura della concentrazione di radon in tali regioni.
- B5) Distribuzione territoriale della concentrazione di radon nelle scuole della Serbia.
- B6) Distribuzione spaziale di toron in alcuni locali.
- C1) Stima rischio tumore polmonare da radiazione gamma nelle abitazioni del Lazio e analisi della correlazione tra rateo di dose gamma e concentrazione di radon.
- C2) Stima rischio leucemia infantile da radiazione gamma e sviluppo metodo IN-OUT per stima rateo gamma *indoor* tramite misure *outdoor*.
- D1) Sviluppo Archivio Nazionale Radon in ISS; mappature del radon in Italia; piano di informazione della popolazione; linee-guida e guide tecniche per la riduzione del radon negli edifici; predisposizione di normative.
- D2) Sviluppo di strategie europee di prevenzione e riduzione dei rischi da radon.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti saranno diffusi tramite pubblicazioni scientifiche, comunicazioni a convegni, rapporti di vario tipo, e in casi particolari anche con conferenze stampa. Inoltre essi verranno (o potranno essere) trasferiti in:

- linee-guida nel settore delle tecniche di misura, incluso norme UNI
- piani nazionali e regionali di prevenzione
- linee-guida nel settore della radioprotezione

- predisposizione di normative nel settore della radioprotezione
- linee guida sulla protezione della popolazione e dei lavoratori dall'esposizione al radon
- predisposizione di normative sulla protezione della popolazione e dei lavoratori dall'esposizione al radon
- strumenti urbanistici (piani di coordinamento, piani regolatori, regolamenti edilizi)
- piani nazionali e regionali di prevenzione.

Una *Wireless Body Area Network* per il tele monitoraggio di parametri cardiovascolari

Il telemonitoraggio e la telemedicina sono settori considerati da qualche anno promettenti ai fini di ridurre i costi della sanità pubblica e già beneficiano di dispositivi medicali da usare in remoto. Tuttavia, la scarsa predisposizione verso le nuove tecnologie di particolari tipologie di pazienti, unitamente alla complessità d'uso degli attuali dispositivi, può essere considerato il fattore frenante dello specifico mercato. In particolare, in questo progetto si vuole sviluppare una *Wireless Body Area Network* (WBAN) per misurare e immagazzinare alcune variabili fisiche e parametri cardiovascolari del corpo umano, quali attività fisica, glicemia, pressione arteriosa, elettrocardiogramma, saturazione d'ossigeno. I segnali vengono acquisiti da sensori wireless, posizionati in differenti punti del corpo. I dati vengono trasmessi, attraverso un nodo wireless, ad un microcontrollore, dove vengono analizzati e processati *on board* per trovare una possibile correlazione tra gli stessi e alcune aritmie cardiache, in particolare la fibrillazione atriale. I dati verranno poi inviati in un centro raccolta e inseriti in un database locale. Le attività previste nella ricerca includono: individuazione dei dispositivi che soddisfano i requisiti tecnici di integrabilità ed economicità; realizzazione piattaforma software del centro di raccolta dati; valutazione performance e costi del servizio.

Risultati attesi nel triennio

Output principale è rappresentato dalla integrazione di sensori e trasduttori commerciali in una WBAN e dalla realizzazione di uno o più prototipi. I protocolli clinici nei quali dispositivi realizzati verranno utilizzati forniranno dati importanti sulla efficacia dei monitoraggi proposti e sul rapporto costo beneficio per il paziente e per l'erogatore del servizio, in relazione alle patologie specifiche che verranno prese in considerazione. La sperimentazione clinica sarà anche occasione di collaborazione con le strutture sanitarie sia a livello accademico che sul territorio dalle quali ci si attende un proficuo interscambio culturale e scientifico.

Ulteriore ricaduta delle attività del progetto sarà rappresentata dal miglioramento delle capacità progettuali e realizzative del personale tecnico e di ricerca in un settore dell'*information technology* applicata al settore sanitario, di sempre maggiore impatto per il Sistema Sanitario Nazionale.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto ha caratteristiche che ne rendono i risultati trasferibili nel breve-medio periodo al Sistema Sanitario Nazionale. In particolare la più recente letteratura sottolinea l'importanza del tele monitoraggio domiciliare di parametri cardiovascolari, metabolici e respiratori, sia come elemento di prevenzione sia come base tecnologica per l'implementazione di programmi sostenibili di continuità assistenziale. I prodotti della ricerca sono brevettabili, e rappresentano inoltre una possibilità di sviluppo per aziende nazionali operanti nel settore della integrazione di dispositivi medici e *information technology*.

Utilizzo della tecnologia RFId per la sicurezza di pazienti e operatori sanitari

Una delle criticità emerse dagli studi sull'abbattimento del rischio clinico all'interno delle strutture sanitarie è la corretta gestione dei processi che coinvolgono direttamente il paziente, dal ricovero sino alla sua dimissione. Altrettanto importante è la gestione degli *asset*, con particolare riferimento al loro posizionamento all'interno della struttura e al loro stato di manutenzione/utilizzabilità, e la gestione del materiale biologico, pericoloso e non pericoloso.

Il progetto prevede la realizzazione e la implementazione all'interno di una struttura ospedaliera di un sistema sperimentale per il mantenimento della rintracciabilità di pazienti, operatori, strumentazione biomedica e campioni biologici, basato sull'utilizzo della tecnologia RFId e il supporto di moderni sistemi informativi. L'impatto del sistema sperimentale sulla sicurezza e la salute del paziente e dell'operatore sarà valutato mediante l'utilizzo di strumenti quali: questionari, interviste telefoniche, meeting *ad hoc*, audit.

Collaborazioni esterne:

- Istituto Mediterraneo per i Trapianti e Terapie ad Alta Specializzazione (ISMETT), Palermo
- Azienda Ospedaliera Universitaria Vittorio Emanuele, Catania

Risultati attesi nel triennio

Si prevede l'implementazione di un sistema per il mantenimento della rintracciabilità, costituito da:

- tag RFId integrati in un bracciale per il paziente, o in una etichetta adesiva da applicare su documentazione, campioni biologici, strumentazione biomedica, ecc.;
- dispositivi di lettura/scrittura dei tag integrati in:
 - terminali di tipo palmare;
 - tablet PC specifici per applicazioni cliniche;
 - lettori di prossimità installati all'interno di varchi per il passaggio;
- sistema informativo ospedaliero dotato di una infrastruttura di integrazione basata su protocolli standard (es. HL7).

Condurrà ad una sensibile riduzione del rischio clinico dovuto alla perdita di rintracciabilità:

- nelle attività della struttura sanitaria, con il conseguente rischio di scambio di identità di pazienti e operatori e la possibilità concreta di formulare diagnosi errate o di applicare terapie non adeguate;
- della posizione e dello stato di manutenzione delle apparecchiature, con il conseguente rischio, derivante dall'utilizzo inappropriato di dispositivi medici o apparati potenzialmente pericolosi;
- del materiale biologico da analizzare, (campioni di sangue, urine, ecc.), da somministrare al paziente, (sacche di sangue, soluzioni iniettabili, ecc.), o da smaltire seguendo specifiche procedure di sicurezza, con il conseguente rischio per pazienti, operatori e semplici frequentatori della struttura sanitaria, dovuto alla circolazione non controllata di materiale biologico potenzialmente pericoloso.

Trasferibilità dei risultati

La trasferibilità all'interno dell'SSN dei risultati previsti dal progetto, ai fini del miglioramento della qualità dei servizi erogati, della sicurezza dei pazienti e degli operatori, 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, e la fornitura del necessario supporto alle autorità competenti.

Valutazione biomeccanica del danno motorio

Si proseguirà la ricerca nel contesto delle alterazioni biomeccaniche dell'apparato locomotore in presenza di patologie ad alta incidenza (diabete, patologie ortopediche/neurodegenerative). La ricerca è stata finora incentrata sulla validazione di metodi e strumenti per l'analisi dell'appoggio plantare e del complesso caviglia-piede. Sono stati inoltre avviati studi mirati a standardizzare la valutazione dell'attività motoria con strumentazione baropodometrica indossabile e con tecniche innovative di analisi cinematica semi-quantitativa. Il progetto si svolgerà su due livelli:

- *technology assessment* di strumentazione per baropodometria diagnostica, che rivela spesso inadeguata accuratezza e affidabilità e necessita di una valutazione tecnica rigorosa delle caratteristiche di misura al fine di ridurre il rischio di errata diagnosi. Nel triennio si estenderà lo studio a prodotti commerciali con sensoristica innovativa, e se ne analizzerà il degrado a seguito di usura.
- Standardizzazione delle indagini biomeccaniche in clinica, con particolare riguardo al collaudo delle ortesi prescritte a pazienti diabetici a rischio ulcerativo (come richiesto da SSN). Nel triennio: si produrranno opportune linee guida; si indagheranno ulteriori specifiche alterazioni funzionali; si valideranno nuovi supporti terapeutici e preventivi.

Collaborazioni: Università Tor Vergata, Univ. Muenster, Univ. Glasgow, Nuffield Oxford Orthopaedic Centre.

Risultati attesi nel triennio

Redazione e disseminazione di linee guida per lo screening ad alta sensibilità e specificità per la classificazione del danno motorio e per la prevenzione delle ulcere plantari in presenza di neuropatia diabetica. Generalizzazione allo screening di altre patologie neuro-degenerative. Studi prospettici correlati. Redazione e disseminazione di linee guida per implementazione, monitoraggio e valutazione di efficacia di interventi ortesici prescritti a pazienti diabetici a rischio ulcerativo. Generalizzazione ad altre patologie che necessitano di trattamenti ortesici e/o protesici. Caratterizzazione biomeccanica di ulteriori specifici danni funzionali dell'apparato locomotore legati alla neuropatia diabetica ed in generale a patologie neuro-degenerative.

Diffusione di indicazioni (linee guida) per l'utilizzo di criteri e metodi di test standardizzati per il *technology assessment* di strumenti per baropodometria. Identificazione delle caratteristiche tecniche e delle prestazioni delle soluzioni commerciali innovative attualmente sul mercato. Realizzazione di analogo studio comparativo da svolgere su strumentazione per baropodometria indossabile. Conduzione di uno studio mirato alla caratterizzazione del degrado di dispositivi baropodometrici a seguito di usura e cattiva manutenzione. Costruzione e validazione di strumenti e metodi per periodici test "sul campo".

Trasferibilità dei risultati

Disseminazione di tecniche di screening per la valutazione di anomalie funzionali dell'appoggio e in generale del danno motorio a carico dell'arto inferiore. Disseminazione di tecniche di valutazione di efficacia di soluzioni ortesiche (collaudo strumentale di supporti preventivi prescrivibili in base al Nomenclatore Tariffario). Integrazione a regime delle metodiche proposte presso l'ambulatorio diabetologico del Policlinico Tor Vergata. Standardizzazione delle metodiche di valutazione del danno motorio presso i centri che collaborano allo studio.

Produzione di *report* comparativi sulle caratteristiche tecniche e sulle prestazioni delle soluzioni commerciali innovative per baropodometria, a completamento dei *report* comparativi prodotti nel triennio precedente. Produzione di *report* comparativi per dispositivi indossabili per baropodometria. Produzione e disseminazione di linee guida per *technology assessment* di dispositivi baropodometrici, e per la verifica periodica degli stessi.

**Dipartimento
Tecnologie e Salute**

Attività di controllo, valutazione, parere

Accertamento di idoneità delle strutture e delle attrezzature dei centri clinici di trapianto di organi.

L'accertamento del possesso dei requisiti strutturali e tecnologici dei centri di trapianto viene eseguito di norma secondo tre fasi successive: i) analisi della documentazione tecnica allegata all'istanza di autorizzazione, riguardante le strutture edili, gli impianti tecnologici e le principali apparecchiature di assistenza e di monitoraggio; ii) sopralluogo presso i centri clinici, con eventuale esecuzione di misure per accertamento di idoneità di alcuni impianti tecnologici, secondo la normativa tecnica esistente e criteri elaborati in base alla letteratura scientifica; iii) redazione di una relazione tecnica, con parere di idoneità, da inviare al Ministero della Salute. Questa attività viene svolta dal laboratorio di Ingegneria Biomedica dal 1986, in base all'art. 10 della L 02/12/1975 n. 644 e successivamente in base anche all'art. 3 del DPR 09/11/1994 n. 694. Secondo la legge 01/04/1999 n. 91, concernente disposizioni in materia di prelievo e trapianti di organi, detta attività dovrebbe passare sotto la responsabilità delle Regioni. In deroga a tale legge, è rimasta a carico del Laboratorio in base ad ordinanze del Ministro della Salute, e secondo quanto dettato dall'ultima del 08/08/2001, vi rimarrà fino alla data di emanazione di decreti ministeriali che definiscano i criteri e le modalità per l'individuazione delle strutture idonee ad effettuare i trapianti di organi e tessuti. È ragionevolmente ipotizzabile che, anche dopo l'emanazione di detti decreti, resti comunque affidato all'ISS, in collegamento con il CNT, un compito di supervisione sull'operato delle Regioni, e che quindi questa attività, seppure con modalità nuove, debba proseguire in futuro.

Piano triennale

Questa attività è stata svolta inizialmente dal Laboratorio di Ingegneria Biomedica, in base a quanto disposto dall'art. 10 della L 02/12/1975 n. 644 (Disciplina dei prelievi di parti di cadavere a scopo di trapianto terapeutico) e successive modificazioni. Con l'istituzione del Dipartimento Tecnologie e Salute e dopo l'approvazione della legge 01/04/1999 n. 91, che riordina la materia e istituisce il Centro Nazionale Trapianti, l'attività è proseguita sulla base di successive ordinanze del Ministero della Salute (ultima del 08/08/2001) che hanno prorogato la precedente disciplina di autorizzazione in attesa del decreto ministeriale di attuazione previsto all'art. 16 della stessa legge.

Recentemente, in seguito alla riforma del Titolo V della Costituzione, la materia è diventata anche di competenza regionale ed è stata oggetto di provvedimenti della Conferenza Stato Regioni. Si applicano in particolare gli accordi del 14/02/2002 e del 29/04/2004 tra Ministero della Salute e Regioni nei quali vengono esplicitamente riconosciute all'ISS competenze sia riguardo la definizione degli standard strutturali e logistici sia riguardo le attività di verifica.

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 di assistenza e di monitoraggio;
- sopralluogo presso i centri clinici, con eventuale esecuzione di 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 i risultati dei rilievi e delle misure eseguite e con parere finale di idoneità.

In questo quadro si prevede che le attività descritte continueranno a svolgersi anche in futuro, in collegamento con il CNT e con i centri regionali, con le modalità finora adottate.

Per quanto riguarda la definizione degli standard strutturali e logistici l'attività si realizza mediante partecipazione all'attività della Consulta permanente per i trapianti e del CNT, e a commissioni di lavoro tematiche.

Per quanto riguarda gli aspetti tecnici occorre notare che il processo di riorganizzazione delle strutture ospedaliere, i progressi tecnologici, l'evoluzione delle normative per impianti e attrezzature e le difficoltà nel vigilare sulla funzionalità delle strutture, impongono nuovi e più impegnativi requisiti per il corretto svolgimento degli accertamenti ispettivi. Allo scopo, oltre a un puntuale aggiornamento delle normative e della documentazione tecnica di riferimento, sarà necessario sviluppare lo studio di un nuovo modello per la verifica di conformità e di gestione tecnica delle strutture e della strumentazione ospedaliere utilizzate nel processo di trapianti.

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 dispositivi medici non attivi anche ai fini della certificazione e/o rinnovo del marchio CE.

Piano triennale

Le attività sopra descritte proseguiranno nel prossimo triennio 2009-2011.

Assicurazione della Qualità

La certificazione secondo le direttive europee per la libera circolazione dei dispositivi medici 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.

Piano triennale

La certificazione secondo le direttive europee per la libera circolazione dei dispositivi medici 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 di consulenza e controllo attinenti la problematica amianto

- Attività di consulenza tecnico-scientifica e di formazione su richiesta degli organi dell'SSN, nell'ambito della problematica dell'inquinamento ambientale da amianto e dai suoi sostituti fibrosi (Circolare del Ministero della Sanità n. 45 del 10/07/1986).
- Elaborazioni di pareri su tematiche concernenti i rischi sanitari connessi all'esposizione all'amianto.
- Effettuazione di esami mediante microscopia elettronica analitica per la determinazione qualitativa e quantitativa delle fibre di amianto in campioni di particolato aerodisperso e in campioni massivi.

- Coordinazione dei programmi di controllo di qualità dei laboratori che svolgono analisi sull'amianto mediante microscopia elettronica a scansione (Decreto del Ministero della Sanità del 14/05/1996).
- Servizi a terzi: Analisi di campioni provenienti da edifici pubblici e privati per la determinazione qualitativa e/o quantitativa del contenuto di amianto:
 - analisi qualitativa del contenuto di amianto in materiali massivi o in polveri sedimentarie mediante microscopia elettronica;
 - analisi quantitativa della concentrazione di fibre nel particolato aerodisperso raccolto su filtro a membrana mediante microscopia elettronica.

Piano triennale

Le attività sopra descritte proseguiranno nel prossimo triennio 2009-2011.

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 26/02/1997).

Piano triennale

L'attività sopra descritta proseguirà durante il prossimo triennio 2009-2011.

Certificazione di prodotto dei Dispositivi Medici

La certificazione dei Dispositivi Medici è una attività complessa che consiste nella verifica e attestazione della conformità dei prodotti ai requisiti essenziali indicati nell'allegato 1 delle Direttive Europee (42/93/CEE, 385/90/CEE) che ne regolano la libera circolazione. L'attività, in funzione della classificazione del dispositivo medico 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 Tecnologie e Salute 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 DM 24 giugno 2004 sulla base del quale i fabbricanti effettuano i pagamenti per la certificazione richiesta. Attualmente vengono emessi dal 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).

Piano triennale

La certificazione dei Dispositivi Medici è una attività complessa che consiste nella verifica e attestazione della conformità dei prodotti ai requisiti essenziali indicati nell'allegato 1 delle Direttive Europee (42/93/CEE, 385/90/CEE, 47/2007/CEE, 32/2003/CEE) che ne regolano la libera circolazione. L'attività, in funzione della classificazione del dispositivo medico 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 DM 16 giugno 2008 sulla base del quale i fabbricanti effettuano i pagamenti per la certificazione richiesta. Attualmente vengono emessi dal 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).

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 Consiglio Superiore di Sanità 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.

Attività presso il CRPPH (*Committee on Radiological Protection and Public Health*) della NEA (*Nuclear Energy Agency*) dell'OCSE. In tale comitato si discutono le implicazioni sulle normative e legislazioni nazionali delle raccomandazioni o norme emanate da commissioni o istituzioni internazionali. Si elaborano schemi sulla organizzazione delle procedure autorizzative per l'utilizzo di materiali e apparati che comportano rischio da radiazioni ionizzanti.

Piano triennale

Si prevede di continuare la predetta attività nel triennio 2009-2011 in relazione alle problematiche che emergeranno nel periodo. Si prevede in particolare di intensificare l'attività di consulenza in radioprotezione in relazione al *decommissioning* degli impianti nucleari, alle ipotesi sul deposito nazionale dei rifiuti radioattivi, sulle nuove iniziative per impianti nucleari di produzione di energia elettrica.

Controllo su Dispositivi Medici prelevati dai NAS

L'attività di controllo, effettuata su richiesta del Ministero della Salute e a seguito di prelievo di campioni da parte dei NAS, è essenzialmente rivolta alla verifica sperimentale della rispondenza alle norme, o in assenza di queste a dei requisiti essenziali di sicurezza, dei Dispositivi Medici che in qualche modo hanno provocato degli incidenti o si sospetta che non siano sicuri per la salute e quindi esistano dei rischi legati al loro uso. In tale settore, in prospettiva, si prevede un incremento delle attività sia per lo sviluppo di un gran numero di

dispositivi medici molto diversi tra loro sia per quanto messo in atto dall'autorità competente anche grazie alla Commissione Unica dei Dispositivi (ad es circolare ministeriale 27 luglio 2004 e Decreto Ministeriale 15 novembre 2005 "Approvazione dei modelli di schede di segnalazione di incidenti o mancati incidenti che coinvolgono dispositivi medici") in tema di vigilanza del mercato dei Dispositivi Medici a seguito dell'applicazione delle Direttive Comunitarie attualmente vigenti che demandano al Ministero della Salute il controllo del mercato; questi compiti richiedono le competenze tecnico-scientifiche dell'Istituto da parte del Ministero della Salute. Tale attività è svolta utilizzando le competenze e le strutture dei laboratori di prova del Dipartimento TES o di altri Dipartimenti dell'Istituto qualora necessario.

Piano triennale

L'attività di controllo, effettuata su richiesta del Ministero della Salute e a seguito di prelievo di campioni da parte dei NAS, è essenzialmente rivolta alla verifica sperimentale della rispondenza alle norme, o in assenza di queste a dei requisiti essenziali di sicurezza, dei Dispositivi Medici che in qualche modo hanno provocato degli incidenti o si sospetta che non siano sicuri per la salute e quindi esistano dei rischi legati al loro uso. In tale settore, in prospettiva, si prevede un incremento delle attività sia per lo sviluppo di un gran numero di dispositivi medici molto diversi tra loro sia per quanto messo in atto dall'autorità competente anche grazie alla Commissione Unica dei Dispositivi (ad es circolare ministeriale 27 luglio 2004 e Decreto Ministeriale 15 novembre 2005 "Approvazione dei modelli di schede di segnalazione di incidenti o mancati incidenti che coinvolgono dispositivi medici") in tema di vigilanza del mercato dei Dispositivi Medici a seguito dell'applicazione delle Direttive Comunitarie attualmente vigenti che demandano al Ministero della Salute il controllo del mercato; questi compiti richiedono le competenze tecnico-scientifiche dell'Istituto da parte del Ministero della Salute. Tale attività è svolta utilizzando le competenze e le strutture dei laboratori di prova del Dipartimento TES o di altri Dipartimenti dell'Istituto qualora necessario.

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 un'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.

Piano triennale

Nel corso del triennio 2009-2011 si prevede pertanto di affrontare le seguenti tematiche:

- gestione dei rifiuti radioattivi;
- smantellamento impianti nucleari;
- realizzazione di 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.vo230/95). 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 previsto per il 2009 l'esame del progetto di disattivazione della centrale nucleare di Trino Vercellese.

Linee guida per la Garanzia di Qualità in radioterapia e radiodiagnostica

La qualità del trattamento radioterapico è oggi un argomento di attenzione prioritario da parte degli operatori del settore anche in base al fatto che la garanzia di qualità in radioterapia è divenuta una procedura obbligatoria in base al DL.vo n.187 del 26/05/2000, attuazione 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 gruppi di studio interdisciplinari composti, oltre che da personale dell'ISS, da radioterapisti, fisici medici e tecnici di radiologia medica. Sono state elaborate fino ad ora tre linee guida, pubblicate come Rapporti tecnici ISTISAN. Ci proponiamo di proseguire con questa attività anche sulla base di una forte richiesta da parte dei Centri italiani di radioterapia e dei Servizi di fisica sanitaria. In particolare ci occuperemo dell'elaborazione di linee guida per tecniche radioterapiche speciali quali la irradiazione totale corporea, la radioterapia intraoperatoria, la brachiterapia endovascolare, la stereotassi e la radioterapia conformazionale. È inoltre partita in tempi più vicini una analoga attività per la radiodiagnostica.

Piano triennale

Nel Dipartimento di TES, la valutazione tecnologica in radiologia, anche attraverso l'elaborazione di specifiche linee guida, costituisce una delle tematiche portanti, in continuità con le tematiche di radioprotezione del paziente.

L'attività di Assicurazione di Qualità in Radioterapia è presente da molti anni all'interno dell'ISS con la costituzione di un Gruppo di Studio (GdS) che vede presente oltre al personale ISS, tutte le principali figure professionali coinvolte nel campo della Radioterapia. Questa attività è di interesse prioritario nel Dipartimento TES dove continua 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.

Ci si propone di proseguire questa attività. In particolare è in programma un rinnovo del GdS ISS per l'aggiornamento di alcuni documenti in relazione al grande sviluppo tecnologico avvenuto in questi anni nel settore e per l'elaborazione di linee guida sulle conseguenti nuove tematiche emergenti.

Nel 2005 è stato costituito, con le stesse modalità, un GdS multidisciplinare per l'Assicurazione di Qualità in Radiodiagnostica, con lo scopo di elaborare linee guida con le stesse modalità utilizzate per il settore della Radioterapia. Si intende proseguire anche in questo settore con l'elaborazione di linee guida volte ad affrontare le tematiche emergenti, in risposta a quanto richiesto dalle Associazioni scientifico-professionali del settore e dalla Federazione dei tecnici di radiologia medica.

Pianificazione di emergenze radiologiche

Le problematiche connesse con la pianificazione e gestione di situazioni di emergenza radiologica vengono affrontate da una Sezione del DL.vo 241/2000 che attua la Direttiva 96/29/Euratom in materia di radioprotezione, nella quale è previsto il coinvolgimento dell'ISS a vari livelli. In particolare esperti dell'ISS collaborano da diversi anni con il Dipartimento della Protezione Civile per l'elaborazione e l'aggiornamento del Piano Nazionale delle misure protettive contro le emergenze radiologiche e fanno parte del Centro di Elaborazione e Valutazione Dati (CEVaD), la struttura tecnica prevista nel DL.vo 230/95, a supporto del Dipartimento della Protezione Civile, al fine di assicurare un comune riferimento tecnico nella gestione delle emergenze radiologiche. L'ISS è inoltre coinvolto:

- nella pianificazione di emergenza a livello locale attraverso l'analisi dei presupposti tecnici dei piani di emergenza, nell'ambito della Commissione Tecnica per la Sicurezza Nucleare e la Protezione Sanitaria;
- nella definizione dei livelli di intervento sia di dose che derivati, per l'introduzione di provvedimenti restrittivi per la protezione della popolazione in caso di un'emergenza radiologica;
- nella predisposizione di schemi generali per l'informazione della popolazione.

Piano triennale

Nel corso del triennio 2009-2011 si prevede di completare l'aggiornamento del Piano Nazionale delle misure protettive contro le emergenze radiologiche, limitatamente ad eventi incidentali in centrali nucleari vicino al confine italiano. Andranno successivamente affrontate le problematiche connesse con la pianificazione di emergenza a livello nazionale in caso di eventi incidentali nel corso di trasporto di materia radioattiva.

Verrà completata anche l'elaborazione della rev. 6 del Manuale operativo del CEVaD – Parte I – Valutazioni dosimetriche, livelli di intervento e misure ambientali nel corso delle emergenze nucleari e radiologiche.

Proseguiranno inoltre le attività attualmente in corso:

- esame sia dei piani di emergenza locali intorno agli impianti nucleari che piani di emergenza nucleare nei porti ove è previsto l'attracco di navi militari a propulsione nucleare;
- analisi delle problematiche connesse con l'informazione della popolazione in caso di emergenze radiologiche;
- partecipazione alle esercitazioni nazionali e internazionali di emergenza.

Si prevede in particolare di proseguire l'esame delle "Linee guida per la pianificazione di emergenza per il trasporto di materia radioattive", che saranno la base per la successiva pianificazione degli interventi sia a livello locale che nazionale.

Protezione della popolazione dalla radioattività ambientale naturale e artificiale

Le attività di controllo e valutazione qui sintetizzate sono finalizzate alla prevenzione dei rischi sanitari connessi all'esposizione della popolazione alla radioattività, sia di origine naturale che artificiale. Tali attività sono strettamente collegate con quelle di ricerca, in quanto fanno uso delle competenze maturate con essa, e si svolgono su tematiche in continua evoluzione.

Queste attività consistono in:

- attività di consulenza per il Ministero della Salute, Ministero dell'Ambiente e altri Ministeri, per il Consiglio Superiore di Sanità, per altre amministrazioni dello Stato, per autorità sanitarie regionali e locali. Tale attività si realizza tramite preparazione di pareri e coordinamento o partecipazione a gruppi di studio *ad hoc*;
- partecipazione a commissioni nazionali e regionali e ai relativi gruppi di lavoro;
- partecipazione a commissioni internazionali (Commissione Europea, OMS, IAEA, ecc.) e ai relativi gruppi di lavoro;
- partecipazione alla preparazione di documenti di organizzazioni internazionali quali WHO, IAEA, UNSCEAR, ecc.;
- preparazione e discussione (in sedi nazionali informali e formali) di bozze di norme UNI e normative sanitarie di particolare rilievo tecnico-scientifico;
- attività di formazione del personale dell'SSN, di enti e altre strutture pubbliche con responsabilità nei settori di interesse, mediante lezioni, seminari e corsi o workshop sia esterni che appositamente organizzati presso l'ISS, e attività di informazione della popolazione.

Piano triennale

Tra le principali attività e tematiche già previste per il prossimo triennio vi sono:

- Partecipazione con nomina personale al gruppo di esperti di radioprotezione ex art. 31 del Trattato EURATOM, con ruolo di consulenza nei confronti della Commissione Europea, e ai suoi gruppi di studio, in particolare per l'elaborazione delle nuove norme di base di radioprotezione europee.
- Partecipazione allo *Steering Committee* – in qualità di *contact point* italiano – alla *European ALARA Network*.
- Partecipazione a meeting della IAEA (Agenzia Internazionale per l'Energia Atomica) in merito alla elaborazione delle nuove *Basic Safety Standard*.
- Partecipazione al progetto della IAEA EMRAS II, nel gruppo di lavoro sulla modellistica della diffusione dei NORM nell'ambiente.
- Coordinamento del Piano Nazionale Radon, del relativo Gruppo di Coordinamento Nazionale Radon e di alcuni suoi gruppi di lavoro, e partecipazione ad altri GdL.
- Partecipazione a Commissione della Regione Lazio sul radon.
- Consulenza all'IAEA per la *review* di un documento sulle tecniche di misura del radon.
- Consulenza a diverse Regioni italiane (per ora Lombardia, Sicilia, Abruzzo, Toscana) su attività di prevenzione dai rischi connessi all'esposizione al radon.
- Consulenza per il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare in merito a siti di interesse nazionale contaminati da fosfogessi, loro messa in sicurezza e smantellamento degli impianti.
- Emanazione di pareri e consulenza al Ministero della Salute sull'uranio impoverito come possibile sorgente di esposizione per il personale militare e civile impegnato in teatri post-bellici.
- Partecipazione ai lavori del Sottocomitato 4 (Radioecologia e Radioisotopi) della Commissione Tecnica UNI Energia Nucleare e ai seguenti gruppi di lavoro: i) GdL 28 Metodi radiometrici di misura su acque destinate al consumo umano; ii) GdL 11 su tecniche di misura del radon e dei suoi prodotti di decadimento iii) GdL sulla Gestione radiologica di siti, residui, sottoprodotti ed effluenti contenenti NORM e TENORM.

Sicuramente altre attività di controllo e consulenza su queste e altre tematiche si svilupperanno nel triennio, in base alle necessità man mano emergenti riguardo alla prevenzione dei rischi sanitari connessi all'esposizione della popolazione alla radioattività.

Prove di laboratorio e valutazione tecnica di dispositivi medici 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 03/11/1984 per l'autorizzazione all'immissione in commercio di tali prodotti. Attualmente il laboratorio di prova opera a supporto delle seguenti attività:

- certificazione del tipo per i dispositivi medici secondo lo schema della direttiva 90/385/CEE sui dispositivi medici impiantabili attivi in conformità allegato III della direttiva stessa. 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 dispositivo, 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 (ossia processi che non possono essere completamente valutati

da un controllo di qualità), 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 ecc. tendenti a valutare l'affidabilità, la sicurezza e il corretto funzionamento del dispositivo.

- Valutazione del rischio associato con l'uso dei dispositivi medici ai fini dell'emissione di pareri per gli organi dell'SSN.
- Controllo ai fini della sorveglianza del mercato e vigilanza sui dispositivi 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 *pacemaker* e programmatori 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 dispositivi medici impiantabili attivi. 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 (Comitato tecnico italiano), che internazionale: CENELEC (*Comité Européen de Normalisation Electrotechnique*).

Piano triennale

Nel corso dei prossimi anni continuerà l'attività di certificazione dei dispositivi medici impiantabili attivi che al solito prevede sia prove tecniche di laboratorio sui prodotti, che ispezioni al sistema di qualità messo in atto dalla ditte costruttrici. Nell'ambito di questa attività saranno sviluppati nuovi protocolli di prova; in particolare per quanto riguarda i neurostimolatori (dispositivi medici impiantabili attivi che verranno certificati per la prima volta nel corso del 2009 dall'organismo notificato 0373 TESA) è prevista la progettazione e realizzazione di nuove apparecchiature *ad hoc*, presso i nostri laboratori, che consentiranno di automatizzare e rende quindi facilmente ripetibili prove previste dallo standard internazionale ISO 14708-3 di recente introduzione. Inoltre verrà incrementata la valutazione dei rischi connessi con l'utilizzo dei Dispositivi Medici. Tale valutazione riguarderà: l'esame di protocolli di sperimentazione clinica di Dispositivi medici innovativi, l'esame di *report* di incidenti o quasi incidenti sui dispositivi medici; l'esame di pratiche riguardanti problematiche sui dispositivi medici 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 dispositivi medici e quella di supporto agli enti normatori sia nazionali che internazionali (CEI, CENELEC).

Prove di laboratorio e valutazione tecniche di dispositivi medici cardiovascolari quali protesi valvolari cardiache e *stent*

Il laboratorio di prova per le valvole cardiache protesiche e gli *stent* endovascolari opera a supporto delle seguenti attività: i) certificazione del tipo per i dispositivi medici secondo lo schema della direttiva 93/42 CEE (allegato III) ii) valutazione del rischio associato con l'uso di dispositivi medici ai fini dell'emissione di pareri per gli organi dell'SSN iii) controllo ai fini della sorveglianza del mercato sui prodotti sequestrati dai NAS. Si tratta di una attività complessa che prevede l'esecuzione di molteplici controlli (documentali e sperimentali) per giungere alla verifica che i dispositivi medici siano fabbricati in conformità alle norme europee

(EN) o internazionali (ISO, FDA). Tale attività consiste quindi nel definire e stabilire i parametri necessari a valutare *in vitro* tali dispositivi e a mettere a punto i protocolli di prova necessari a conseguire tale valutazione anche nel caso in cui questi non siano definiti o armonizzati. Le prove in oggetto si rappresentano onerose per quantità, accuratezza necessaria e spesso anche per i tempi, come nel caso delle prove di fatica a battito accelerato (durate anche di un anno). In questa attività sono state trasferite le competenze acquisite durante lo svolgimento delle attività di ricerca (protocolli di valutazione, procedure di prova, sistemi di misura specificamente realizzati). Sono state eseguite valutazioni che hanno portato all'emissione di certificazioni per i prodotti correlati. In particolare l'attività è stata particolarmente incentrata per lo sviluppo di una metodica anemometrica allo stato dell'arte (*Particle Image Velocimetry*) grazie ad un progetto del quinto programma quadro della Comunità Europea.

Piano triennale

Il laboratorio di prova per le valvole cardiache protesiche e gli stent endovascolari opera a supporto delle seguenti attività:

- certificazione del tipo per i dispositivi medici secondo lo schema della direttiva 93/42 CEE (allegato III) e 2007/47/CEE
- valutazione del rischio associato con l'uso di dispositivi medici ai fini dell'emissione di pareri per gli organi dell'SSN
- controllo ai fini della sorveglianza del mercato sui prodotti sequestrati dai NAS. Si tratta di un'attività complessa che prevede l'esecuzione di molteplici controlli (documentali e sperimentali) per giungere alla verifica che i dispositivi medici siano fabbricati in conformità alle norme europee (EN) o internazionali (ISO, FDA). Tale attività consiste quindi nel definire e stabilire i parametri necessari a valutare *in vitro* tali dispositivi e a mettere a punto i protocolli di prova necessari a conseguire tale valutazione anche nel caso in cui questi non siano definiti o armonizzati. Le prove in oggetto si rappresentano onerose per quantità, accuratezza necessaria e spesso anche per i tempi, come nel caso delle prove di fatica a battito accelerato (durate anche di un anno). In questa attività sono state trasferite le competenze acquisite durante lo svolgimento delle attività di ricerca (protocolli di valutazione, procedure di prova, sistemi di misura specificamente realizzati). Sono state eseguite valutazioni che hanno portato all'emissione di certificazioni per i prodotti correlati. In particolare l'attività è stata particolarmente incentrata per lo sviluppo di una metodica anemometrica allo stato dell'arte (*Particle Image Velocimetry*) grazie ad un progetto del quinto programma quadro della Comunità Europea.

Prove di laboratorio e valutazione tecniche di dispositivi medici cardiovascolari quali vasi protesici, dispositivi per annuloplastica, condotti valvolati

Il laboratorio di prova per i vasi protesici, condotti valvolati e dispositivi per annuloplastica opera a supporto delle seguenti attività: i) certificazione CE di tipo (allegato III) secondo la direttiva 93/42 CEE relativa ai dispositivi medici ii) valutazione del rischio associato con l'uso di tali dispositivi medici ai fini dell'emissione di pareri per gli organi dell'SSN iii) controllo ai fini della vigilanza del mercato sui prodotti sequestrati dai NAS.

Si tratta di un'attività complessa che prevede l'esecuzione di molteplici controlli (documentali e sperimentali) per giungere alla verifica della rispondenza ai requisiti essenziali (allegato I della direttiva 93/42) di tali dispositivi. Vanno quindi stabiliti e implementati protocolli sperimentali di prova necessari a conseguire una valutazione anche in mancanza di norme armonizzate europee (EN) o norme internazionali (ISO, FDA). Le prove sperimentali sono onerose per quantità, accuratezza necessaria e spesso anche per tempi, come nel caso di

prove a fatica a battito accelerato (durata un anno). In questa attività sono trasferite le competenze acquisite nell'attività di ricerca (protocolli di valutazione, sistemi di misura realizzati specificamente).

Piano triennale

Il laboratorio di prova per i vasi protesici, condotti valvolati e dispositivi per annulooplastica opera a supporto delle seguenti attività: i) certificazione CE di tipo (allegato III) secondo la direttiva 93/42 CEE e 2007/47/CEE relative ai dispositivi medici ii) valutazione del rischio associato con l'uso di tali dispositivi medici ai fini dell'emissione di pareri per gli organi dell'SSN iii) controllo ai fini della vigilanza del mercato sui prodotti sequestrati dai NAS.

Si tratta di un'attività complessa che prevede l'esecuzione di molteplici controlli (documentali e sperimentali) per giungere alla verifica della rispondenza ai requisiti essenziali (allegato I della direttiva 93/42) di tali dispositivi. Vanno quindi stabiliti e implementati protocolli sperimentali di prova necessari a conseguire una valutazione anche in mancanza di norme armonizzate europee (EN) o norme internazionali (ISO, FDA). Le prove sperimentali sono onerose per quantità, accuratezza necessaria e spesso anche per tempi, come nel caso di prove a fatica a battito accelerato (durata un anno). In questa attività sono trasferite le competenze acquisite nell'attività di ricerca (protocolli di valutazione, sistemi di misura realizzati specificamente).

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

Piano triennale

Si prevede che tale attività, iniziata in corrispondenza al VI Programma Quadro Euratom, continuerà per tutto il VII Programma Quadro, coprendo il triennio 2009-2011. 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 24/02/1999 che lo ha istituito. In particolare dovrà fornire le valutazioni sulle sperimentazioni cliniche dei medicinali previste dai Decreti ministeriali 18/03/1998 e 19/03/1998, 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.

Piano triennale

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 24/02/1999 che lo ha istituito. In particolare dovrà fornire le valutazioni sulle sperimentazioni cliniche dei medicinali previste dai Decreti ministeriali 18/03/1998 e 19/03/1998, 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 Dispositivi Medici

L'ex Laboratorio di Ingegneria Biomedica 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 Dispositivi Medici. Tale attività è svolta sulla base dei risultati delle attività di ricerca dell'ex Laboratorio di Ingegneria Biomedica, delle bibliografie internazionali, dei dati presenti in archivi specifici (ad esempio FDA, MDD ecc.) e delle norme europee e internazionali. In tale ambito, ad esempio, si esprimono pareri relativamente alla sicurezza ed efficacia dei Dispositivi Medici, 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 e, in generale, i rischi per la salute dei cittadini, connessi con l'uso delle tecnologie biomediche.

Attualmente vengono emanati dal Dipartimento pareri e vengono eseguiti studi al fine di definire appropriate metodologie di analisi del rischio a partire dalla normativa armonizzata europea attualmente vigente (ISO EN 14971).

Considerando il forte impulso avuto dalle tecnologie nel mercato della salute, come risulta da dati del Ministero della Salute (CUD) e delle associazioni dei produttori, (i dispositivi medici 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.

Piano triennale

Il Dipartimento di 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 Dispositivi Medici. 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 (ad esempio FDA, MDD ecc.) e delle norme europee e internazionali. In tale ambito, ad esempio, si esprimono pareri relativamente alla sicurezza ed efficacia dei Dispositivi Medici, 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 e, in generale, i rischi per la salute dei cittadini, connessi con l'uso delle tecnologie biomediche.

Attualmente vengono emanati dal Dipartimento pareri e vengono eseguiti studi al fine di definire appropriate metodologie di analisi del rischio a partire dalla normativa armonizzata europea attualmente vigente (ISO EN 14971).

Considerando il forte impulso avuto dalle tecnologie nel mercato della salute, come risulta da dati del Ministero della Salute (CUD) e delle associazioni dei produttori, (i dispositivi medici appartengono a circa 30.000 famiglie diverse) emerge chiaramente la necessità di supportare con esperti la valutazione dei rischi connessi con il loro utilizzo.

A fronte di questa necessità il Dipartimento di TES mantiene aggiornato questo vasto ambito di competenza acquisendo e mantenendo la strumentazione allo stato dell'arte.

Valutazione dei rischi sanitari delle radiazioni non ionizzanti

Le attività che il Reparto Radiazioni non ionizzanti svolge nel campo della prevenzione e della protezione dalle radiazioni non ionizzanti sono molteplici. Lavori sperimentali e teorici vengono condotti per valutare il rischio e gli effetti connessi con l'esposizione ai campi elettrici e magnetici a bassa frequenza (frequenze industriali), ai campi elettromagnetici ad alta frequenza, alla radiazione ottica coerente e non coerente, in particolare, la radiazione ultravioletta. Detta attività e la notevole esperienza che da essa ne è derivata hanno determinato, fra l'altro, un attivo coinvolgimento dei ricercatori del Reparto in varie iniziative promosse da prestigiose organizzazioni internazionali: il progetto internazionale "Campi Elettromagnetici" della WHO, le attività di protezione e l'elaborazione di linee guida della Commissione Internazionale per la Protezione dalle Radiazioni Non Ionizzanti (ICNIRP), l'Azione COST (Cooperazione Scientifica e Tecnica) 281 dell'Unione Europea e il Progetto Europeo Euroskin. Attività analoghe vengono svolte anche in ambito nazionale. Considerate nel loro insieme tutte queste attività sono finalizzate prevalentemente alla valutazione del rischio sanitario derivante dalle differenti modalità e tipologie di esposizione alle emissioni delle varie sorgenti di radiazioni non ionizzanti e alla elaborazione di una filosofia di prevenzione e protezione. I prodotti di questo lavoro sono un utile riferimento per le autorità sanitarie dei vari Paesi nell'elaborare norme di protezione il più possibile coerenti e omogenee. L'attività svolta in campo internazionale e la ricerca condotta in laboratorio sono gli elementi di riferimento che 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.

Piano triennale

Le attività che il Reparto Radiazioni non ionizzanti svolge nel campo della prevenzione e della protezione dalle radiazioni non ionizzanti sono molteplici. Lavori sperimentali e teorici vengono condotti per valutare il rischio e gli effetti connessi con l'esposizione ai campi elettrici e magnetici a bassa frequenza (frequenze industriali), ai campi elettromagnetici ad alta frequenza, alla radiazione ottica coerente e non coerente, in particolare, la radiazione ultravioletta. Detta attività e la notevole esperienza che da essa ne è derivata hanno determinato, anche, un attivo coinvolgimento dei ricercatori del Reparto in varie iniziative promosse da prestigiose organizzazioni internazionali: il progetto internazionale "Campi

Elettromagnetici” della WHO, le attività di protezione e l’elaborazione di linee guida della Commissione Internazionale per la Protezione dalle Radiazioni Non Ionizzanti (ICNIRP) e il Progetto Europeo Euroskin. Attività analoghe vengono svolte anche in ambito nazionale. Considerate nel loro insieme tutte queste attività sono finalizzate prevalentemente alla valutazione del rischio sanitario derivante dalle differenti modalità e tipologie di esposizione alle emissioni delle varie sorgenti di radiazioni non ionizzanti e alla elaborazione di una filosofia di prevenzione e protezione. I prodotti di questo lavoro sono un utile riferimento per le autorità sanitarie dei vari Paesi nell’elaborare norme di protezione il più possibile coerenti e omogenee. L’attività svolta in campo internazionale e la ricerca condotta in laboratorio sono gli elementi di riferimento che 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.

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 dispositivi medici 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.

Piano triennale

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 biologiche/cliniche, legate alle modalità di impianto delle protesi, di interesse come potenziali fattori di rischio di fallimento di impianto; gli approfondimenti avverranno grazie alla collaborazione di personale esperto dell’ISS e di chirurghi ortopedici qualificati.

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 progressione dell'infezione da HIV-1 nei Paesi in via di Sviluppo

L'infezione da HIV-1 nei Paesi in via di sviluppo ha raggiunto elevati livelli di prevalenza, soprattutto nell'Africa Subsahariana. In queste regioni la diffusione dell'infezione è favorita dalla mancanza di strategie preventive, dalla scarsa disponibilità di terapie antivirali, dallo stato di malnutrizione e dalla presenza di infezioni concomitanti da virus, batteri e parassiti patogeni. Tale situazione socio-ambientale può pregiudicare il successo di approcci terapeutici e di strategie di controllo dell'epidemia. Il presente progetto si propone lo studio dei meccanismi patogenici dell'infezione da HIV-1 in aree del Sudafrica e dello Swaziland in relazione ai fattori ambientali. Studi epidemiologici saranno effettuati per valutare la prevalenza e l'incidenza di infezione e la distribuzione di sottotipi virali nella popolazione infettata. La progressione dell'infezione sarà valutata clinicamente e per mezzo di metodiche virologiche (plasmaviremia, antigenemia virale) e immunologiche (caratterizzazione anticorpale, test di sieroneutralizzazione virale, analisi della risposta cellulo-mediata e delle sottopopolazioni linfocitarie). 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 ambientali e di natura infettivologica nella diffusione e progressione dell'infezione da HIV-1.

Risultati attesi nel triennio

L'obiettivo principale del progetto è lo studio dei meccanismi patogenici dell'infezione da HIV-1 in Paesi in via di sviluppo quali il Sudafrica e lo Swaziland, che presentano un'alta prevalenza di infezione. Nell'ambito del progetto verrà valutata con particolare attenzione la presenza di sottotipi virali in questi Paesi che avranno con molta probabilità una distribuzione peculiare in relazione alla regione studiata, con prevalenza del sottotipo C. Inoltre sarà di estrema utilità valutare il peso specifico dei fattori ambientali quali la malnutrizione e la prevalenza di infezioni da microrganismi patogeni nel determinare una ridotta risposta antivirale e un'augmentata progressione della malattia. Poiché la gran parte degli studi sulla patogenesi dell'infezione da HIV-1 viene effettuata su casistiche di individui viventi in Paesi occidentali e infettati da sottotipi differenti rispetto ai Paesi dell'Africa Subsahariana, le informazioni sulle modalità di progressione dell'infezione in Sudafrica e Swaziland forniranno un quadro reale dell'epidemia virale in queste regioni, a cui fare riferimento nei programmi di controllo e nelle sperimentazioni a scopo preventivo e terapeutico.

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 dimensioni e dell'andamento dell'infezione virale a livello regionale. Infatti, la peculiarità della distribuzione degli isolati virali in queste aree geografiche e la presenza di fattori debilitanti 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 quella osservabile nei Paesi occidentali. Le informazioni derivate da questo studio consentiranno una maggiore conoscenza sulle modalità di progressione dell'epidemia di HIV-1 nei questi Paesi allo scopo di individuare e intervenire sulle problematiche locali associate alla elevata incidenza ad aumentata patogenicità dell'infezione virale.

Analisi dei fattori virologici, genetici e immunologici associati all'infezione da HIV in cittadini italiani e stranieri residenti in Italia

Dati ufficiali (ISTAT) indicano che i cittadini stranieri regolari in Italia all'inizio del 2008 erano circa il 6% 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'Africa, dal Sud America e dall'Europa dell'Est, regioni caratterizzate dalla presenza di sottotipi diversi di HIV-1 e da un'alta prevalenza di infezioni sostenute da differenti microrganismi patogeni (virus, batteri, parassiti). La progressione dell'infezione da HIV dipende dalle caratteristiche del virus infettante, dallo stato di attivazione cronica del sistema immune dovuta alle infezioni concomitanti ed è influenzata da fattori genetici dell'ospite che sono coinvolti nella risposta immune, l'espressione dei quali dipende dalla razza.

L'insieme di questi fattori può influenzare le caratteristiche dell'epidemia da HIV/AIDS in Italia. L'obiettivo del progetto è quindi l'analisi dei fattori virologici, genetici e immunologici che si associano all'infezione da HIV/AIDS, in coorti di pazienti HIV-positivi sia stranieri residenti sul territorio nazionale e rappresentativi della popolazione migrante in Italia, sia italiani, a diversi stadi della malattia.

Risultati attesi nel triennio

Al fine di delineare con maggior accuratezza la storia naturale dell'infezione da HIV/AIDS in Italia, da questo studio trasversale di coorte si otterranno le informazioni riguardanti:

- le caratteristiche molecolari e biologiche dei ceppi di virus HIV-1 circolanti sul territorio italiano e l'impatto della variabilità virale sulla progressione della malattia;
- l'assetto genetico dell'ospite in riferimento ai geni HLA (*Human Leukocyte Antigen*) di classe I e II e il loro ruolo nello sviluppo della risposta immune contro l'HIV;
- la risposta immune HIV-specifica di tipo cellulare e umorale e l'effetto di possibili infezioni concomitanti sullo sviluppo della stessa.

Trasferibilità dei risultati

Il decorso individuale dell'infezione da HIV/AIDS dipende dalle caratteristiche del virus infettante e da fattori genetici e immunitari dell'ospite. Essendo la conoscenza della patogenesi dell'infezione da HIV/AIDS, il requisito primario per la pianificazione e lo sviluppo di strategie terapeutiche e preventive atte a contenere la diffusione dell'infezione, 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 e aiuteranno quindi a rispondere in modo più adeguato ai bisogni della popolazione infetta sul territorio nazionale attraverso la pianificazione di interventi mirati di prevenzione e controllo.

Analisi del genoma, trascrittoma, proteoma e correlati di protezione dall'infezione da HIV

È di enorme importanza determinare i fattori alla base della capacità di controllare l'infezione da HIV. In questo contesto, è essenziale il confronto tra coorti di soggetti che non controllano l'infezione (progressori) e che la controllano efficacemente, quali i non progressori (*Long-Term Non-Progressor*, LTNP) e i soggetti ripetutamente esposti al virus ma non infettati (*Multiple Exposed Uninfected*, MEU). Di grande rilevanza è anche lo studio di individui infettati e non infettati, vaccinati e non vaccinati contro HIV, poiché questi studi possono permettere di individuare fattori di protezione dall'infezione sfruttabili per lo sviluppo di un vaccino efficace. Primati non umani vaccinati o *naïve*, infettati o non con SHIV, rappresentano

un altro modello sperimentale utile, almeno in parte, per l'identificazione dei fattori di protezione e per la valutazione degli immunogeni e delle strategie di vaccinazione preventiva e terapeutica. I fattori di protezione, tuttavia, appaiono complessi, molteplici e, soprattutto, non necessariamente coincidenti e/o relati ai parametri immuno-virologici normalmente monitorati. È perciò di grande interesse in questo campo applicare a queste coorti/modelli i moderni approcci di analisi del genoma, del trascrittoma e del proteoma basati su *microarray* e sulle tecnologie di analisi multidimensionale delle proteine. Questo progetto intende, in collaborazione con l'Università di Ferrara, esaminare il genoma, il trascrittoma e il proteoma in gruppi di soggetti selezionati dalle coorti di individui e nei modelli animali sopra descritti.

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. Rispetto all'analisi del trascrittoma, l'analisi del genoma è meno dipendente dal *matching*, poiché identifica specificità genetiche già fissate, e rappresenta quindi l'approccio di elezione in queste coorti (benché richieda l'uniformità o la eguale rappresentatività dei ceppi razziali e/o geografici). Un secondo obiettivo è il censimento di campioni di cellule del sangue periferico, eventualmente disponibili, da soggetti vaccinati o trattati con placebo, sia infettati sia non infettati da HIV, per l'analisi di trascrittoma e del proteoma (quale studio *nested* e previa estensione del consenso informato). Sulla base dei dati ottenuti lo studio potrà essere esteso alle fasi successive della sperimentazione clinica vaccinale. Infine, i primati non umani vaccinati o *naïve* infettati e non infettati potranno essere esaminati sia a livello del sangue periferico che tissutale prima e dopo vaccinazione e/o challenge, fornendo importanti informazioni circa il *footprint* di protezione.

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, inoltre, 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 obiettivo 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 (CKS), nei trapiantati d'organo (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 e inoltre, grazie ai piani di cooperazione, ad elevare gli standard di vita nei Paesi in via di sviluppo.

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 viene rilasciata dalle cellule T acutamente infettate e, una volta all'esterno della cellula, lega gli eparan-solfati delle membrane cellulari e della matrice extracellulare. Nostri dati recenti indicano che Tat extracellulare potrebbe favorire l'interazione tra Env, CD4 ed il co-recettore per HIV, e l'entrata del virus nelle cellule *target*. Questa conclusione è basata sulle seguenti osservazioni. 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; questi epitopi sono presenti nella regione del co-recettore che lega il V3 *loop* di Env; come i co-recettori, anche Tat forma un complesso stabile con il V3 *loop* di Env; Tat è in grado di

modificare il *pathway* di entrata di Env in cellule dendritiche ed endoteliali (Tat rende l'internalizzazione di Env dipendente dalle stesse integrine che mediano l'internalizzazione di Tat). Nel loro insieme, questi dati indicano che Tat è in grado di "mimare" i co-recettori per HIV (CCR5, CXCR4) e, grazie a questa capacità, di legare Env e favorire 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, infatti, 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. Per questa via, Tat renderebbe possibili eventi cineticamente proibitivi quando il co-recettore è espresso a livelli limitanti. È quindi 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 ad 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 Sub-Sahariana a differenti stadi della malattia: possibili implicazioni per la patogenesi dell'infezione da HIV

L'Africa Sub-Sahariana continua a sostenere il peso maggiore dell'epidemia globale da HIV/AIDS, con i suoi 22,5 milioni di individui infettati su un totale di 33,2 milioni al mondo nel 2007. In questi Paesi, l'HIV si trasmette prevalentemente per via sessuale e, pertanto, gli individui più colpiti rappresentano la classe di età sessualmente attiva (15-50 anni di età). La prevalenza di infezione in questa classe di età risulta, in alcuni casi, estremamente elevata, fino ad arrivare, in Sudafrica, Botswana e Swaziland, a punte che superano il 35%. È, pertanto, essenziale intervenire con strategie idonee a contenere la trasmissione del virus nella popolazione.

La variabilità genetica dell'HIV-1 è molto elevata, in particolare in Africa dove sono presenti tutti i sottotipi conosciuti e numerose varianti altamente divergenti l'una dall'altra. Lo studio continuo dei sottotipi circolanti è fondamentale per comprendere gli eventuali effetti dei flussi migratori tra Paesi confinanti, per monitorare la variabilità genetica virale e organizzare e applicare interventi preventivi (incluso lo sviluppo di un vaccino) e terapeutici.

La variabilità dell'HIV-1 può generare virus che hanno differenti capacità di trasmissione, di replicazione e di resistenza alla risposta immunitaria. Questa resistenza è stata associata alle rapide variazioni della proteina Env-gp120 dovute alla pressione selettiva della risposta immune. In particolare, è stato recentemente descritto che varianti di HIV-1 che presentano delezioni nelle regioni variabili della proteina Env sono in grado di essere trasmesse per via eterosessuale in modo più efficiente. Al contrario, varianti con regioni variabili più lunghe si sono mostrate più resistenti alla neutralizzazione.

I dati di letteratura disponibili al momento, sono comunque preliminari e c'è bisogno di casistiche più ampie e basate anche su sottotipi diversi di HIV-1 per confermare queste ipotesi.

Pertanto gli obiettivi dello studio sono i seguenti:

- Valutare la distribuzione dei sottotipi di HIV-1 in Sudafrica e Swaziland, due Paesi ad alta endemia per HIV, utilizzando alberi filogenetici.
- Studiare la variabilità genetica ed antigenica della proteina Env dei virus HIV circolanti, ottenuti da pazienti sudafricani e dello Swaziland, tramite amplificazione e sequenziamento della proteina.
- Identificare specifiche varianti di HIV-1 con grosse delezioni o inserzioni nelle regioni variabili della proteina Env in individui sudafricani e dello Swaziland a differenti stadi di infezione.
- Generare pseudovirus contenenti regioni dell'Env con o senza delezioni e valutarne l'infettività e la resistenza alla neutralizzazione da parte di un pannello di anticorpi neutralizzanti.

Risultati attesi nel triennio

Nonostante in letteratura ci siano pochi studi sui *clade* "nonB", studi recenti in Africa Sub-Sahariana 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 dello Swaziland 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 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 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 ed ad un disegno razionale di vaccini contro l'HIV/AIDS in Africa.

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 è in collaborazione con il *Karolinska Institute* di Socolma, so 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.

Coreceptor switch e caratterizzazione molecolare nell'infezione con virus chimerici SIV/HIV di primati non umani

Recentemente in base a protocolli vaccinali effettuati nel nostro laboratorio, abbiamo condotto uno studio sulla potenziale variabilità dei geni *tat* e *env* durante la fase acuta e cronica dell'infezione di macachi inoculati per via endovenosa con il virus SHIV89.6Pcy243. I risultati di questo studio indicavano che negli animali vaccinati non protetti, la vaccinazione con la proteina Tat induceva una ampia risposta antivirale come dimostrato dalla ridotta abilità di sviluppare *escape mutant*, che è ben noto coadiuvare il controllo della replicazione virale (Ridolfi, *et al.* 2008). Nell'ambito di nuovi protocolli vaccinali basati sulla proteina TAT ed ENV, è in corso uno studio sulla potenziale variabilità dei geni *tat* ed *env* durante la fase acuta e cronica dell'infezione di macachi inoculati per via mucosale con il virus SHIV-SF162CY. Tale virus derivante dall'espansione in *Macaca fascicularis* del virus chimerico SHIV-SF162P4 si è dimostrato patogenico in *Macaca fascicularis*. Il genoma dello SHIV-SF162CY è stato interamente sequenziato e confrontato al virus parentale SHIV-SF162P4 isolato da scimmie *rhesus*. Il sequenziamento dei gene *tat* ed *env*, ha rivelato mutazioni in regioni proteiche che potrebbero avere un importante ruolo patogenetico nella replicazione del virus. Parallelamente, nostri dati sperimentali indicano che l'infezione mucosale di macachi con il virus SHIV-1157i, contenente l'*envelope* di HIV *clade C*, induce alti picchi di viremia e alti *set point* virali senza deplezione dei linfociti CD4 circolanti.

Risultati attesi nel triennio

Caratterizzazione molecolare delle varianti virali del virus SHIV-SF162 CY.

Clonaggio ed espressione dei mutanti del virus SHIV-SF162 CY.

Identificazione dei determinanti genetici di patogenicità e *switch* del coreettore delle varianti del virus SHIV-SF162 CY rispetto il virus SHIV-SF162P4.

Studio della variabilità del gene *tat* ed *env* del virus SHIV-SF162CY in scimmie vaccinate con le proteine TAT ed ENV non protette dall'infezione.

Valutare la possibile insorgenza di varianti del virus SHIV-1157i durante la fase cronica che siano altamente competenti per la replicazione e che inducano una graduale perdita di linfociti CD4 circolanti, come accade nell'infezione naturale di HIV-1 nell'uomo.

Trasferibilità dei risultati

Questi studi porteranno ad una migliore comprensione dei meccanismi patogenetici dei virus *shiv* nel modello animale del macaco, e quindi all'identificazione di epitopi virali *target*, in quanto essenziali per la replicazione del virus. I nostri studi potranno essere traslati sull'uomo e quindi apportare nuove conoscenze sulla biologia dell'HIV-1. Tali informazioni saranno fondamentali per l'allestimento di nuove strategie terapeutiche e, soprattutto, per lo sviluppo di un vaccino di contro l'infezione da HIV-1.

Cross-talk tra endoteli e linfo-monociti nell'infezione da HIV mediata da Tat extracellulare

I nostri studi indicano che Tat extracellulare esercita molteplici e importanti funzioni. Da un lato viene selettivamente internalizzata, mediante integrine, da cellule presentanti l'antigene (cellule dendritiche, macrofagi, cellule endoteliali) attivandole e potenziandone (polarizzandone) la funzione; in tal modo Tat esercita un effetto di adjuvanza per altri antigeni. Modulando in queste cellule l'attività del proteasoma, Tat aumenta lo spettro degli epitopi generati e presentati in classe I e, quindi, l'immunità cellulare verso HIV e altri patogeni. Legando l'involucro virale e il V3 *loop* di Env, e mimando i co-recettori per HIV, Tat aumenta l'infettività di HIV e ne espande il tropismo. *In vivo*, Tat extracellulare è presente soprattutto alla superficie degli endoteli attivati, come indicato da colorazione immunostochimica di linfonodi e di lesioni di sarcoma di Kaposi in soggetti infettati. Questi endoteli sono sede di intenso *trafficking* di linfo-monociti, che trasmigrano da e per i vasi e i tessuti. In questo contesto, studi recenti hanno indicato che, durante il contatto e la trasmigrazione, cellule endoteliali e linfo-monociti si scambiano attivamente frammenti di membrana, acquisendo molecole e marcatori di superficie gli uni degli altri. È perciò di estremo interesse studiare questi eventi per chiarire gli effetti di Tat extracellulare presente sugli endoteli per i linfo-monociti, e per l'internalizzazione e l'infezione da HIV in queste cellule.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio si propone innanzitutto di valutare il ruolo di Tat extracellulare adeso alla superficie di cellule endoteliali vascolari e linfatiche nell'infezione di linfo-monociti trasmigranti. A questo scopo, monostrati di cellule endoteliali quiescenti o attivate verranno impiegati in saggi di infezione di linfo-monociti autologhi attivati trasmigranti in presenza/assenza di tat e di anticorpi anti-Tat. Sieri di soggetti infettati asintomatici o in progeressione verranno usati per valutare il ruolo di tat extracellulare nella neutralizzazione dell'infezione in questo modello. Infine, verrà valutato l'effetto della co-coltura con cellule endoteliali infettate o pulsate con Tat o Tatcys22 (un mutante privo di capacità transattivante) per cellule T esprimenti livelli sub-ottimali (o negativi per l'espressione) dei 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 antiretrovirali combinate (HAART) hanno indotto una significativa riduzione dell'incidenza dei tumori AIDS-associati, quali il sarcoma di Kaposi (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

rispristino 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 sarcoma di Kaposi 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.

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

L'infezione con SIV o con HIV induce una attivazione delle cellule B, ipergammaglobulinemia, *switching* immunoglobulinico, interruzione dei segnali di cooperazione tra cellule B e T e immunodeficienza. Nel corso dell'infezione, sono prodotti anticorpi (*binding* e neutralizzanti) a titoli elevati senza tuttavia osservare una corrispondenza con un effettivo controllo dell'infezione. È ormai chiaro che la qualità e specificità piuttosto che la quantità di anticorpi prodotti è un requisito fondamentale per poter neutralizzare il virus.

Tat di HIV è una proteina presenta attività biologiche coinvolte nella regolazione di geni virali e cellulari, promuove l'attivazione ed espansione delle cellule B con produzione di IL-6 ed IL-10 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. D'altro canto, è ampiamente noto che per un efficace controllo dell'infezione è indispensabile la induzione di anticorpi anti-Env con forte attività neutralizzante diretta verso ceppi diversi di HIV. È dimostrato che simili anticorpi protettivi difficilmente ottenibili nella infezione naturale, sono generati in seguito a modificazioni in Env (siti di glicosilazione, modificazioni in V1/V2 ecc.) che facilitano l'esposizione di epitopi altrimenti criptici.

La generazione di anticorpi anti-Tat ed -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.

A questo proposito, pensiamo di utilizzare cellule B da scimmie vaccinate con proteine Tat e DV2-Env (Env delecto della regione V2) che sono state capaci di controllare l'infezione dopo *challenge* mucosale con SHIVSF162P4AH595 cresciuto e titolato in scimmie.

Risultati attesi nel triennio

Alla luce di quanto sopra detto intendiamo:

- Standardizzare un protocollo per la stabilizzazione *in vitro* e clonaggio di cellule B di scimmie vaccinate ma prima del *challenge* virale.
- Analizzare con metodiche immunoenzimatiche (ELISA, *Western blot*) il repertorio delle Ig rispetto al loro isotipo e specificità contro la Tat ed Env di HIV-1.
- Caratterizzare il fenotipo delle cellule B producenti anticorpi al fine di identificare potenziali marcatori predittori *in vivo* della produzione di anticorpi speculari sia in corso di vaccinazione che dopo *challenge*.
- Caratterizzazione della classe tipo (IgG, IgM) e sottoclasse degli anticorpi prodotti.
- Valutazione *in vitro* delle attività antivirali degli anticorpi (ADCC, ADCVI, neutralizzazione).
- Selezione di cloni cellulari producenti anticorpi della attesa specificità e attività biologica e quindi procedere al clonaggio molecolare e analisi dei specifici geni di Ig.
- Valutazione *in vitro* e nel modello del primate non umano della tossicità e dell'attività protettiva degli anticorpi selezionati.

Trasferibilità dei risultati

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 derivati da scimmia, necessitano di essere modificati (umanizzati) al fine di evitare effetti tossici gravi se inoculati nell'uomo.

Incidenza e patogenesi della infezione da retrovirus Type D nell'uomo

I retrovirus della scimmia di Tipo D (SRV) sono un gruppo di retrovirus strettamente correlati, endemici in scimmie di diverse aree geografiche (Africa, Asia sud-orientale). Gli SRV sono stati identificati come gli agenti eziologici di fibromatosi (retropenitoneale, cutanea), di una immunodeficienza simile a quella indotta da HIV-1 o HIV-2, o nella scimmia da SIV. Tuttavia, gli SRV non sono correlati né con HIV, né con HIV-2 né con HTLV o il suo omologo STLV nella scimmia. Gli SRV hanno un largo tropismo cellulare (linfociti B e T, monociti, fibroblasti, cellule epiteliali, cellule di Langerhans). Nella cellula infetta il genoma di SRV è presente sia in forma provirale che come DNA circolare che persiste nel tempo. Non si può escludere che ricombinazioni geniche con altri retro- lenti-virus confettanti e selezione nell'ospite, possano portare alla generazione di un nuovo ceppo virale potenzialmente patogeno per l'uomo. Ad oggi evidenze di esposizione a SRV sono state già osservate nell'uomo seppure una stretta associazione con le osservate patologie non è stata ancora dimostrata (donatori di sangue, omosessuali, tossicodipendenti, linfoma di Burkitt, pazienti con AIDS e con un linfoma B, schizofrenici). L'infezione con SRV è ristretta a certe regioni geografiche dell'Africa occidentale, dell'India e dell'Asia sud-orientale dove sia per contatti che per usi alimentari la promiscuità tra uomo e scimmia è molto frequente. Le modalità di trasmissione sia verticale che orizzontale dell'infezione da SRV, l'aumento di flussi migratori verso l'Italia da diversi Paesi africani, medio orientali e asiatici ha fatto aumentare l'attenzione sanitaria per il rischio di recrudescenza di vecchie infezioni (ad es. Tubercolosi) o comparsa di nuove infezioni. Questo potrebbe essere il caso dell'infezione da SRV.

Risultati attesi nel triennio

Alla luce di tali considerazione, ci proponiamo di:

- isolare SRV e approntare metodologie molecolari ed immunologiche per rilevare *marker* dell'infezioni da SRV nel plasma e in linfociti;
- valutare la possibilità di ricombinazioni genica in cellule B di scimmie confettate con SRV, SIV e HIV.
- studiare l'incidenza e la prevalenza dell'infezione da SRV in Italia in gruppi di residenti e immigrati da diversa origine geografica (Africa, Asia), con e senza rischio di trasmissione di infezioni (donatori, tossicodipendenti, omosessuali, politrasfusi);
- valutare l'incidenza delle infezioni con SRV in pazienti con diverse patologie (malattie linfoproliferative e tumori associati, schizofrenici ecc.).

Trasferibilità dei risultati

I risultati finali attesi, contribuiranno ad una più approfondita conoscenza della diffusione della infezione da SRV nella popolazione migratoria o residente in Italia e delle patologie potenzialmente ad essa associate. I risultati ottenuti da tale studio ci permetteranno di approntare protocolli di interventi di preventivi e terapeutici che se dimostrati efficaci nel modello preclinico, possono essere di facile applicabilità all'uomo.

Messa a punto di una piattaforma tecnologica per lo sviluppo di vaccini a base di virosomi

Il CNAIDS sta sviluppando una nuova piattaforma tecnologica che utilizza virosomi modificati al fine di trasportare antigeni virali o tumorali in cellule presentanti l'antigene quali cellule dendritiche. I virosomi, in particolare quelli derivati dal virus dell'immunodeficienza acquisita umana (HIV), hanno dimostrato una notevole capacità di indurre risposte immunitarie di tipo cellulare contro gli antigeni ad essi associati. Nel nostro laboratorio è stato isolato un mutante della proteina Nef di HIV-1 (Nef7) capace di inserirsi nei virosomi con una efficienza molto elevata. Questa caratteristica ci ha permesso di veicolare nei virosomi elevate quantità di antigeni virali o tumorali come prodotti di fusione con Nef7. Tali particelle saranno utilizzate per sviluppare nuove strategie vaccinali contro infezioni da HIV, virus dell'Epatite C, Papillomavirus e virus Influenza e contro tumori suscettibili alla risposta immunitaria dell'ospite.

Risultati attesi nel triennio

Gli obiettivi della presente attività di ricerca si possono così sintetizzare:

- Valutazione dell'antigenicità dei diversi tipi di virosomi. Tramite saggi *in vitro* valuteremo la capacità dei virosomi di indurre risposte immunitarie specifiche contro gli antigeni da essi trasportati. In particolare, i nostri virosomi sono stati formulati in modo da favorire il *cross-priming* di linfociti T CD8, pertanto ci aspettiamo che il nostro approccio vaccinale induca una potente risposta citotossica.
- Valutazione dell'immunogenicità dei diversi tipi di virosomi mediante studi pre-clinici in modelli di piccoli animali. L'intensità e la qualità della risposta immune contro gli antigeni fusi al mutante Nef7 nei virosomi sarà paragonata a quella indotta dalle rispettive proteine ricombinanti. In particolare, ci aspettiamo che il *delivery* diretto degli antigeni alle cellule presentanti l'antigene e l'intrinseco potere adiuvante dei virosomi possa indurre una risposta cellulare potente e duratura.
- Studio dell'efficacia dei vaccini a base di virosomi. Valuteremo gli effetti della vaccinazione nel proteggere gli animali contro il tumore indotto da HPV o contro l'infezione da virus dell'influenza. In particolare, ci aspettiamo che la potente risposta citotossica antigene specifica indotta da virosomi possa proteggere gli animali vaccinati.

Trasferibilità dei risultati

La messa a punto di vaccini efficaci contro patologie quali AIDS, epatite C e cancro nonché lo sviluppo di un vaccino universale anti influenza è di primaria importanza. Qualora la strategia vaccinale a base di virosomi si dimostrasse efficace nell'indurre una potente risposta citotossica antigene specifica, la trasferibilità dei risultati prodotti sarebbe ampia sia per lo sviluppo di vaccini di tipo preventivo che terapeutico. I virosomi prodotti nei nostri laboratori rappresentano un prodotto di prima generazione che, in collaborazione con industrie biotecnologiche, potrebbe essere ulteriormente migliorato e prodotto su grossa scala. Inoltre, i nostri virosomi a base retro- e lentivirale sono protetti da un brevetto. Pertanto l'ISS potrà possederne la proprietà intellettuale per lo sviluppo ed utilizzo terapeutico.

Network europeo per lo sviluppo di interventi preventivi e terapeutici contro HIV/AIDS

La diffusione dell'infezione da HIV a livello mondiale 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 microbici. Numerosi progetti sono in atto in ambito europeo, volti alla identificazione e allo sviluppo clinico di nuovi candidati vaccinali e microbici. Il CNAIDS ha già partecipato o ha sviluppato e coordinato progetti (AVIP, MUVAPRED) miranti allo sviluppo di nuovi approcci vaccinali. In particolare, sono stati sviluppati e testati con successo nel modello preclinico del macaco nuovi vaccini basati sulla combinazione di geni regolatori (Tat) e strutturali (Env delete della regione V2) e nuovi sistemi di *delivery* per il vaccino Tat. Inoltre, il CNAIDS ha condotto o sta conducendo *trial* clinici di fase I/II in Italia e in Sudafrica. È sulla base di questa vasta e qualificata esperienza che il CNAIDS partecipa al progetto europeo EUROPRISE, 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. I partner nel consorzio Europrise coordinano 14 progetti finanziati dalla Comunità Europea nell'ambito del VI Programma Quadro e rappresentano ben 122 istituzioni di 22 Paesi diversi.

Risultati attesi nel triennio

Benché ciascun centro partecipante abbia standardizzato le metodiche per il monitoraggio immunologico e virologico di scimmie arruolate in protocolli sperimentali, c'è la necessità di armonizzare le metodiche, valutarle comparativamente mediante test di *proficiency*, sviluppare nuovi reagenti e metodologie per il monitoraggio dei potenziali correlati di protezione, generare procedure standard per la validazione dei test. In tale ambito intendiamo contribuire:

- alla identificazione, allo sviluppo ed alla validazione di un gold standard per il test di neutralizzazione;
- allo sviluppo, standardizzazione e validazione di saggi per il monitoraggio delle risposte cellulo-mediate (ELISPOT, determinazione intracellulare di citochine/chemochine)
- alla validazione dei metodi per il monitoraggio virologico quantitativo nella scimmia;
- allo sviluppo di saggi per identificare marcatori della progressione clinica dell'infezione e delle risposte umorali nel modello del primate non umano.

Inoltre, il CNAIDS intende apportare il proprio contributo per l'identificazione di nuovi candidati vaccinali (preventivi/terapeutici) efficaci contro HIV/AIDS nell'ambito di EUROPRISE.

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.

Produzione di complessi Tat/Env basati su isolati virali "V1-V2 short"

Abbiamo recentemente osservato che la proteina regolatrice di HIV Tat, 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. In particolare, Tat riduce la capacità di Env di riconoscere i suoi recettori naturali per l'endocitosi, le lectine di tipo C. Grazie a ciò, il virus viene "diretto" sulle integrine RGD-dipendenti, i recettori di Tat. Entrambe le classi di recettori sono altamente espresse da cellule dendritiche e macrofagi, ma le integrine sono assai più efficienti delle lectine nell'innescare l'endocitosi del virus. Legando Tat, HIV penetra perciò in queste cellule con accresciuta efficienza. Poiché questa via di penetrazione è mediata da Tat, 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. Questo progetto, in collaborazione con l'*Imperial College* di Londra e l'Università di Ferrara, si propone di utilizzare varianti naturali di Env per generare complessi Tat/Env caratterizzati da elevata stabilità ed immunogenicità.

Risultati attesi nel triennio

I nostri studi indicano che la stabilità del complesso Tat/Env è enormemente accresciuta da delezioni nella regione variabile V1-V2 di Env. Queste forme Env delete sono simili a varianti naturali note per le ridotte dimensioni di questa regione, le varianti "V1-V2 short". Queste varianti emergono alla porta di entrata durante la penetrazione del virus nel corso dell'infezione primaria, sono le sole ad espandersi ed espongono epitopi conservati di Env (cioè, i bersagli naturali per un vaccino preventivo).

Allo scopo di generare complessi Tat/Env con queste varianti, il plasma di soggetti infettati africani verranno utilizzati per amplificare sequenze Env (gp160) mediante RT PCR. Le sequenze amplificate verranno sequenziate per determinare la lunghezza della regione variabile V1-V2. I candidati verranno successivamente clonati in vettori di espressione eucariotici per l'espressione in cellule CHO, purificati e testati mediante *surface plasma resonance* per l'affinità e la stabilità del legame con Env. I migliori candidati Tat/Env verranno testati in modelli animali e il candidato più immunogenico ed efficace prodotto in condizioni GMP per la sperimentazione sull'uomo.

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.

Regolazione della replicazione di isolati primari di HIV-1 in cellule dendritiche, macrofagi e linfociti T CD4+

Delimitare la biologia dell'interazione dell'HIV-1 con le cellule *target* è di importanza fondamentale per meglio comprendere la patogenesi e il tropismo del virus. Le cellule dendritiche immature nei tessuti mucosali rappresentano il *target* iniziale dell'HIV-1 durante l'infezione primaria e sono responsabili per il trasporto del virus ai linfonodi e ai linfociti

CD4+. I macrofagi agiscono come reservoir di virus e possono avere un ruolo chiave nel regolare la progressione della malattia nell'infezione da HIV-1. Questo programma di lavoro prevede lo studio della regolazione della replicazione di isolati primari di HIV-1 in cellule dendritiche, macrofagi e linfociti T CD4+ mediante l'utilizzo di ceppi CCR5-tropici (M-tropici), CXCR4-tropici (T-tropici) e CCR5/CXCR4-tropici (*dual-tropici*) ampiamente diffusi nella popolazione mondiale. A tale scopo verranno utilizzati pseudovirus non competenti per la replicazione e contenenti le glicoproteine dell'envelope di isolati primari di HIV-1 quali 92RW020.5, 92UG029 (sottotipo A), Ba-L, SF162, 89.6 e AC10.0.29 (sottotipo B), 92BR025.9 e MCGP1.4 (sottotipo C), 92UG021, 92UG001, 92UG005 e 92UG024.2 (sottotipo D), 92Th023 (sottotipo E), 93BR029.2 (sottotipo F) e 92UG975.10 (sottotipo G). Inoltre, per determinare i meccanismi biologici che sono alla base del cambio di tropismo e infettività virale nei diversi tipi cellulari, verrà esaminata la diversità dell'*envelope* virale in relazione allo stadio della malattia.

Risultati attesi nel triennio

- Analisi del tropismo, dell'uso del corecettore e del fenotipo virale di isolati primari di HIV-1 geneticamente diversi a stadi diversi della malattia.
- Analisi filogenetica degli isolati virali

Trasferibilità dei risultati

I risultati derivanti dal progetto avranno una potenzialità applicativa per studi di struttura-funzione di *envelope* virali geograficamente di diversa origine e per lo sviluppo di agenti antivirali capaci di bloccare la trasmissione del virus dell'AIDS.

Risposte umorali nell'infezione da HIV e in risposta a vaccinazione con antigeni di HIV/SIV

Abbiamo recentemente evidenziato un difetto dell'immunità umorale contro la proteina Tat nei soggetti che non controllano l'infezione da HIV. 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 i quali, tuttavia, non sono in grado di controllare l'infezione né di bloccare la progressione. Lo studio delle risposte umorali indotte da vaccinazione e/o nel corso dell'infezione in modelli animali e nell'uomo è quindi prioritario 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. In questo contesto, è necessario caratterizzare lo spettro delle risposte anticorpali, il loro potenziale neutralizzante, la loro *cross*-reattività verso virus eterologhi, la loro capacità di riconoscere epitopi conservati nei diversi sottotipi e gruppi virali, e mettere in relazione queste caratteristiche alla capacità di controllare l'infezione o all'efficacia protettiva o terapeutica dei vaccini. Inoltre, è necessario chiarire i meccanismi alla base delle ridotte risposte anticorpali verso Tat e gli effetti di Tat sulle risposte dei linfociti B ad altri antigeni di HIV/SIV.

Risultati attesi nel triennio

- Valutazione delle risposte umorali nell'infezione naturale (soggetti infettati) e in scimmie vaccinate o non vaccinate, in seguito a *challenge*;
- Valutazione della presenza di risposte anticorpali indotte da immunizzazione/vaccinazione nei modelli animali prescelti (topi, conigli, scimmie) e nell'uomo;
- Caratterizzazione degli anticorpi presenti nel siero/plasma mediante determinazione di: i) titolo degli anticorpi di legame (inclusa la differenziazione in classi e sottoclassi

- immunoglobuliniche); ii) titolo degli anticorpi neutralizzanti; iii) 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;
- 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, e sul mantenimento ed espansione della cellule B memoria;
 - Analisi della formazione dei centri germinativi nei linfonodi regionali di animali vaccinati con Tat;
 - Studio della localizzazione di Tat nei centri germinativi (endoteli, cellule dendritiche follicolari) in animali infettati, vaccinati o *naïve*.
 - Determinazione degli effetti di Tat extracellulare sulla capacità di neutralizzazione di sieri di primati infettati/vaccinati e di soggetti infettati/vaccinati.
 - Valutazione del difetto nella risposta umorale a tat in soggetti/animali vaccinati/infettati mediante IVAP (*in vitro antibody production*).

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 del complesso Tat/Env nell'internalizzazione, infezione e trans-infezione di HIV

Abbiamo recentemente dimostrato che la proteina Tat interagisce con il V3 *loop* dell'Env di HIV e che questa interazione avviene a concentrazioni nanomolari, è stabile, e aumenta l'infettività virale. Questi dati hanno importanti implicazioni per la patogenesi virale e, in particolare, per gli eventi più precoci dell'infezione. La proteina Tat viene selettivamente ed efficientemente internalizzata tramite le integrine avb3, a5b1 e avb5 da cellule dendritiche, macrofagi e cellule endoteliali attivate. Queste cellule rappresentano i primi *target* di HIV alla porta d'entrata. I nostri dati indicano che la formazione del complesso tra Tat ed Env modifica il *pathway* di internalizzazione di Env e HIV in queste cellule, dirigendo il virus sulle integrine riconosciute da Tat e inibendo il riconoscimento dei recettori naturali di Env (*C-type lectin receptor*). Ciò aumenta la loro suscettibilità e/o permissività all'infezione. Lo studio degli effetti della formazione del complesso Tat/Env sull'internalizzazione di HIV, la trasmissione del virus, e il processamento degli antigeni virali in queste cellule è quindi di primaria importanza sia per la comprensione della patogenesi virale che per il *design* di nuovi immunogeni per strategie preventive e terapeutiche contro l'HIV/AIDS.

Risultati attesi nel triennio

Questi studi consentiranno di chiarire gli effetti dell'interazione Tat/Env nell'infezione di queste cellule con HIV. Cellule dendritiche, macrofagi ed endoteliali verranno infettate con particelle virali preincubate o no con Tat o con il mutante Tatcys22, in presenza o assenza di anticorpi bloccanti le integrine o i recettori per Env; la replicazione del virus sarà quindi monitorata a vari tempi dall'esposizione al virus. Inoltre, sarà possibile esaminare il ruolo del complesso Tat/Env nella trans-infezione di cellule T da parte di cellule dendritiche, macrofagi e cellule endoteliali esposte al virus. Infine, questi studi consentiranno di valutare se il legame di

Tat ad Env sia in grado di proteggere il virus da anticorpi anti-env neutralizzanti l'infezione e la trans-infezione.

Trasferibilità dei risultati

Questi studi consentiranno di acquisire informazioni circa la rilevanza dell'interazione Tat/Env con cellule *target* alla porta d'entrata del virus e per la validazione preclinica dei complessi Tat/Env o Tat/VLP quali immunogeni di nuova generazione.

Ruolo della citochina IL-15 e di geni regolatori di HIV (Tat) nella modulazione delle risposte immuni in approcci vaccinali/ terapeutici contro EBV e neoplasie associate

Tat, proteina regolatoria di HIV fondamentale nella patogenesi dell'infezione, oltre ad essere utilizzata come immunogeno in approcci vaccinali contro HIV/AIDS, presenta attività biologiche e immuno-modulatorie che la rende particolarmente attrattiva per approcci vaccinali (preventivi/terapeutici) non convenzionali verso altri patogeni. Infatti, Tat modifica l'espressione di geni cellulari; modula l'attività di cellule B/T; promuove la maturazione delle cellule dendritiche; induce preferenzialmente un risposta di tipo TH-1; aumenta l'attività proteolitica dell'immuno-proteasoma con conseguente esposizione di MHC-I-binding epitopi CTL sub-dominanti di antigeni eterologhi.

IL-15 è una citochina prodotta principalmente da cellule dendritiche, monociti/macrofagi, cellule endoteliali e muscolari, con attività immuno-regolatorie (aumento della proliferazione di linfociti T *naïve* e attivati, di attività NK e CTL, induzione di risposte polarizzanti di tipo Th1, proliferazione e differenziazione di cellule B, chemiotassi di linfociti T, maturazione di cellule dendritiche, espansione di *pool* di cellule memoria antigene-specifica).

EBV induce infezione persistente in una larga proporzione di persone, mononucleosi infettiva e diversi tipi di neoplasie in pazienti infettati e non con HIV. Recentemente, da linfoma B extranodale di *Macaca fascicularis* infettata con SIV abbiamo isolato un herpesvirus B linfotropico (EBV-cy), omologo ad EBV umano. EBV-cy infetta e trasforma *in vitro* cellule B di scimmia e inoculato per via orale, induce linfomi nel modello preclinico del coniglio. Pertanto, intendiamo verificare se molecole immunoadiuvanti come IL-15 e/o Tat siano in grado di polarizzare in modo efficace le risposte immuni e protettive in animali vaccinati con cellule singeniche esprimenti EBV ma rese apoptotiche.

Risultati attesi nel triennio

Il programma di ricerca proposto si articola nei seguenti obiettivi:

- Studiare *in vitro* gli effetti di IL-15 e di Tat da soli o in combinazione su infezioni primarie di linfociti con EBV-cy e su cellule tumorali di scimmia (cellule B e dendritiche) trasformate da EBVcy. Si valuteranno le modulazione dell'espressione di geni virali potenzialmente implicati nel processo neoplastico (bcl-2, bcl-6, p53, c-myc) e di geni cellulari, potenziale rescue delle loro attività biologiche.
- Valutare nei topi (immunogenicità) gli effetti immunoadiuvanti di IL-15 e di Tat da soli o in combinazione, in un approccio vaccinale basato su inoculo intraderma di cellule tumorali rese apoptotiche.
- Valutare nel modello preclinico del coniglio (immunogenicità ed efficacia) l'efficacia preventiva o terapeutica della co-amministrazione di IL-15 e/o Tat con cellule tumorali apoptotiche (preventivo) o dopo infezione per via mucosale con EBVcy.
- Successivamente, sulla base dei risultati ottenuti nel topo e nel coniglio, sarà selezionato un approccio (preventivo e terapeutico) da validare nel modello preclinico del primate non umano (terzo anno).

I risultati attesi sono: i) una più approfondita conoscenza sulle modulazioni delle risposte immuni *in vitro* da parte di molecole immunoadiuvanti; ii) aumento delle risposte immuni a conseguenza della co-amministrazione di IL-15 e/o Tat; iii) valutazione nei modelli preclinici l'efficacia protettiva di interventi preventivi e terapeutici non convenzionali contro EBV e tumori associati.

Trasferibilità dei risultati

La disponibilità di modelli *in vitro* e di modelli preclinici (in particolare del modello del primate non umano, filogeneticamente vicino all'uomo), è di fondamentale importanza in quanto ci offre la possibilità di avere sistemi sperimentali con cui studiare la patogenesi dell'infezione e l'efficacia di interventi vaccinali contro EBVcy che mima l'infezione di EBV nell'uomo. Conseguentemente ogni approccio una volta validato nel modello preclinico potrà essere di immediata trasferibilità e applicabilità all'uomo.

Ruolo della proteina Tat di HIV-1 nella migrazione trans endoteliale di cellule T CD4+ e di monociti

Nei processi infiammatori l'endotelio attivato esprime molecole di adesione e rilascia chemochine che promuovono l'adesione di leucociti e il loro passaggio attraverso la barriera vascolare. In particolare, il microcircolo linfatico svolge un ruolo importante nella disseminazione dell'infezione di HIV-1, favorendo l'ingresso delle cellule infettate a livello della *portal of entry* e successivamente lo *spreading* del virus ai tessuti linfatici distali dove inizia a replicarsi. La proteina Tat di HIV-1, rilasciata da cellule T acutamente infettate, può, tramite il suo *domain* basico e quello RGD, legarsi rispettivamente agli heparan solfati proteoglicani e ai recettori integrinici presenti sulla superficie delle cellule endoteliali e così concentrarsi localmente a livello dei siti di prima infezione. Tat è inoltre in grado di indurre rilascio di citochine e chemochine sia da parte delle cellule T infettate sia dalle cellule endoteliali favorendone l'attivazione. Alla luce di questi dati è ipotizzabile che Tat possa svolgere un ruolo molto importante nelle prime fasi dell'infezione influenzando sia la trasmigrazione di cellule non infette verso il sito di prima infezione, dove elevati sono i livelli di infiammazione, sia, viceversa, il passaggio all'interno del microcircolo vascolare linfatico di cellule infettate che vengono poi veicolate verso i linfonodi.

Risultati attesi nel triennio

- Valutazione della suscettibilità all'infezione da HIV-1 (X4, R5 o *dual* tropico) di cellule endoteliali derivate da microcircolo di origine dermica o linfatica, attivate o meno con citochine infiammatorie (es. IFN γ , TNF α , e IL1 β). Gli esperimenti di trasmissione di HIV-1 verranno effettuati sia utilizzando virus libero, sia cocoltivando cellule T o monociti acutamente infettati con le cellule endoteliali.
- Determinazione dell'espressione di Tat rilasciato sulla superficie delle cellule endoteliali, cellule T o monociti-macrofagi.
- Valutazione delle capacità di Tat di influenzare la migrazione transendoteliale di PBMC, linfociti T purificati e monociti-macrofagi.
- Determinazione delle capacità di Tat di indurre attivazione o espressione di molecole di adesione (ad es. ICAM-1 e VCAM) e/o rilascio di chemochine e citochine infiammatorie.
- Determinazione dei meccanismi molecolari: analisi dell'attivazione di *pathway* di *signaling* indotti da Tat durante i fenomeni di trasmigrazione.

Trasferibilità dei risultati

Quando si pensa ai processi di trasmissione e di infezione acuta da HIV-1 e si considerano le enormi difficoltà che le difese immunitarie dell'ospite incontrano una volta che si è creato il *reservoir* del virus nei tessuti linfatici, appare sempre più chiaro che le future strategie di cura e

prevenzione dell'HIV-1 debbano essere messe a punto sulle le prime fasi dell'infezione, ovvero a livello della barriera mucosale dove avviene l'iniziale interazione del virus con le cellule immunitarie dell'ospite. È necessario identificare molecole chiave, virali e/o cellulari, dello *spreading* del virus, dalla *portal of entry* verso i tessuti linfatici distali dove si concretizza il buon esito dell'infezione. La comprensione dei primi eventi patogenetici potrebbe essere di grande aiuto per lo sviluppo di efficaci terapie o strategie vaccinali contro tali proteine virali, quale potrebbe essere Tat, al fine di bloccare l'infezione e ridurre così la diffusione del virus.

Ruolo di Tat nell'infettività e nel tropismo dell'HIV in diversi sistemi cellulari

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. Di conseguenza, 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. I nostri studi, tuttavia, hanno evidenziato la capacità del Tat extracellulare di interagire con i componenti dell'*envelope* virale, favorendo così il processo di infezione virale. Lo studio di questi effetti di Tat extracellulare è, quindi, 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, inoltre, di estrema importanza 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. È nostra intenzione proseguire nel progetto di ricerca e studiare il ruolo di Tat nell'infettività e nel tropismo dell'HIV in diversi sistemi cellulari. Studieremo se il Tat, sia nella forma solubile che in quella immobilizzata aumenta l'efficienza di infezione di colture cellulari primarie (linfociti, epiteliali, dendritiche e monociti/macrofagi), e se è in grado di modulare il tropismo virale. A questo scopo, studieremo l'effetto di Tat extracellulare sull'infettività di diversi ceppi virali sia X4- che R5-tropici. Valuteremo eventuali differenze di infettività con pseudotipi che utilizzano envelope di diversi isolati virali. 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. 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 lo sviluppo di nuovi inibitori dell'infezione da HIV.

Sperimentazione clinica di Fase I (preventiva e terapeutica) del vaccino anti-HIV/AIDS basato sulla proteina Tat: follow-up esteso (ISS OBS P-001 e ISS OBS T-001)

Le strategie utilizzate finora al fine di allestire un vaccino efficace contro l'HIV si sono basate sull'utilizzo di proteine del rivestimento esterno del virus (*envelope*), allo scopo di indurre anticorpi neutralizzanti capaci di bloccare l'entrata del virus nelle cellule. Questi approcci sono falliti a causa dell'elevata variabilità virale, soprattutto delle proteine del rivestimento esterno. Il CNAIDS ha perseguito nuovi approcci vaccinali con lo scopo primario di indurre una risposta immune capace di controllare la replicazione virale e di impedire l'insorgenza e progressione della malattia. Per questo tipo di approccio i bersagli ottimali sono rappresentati da proteine del virus la cui attività consiste nel regolare la replicazione virale durante le varie fasi dell'infezione. Tali requisiti corrispondono a quelli posseduti dalla proteina Tat. Sulla base di questo razionale e dei promettenti risultati ottenuti dagli studi preclinici, l'ISS ha condotto in Italia *trial* clinici di Fase I, in doppio cieco, randomizzati e controllati con placebo, con la proteina Tat, sia su soggetti sieronegativi (vaccinazione preventiva) che su individui sieropositivi (vaccinazione terapeutica) allo scopo di dimostrare la sicurezza e l'immunogenicità del candidato vaccinale. I volontari sono stati sottoposti a cinque immunizzazioni (0, 4, 8, 12, 16 settimane) per via sottocutanea (con adiuvante), o per via intradermica (senza adiuvante), con tre differenti dosi vaccinali (7.5, 15 e 30 microgrammi). I risultati degli studi indicano che il vaccino è sicuro e immunogenico avendo indotto sia anticorpi che risposte cellulari specifiche, confermando il pieno raggiungimento degli obiettivi prefissati sia nello studio preventivo che in quello terapeutico.

Due studi (ISS OBS P-001 e ISS OBS T-001) di estensione della fase di follow-up dei volontari che hanno preso parte agli studi di Fase I sono stati attivati al fine di valutare nel tempo la permanenza di risposte immuni generate in seguito alle immunizzazioni con la proteina ricombinante Tat.

Gli studi, puramente osservazionali, prevedono il monitoraggio per ulteriori due anni di:

- Sicurezza: valutazione clinica e monitoraggio di parametri ematologici, biochimici (inclusi parametri di funzionalità epatica e renale) e immunologici. Per il protocollo terapeutico le valutazioni di sicurezza includono anche il monitoraggio del numero assoluto di cellule T CD4+ circolanti e della viremia plasmatica.
- Immunogenicità: valutazione della risposta umorale anti-Tat specifica (titolazione ed epitope *mapping* di IgM, IgG e IgA anti-Tat); valutazione della risposta cellulare anti-Tat specifica (proliferazione, produzione di γ IFN e di IL-4 in risposta al Tat mediante Elispot; valutazione della attività inibitoria da parte degli anticorpi anti-Tat.

Risultati attesi nel triennio

Nel corso di questi studi si potrà caratterizzare l'entità e la durata delle risposte immuni specifiche indotte dalla vaccinazione con la proteina ricombinante Tat di HIV-1, permettendo di avere maggiori indicazioni per lo sviluppo di protocolli clinici e la valutazione di eventuali richiami vaccinali.

Trasferibilità dei risultati

I risultati relativi alla fase di estensione di follow-up permetteranno una ulteriore valutazione e caratterizzazione della risposta immune specifica, umorale e cellulare, indotta dalla proteina Tat, fornendo indicazioni importanti per la preparazione dei protocolli clinici di Fase II.

Sperimentazione clinica di Fase I (preventiva e terapeutica) volta alla valutazione della innocuità e immunogenicità della formulazione vaccinale basata sulla veicolazione della proteina Tat a micro- e nano-particelle

Il CNAIDS ha sviluppato un vaccino contro l'HIV/AIDS basato sulla proteina Tat, una proteina regolatrice essenziale per la replicazione del virus fin dalle prime fasi dell'infezione, necessaria per individuare l'espressione dei geni di HIV. Tale approccio è mirato alla induzione di una risposta immune in grado di controllare la replicazione virale e, conseguentemente, impedire l'insorgenza e la progressione della malattia. Sulla base dei risultati di studi preclinici e clinici di Fase I sia su soggetti sieronegativi (vaccinazione preventiva) che su individui già infettati da HIV (vaccinazione terapeutica) indicanti la sicurezza, immunogenicità ed efficacia di tale approccio vaccinale, l'ISS ha recentemente attivato la Fase II di sperimentazione clinica in soggetti sieropositivi in trattamento antiretrovirale al fine di valutare l'immunogenicità e la sicurezza del candidato vaccinale durante l'HAART. Sulla base di queste incoraggianti premesse, il CNAIDS intende procedere con un programma di sviluppo del vaccino basato sulla proteina Tat, con l'obiettivo di sviluppare nuove formulazioni vaccinali volte ad ottenere una maggiore stabilità dell'immunogeno ed un contenimento dei costi di produzione, conservazione e distribuzione.

Risultati attesi nel triennio

Nell'ambito di questa attività si intende valutare la sicurezza e l'immunogenicità di una nuova formulazione vaccinale basata sull'utilizzo di micro- e nano-particelle per la veicolazione della proteina Tat. Verrà quindi condotto un trial clinico di Fase I, in doppio cieco, randomizzato e controllato con placebo, su volontari adulti HIV sieronegativi (protocollo preventivo) e HIV sieropositivi (protocollo terapeutico). Saranno effettuate le seguenti valutazioni di sicurezza e immunogenicità:

- monitoraggio clinico e di parametri ematologici, biochimici e immunologici (incluso per il protocollo terapeutico il monitoraggio delle cellule CD4+ circolanti e della viremia plasmatica)
- valutazione della risposta immune umorale anti-Tat specifica (determinazione e titolazione di IgM, IgG e IgA specifiche, mappatura degli epitopi B-cellulari, valutazione dell'attività neutralizzante degli anticorpi identificati, *cloning* e caratterizzazione di cellule B specifiche, *microarray*)
- valutazione della risposta immune cellulare anti-Tat specifica (determinazione della risposta proliferativa e citotossica specifica, mappatura degli epitopi T-cellulari, *cloning* e caratterizzazione di cellule T specifiche, *microarray*).

Trasferibilità dei risultati

La coniugazione del Tat a micro- e nano-particelle permetterà di realizzare una formulazione in grado di ampliare notevolmente le potenzialità applicative di tale approccio vaccinale in quanto la proteina, che richiede la conservazione a -80°C e la creazione di una catena del freddo altamente controllata al fine di mantenerne l'attività biologica, potrà essere conservata, dopo coniugazione, a temperatura ambiente. Tale aspetto assume particolare importanza nella programmazione di sperimentazioni cliniche di Fase IIB/III, coinvolgenti migliaia di volontari, con particolare riferimento alle sperimentazioni che saranno condotte nei Paesi in via di sviluppo.

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 proteina Tat ed Env, con particolare riferimento ad una modificazione di quest'ultima che ne comporta l'esposizione di epitopi conservati (delezione del *loop* 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.

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. Verrà quindi condotto in Italia un *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, *microarray*)
- 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, *microarray*).

Tale sperimentazione clinica sarà realizzata nell'ambito del progetto AVIP, coordinato dal CNAIDS e finanziato dall'Unione Europea.

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. Tale proteina presenta un ruolo chiave nella regolazione della replicazione virale e il suo utilizzo come candidato vaccinale si basa sull'ipotesi secondo la quale se, allo stato attuale delle conoscenze, è impossibile prevenire l'infezione della cellula da parte dell'HIV, potrebbe essere possibile controllare la replicazione del virus dopo la sua entrata nelle cellule e bloccare l'evoluzione dell'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, confermando il pieno raggiungimento degli obiettivi prefissati, il CNAIDS dell'ISS ha recentemente attivato 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, *open label*, randomizzato su 128 pazienti in trattamento HAART. Esso costituisce la prima osservazione degli effetti di Tat su pazienti in trattamento antiretrovirale efficace. Esso rappresenta uno studio di *dose-finding* proponendosi di individuare la dose più efficace e sicura (7,5 o 30 µg di Tat), nonché il numero minimo efficace di inoculazioni (3 o 5). Sulla base di quanto emerso dagli studi di Fase I la modalità di somministrazione utilizzata è quella intradermica.

Risultati attesi nel triennio

Sulla base di tali risultati si procederà alla sperimentazione clinica di Fase IIB del vaccino, articolata come segue:

- *Trial* clinici (preventivo e terapeutico) di Fase IIA in Italia. Per la vaccinazione preventiva saranno arruolati volontari HIV sieronegativi ad alto rischio di infezione, coinvolgendo popolazioni di immigrati provenienti da Paesi in via di sviluppo al fine di valutare il profilo ematologico, metabolico e immunologico in popolazioni caratterizzate da un differente assetto genetico. Per la vaccinazione terapeutica saranno arruolati pazienti sottoposti a differenti regimi terapeutici, per valutare le interazioni tra la terapia antiretrovirale e la vaccinazione (finanziamento del Ministero della Salute).
- *Trial* clinici (preventivo e terapeutico) di Fase IIB. 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 Ministero degli Affari Esteri).

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 realizzazione dei *trial* clinici di Fase II permetterà la valutazione dell'immunogenicità e della sicurezza del vaccino Tat su un numero più ampio di soggetti sieronegativi ad alto rischio per l'infezione da HIV e di individui sieropositivi in differenti stadi di progressione della malattia e sottoposti a differenti regimi terapeutici e preliminari, 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'AIDS.

Studi epidemiologici e molecolari in Sudafrica e in Swaziland, due Paesi della regione sub-sahariana ad alta prevalenza di infezione da HIV

La pandemia da HIV/AIDS rappresenta il maggior problema sanitario, economico e sociale del continente africano. Per contrastare questo quadro, molti governi hanno iniziato attività di prevenzione della trasmissione dell'infezione, inclusa la sperimentazione clinica di vaccini, e prestano sempre maggiore attenzione a strategie di trattamento dell'infezione con farmaci antiretrovirali. Tuttavia, queste attività richiedono un costante monitoraggio valutandone l'impatto sui *trend* di diffusione e sulla modificazione dell'eterogeneità genetica del virus. Sono pertanto necessari studi per valutare la prevalenza e l'incidenza dell'infezione da HIV, e studi

molecolari per determinare il *trend* di progressione e la distribuzione delle varianti di HIV circolanti. Il CNAIDS è da tempo presente in Swaziland e in Sudafrica, due Paesi dell'area sub-sahariana ad elevata prevalenza di infezione da HIV, nell'ambito di programmi di collaborazione nazionali e internazionali. In questi Paesi i Governi hanno attivato strategie atte a contenere il diffondersi dell'infezione, volte ad una più puntuale informazione alla popolazione sulle modalità di trasmissione del virus, all'allestimento di *trial* clinici vaccinali, e al trattamento con farmaci antiretrovirali di individui con infezione da HIV progredita.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto valuterà l'impatto delle strategie di controllo della diffusione dell'infezione da HIV monitorando il *trend* di progressione dell'infezione in gruppi rappresentativi della popolazione sessualmente attiva in Swaziland (donne in gravidanza) e in coorti preselezionate per studi vaccinali in Sudafrica, e determinerà la distribuzione dei sottotipi dei ricombinanti virali circolanti nella popolazione.

L'incidenza verrà stimata determinando l'indice di avidità (AI) degli anticorpi per gli antigeni HIV. È infatti noto che l'avidità degli anticorpi per gli antigeni aumenta nel tempo dal momento dell'infezione. Tramite l'AI, è possibile stimare quando è avvenuta l'infezione e, pertanto, identificare gli individui recentemente sierconvertiti. Poiché l'analisi verrà eseguita su un numero statisticamente significativo di persone in un gruppo rappresentativo della popolazione, sarà possibile stimare il numero di nuove infezioni presenti nel gruppo e, indirettamente, l'incidenza dell'infezione nella popolazione. Questa strategia è già stata utilizzata con successo in individui infettati con ceppi del sottotipo B, ma non in individui infettati con varianti virali di altri sottotipi. Questa metodologia sarà quindi validata per gli studi in aree geografiche dove circolano altri sottotipi virali. A questo fine, lo studio dei sottotipi circolanti verrà effettuato tramite tecniche sierologiche e, ove non sia possibile con queste tecniche identificare con certezza il sottotipo virale, tramite amplificazione e sequenziamento di regioni del genoma virale e successiva analisi filogenetica.

Trasferibilità dei risultati

È indubbio che per ridurre il numero delle morti per AIDS e per arginare la pandemia da HIV sia necessario da una parte fornire la terapia antiretrovirale alle persone infette a costi accessibili per i Paesi africani e, dall'altra, attuare strategie di prevenzione dell'infezione, tra cui l'allestimento di un vaccino efficace nel prevenire l'infezione e/o nel contrastare la malattia. Gli studi proposti si inseriscono come attività preliminari ed essenziali per poter pianificare un'adeguata strategia per il trattamento di un numero elevato di persone infette, e per poter identificare coorti o popolazioni *target* di futuri *trial* vaccinali.

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. La regione più colpita è l'Africa sub-sahariana, tuttavia, anche altre aree geografiche, dall'Asia all'America Latina, presentano un'alta prevalenza e incidenza di infezione. Il quadro è reso più drammatico dall'estrema eterogeneità dei ceppi di HIV presenti in queste aree geografiche. 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. L'AIDS indebolisce particolarmente questa fascia di età. Occorre, pertanto, attuare strategie di contenimento della diffusione dell'infezione da HIV. Tra queste, lo sviluppo di un vaccino contro l'HIV/AIDS rappresenta il mezzo più efficace per contrastare la diffusione del virus.

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: i) monitorare la prevalenza dell'infezione da HIV in Paesi in via di sviluppo e stimarne l'incidenza; ii) valutare la distribuzione dei ceppi e dei ricombinanti di HIV; iii) studiare la capacità del sistema immune di individui infettati da HIV di riconoscere in modo "crociato" i possibili candidati vaccinali; iv) identificare coorti di individui sieronegativi e sieropositivi per la sperimentazione clinica con vaccini contro l'HIV/AIDS; v) condurre *trial* clinici vaccinali che costituiscano il *proof of concept* che il sito è stato adeguatamente preparato per una sperimentazione clinica avanzata con vaccini contro l'HIV/AIDS. I Paesi inclusi nello studio sono il Sudafrica e lo Swaziland. L'attività di base, propedeutica alla sperimentazione, consisterà nell'ottimizzazione e standardizzazione delle tecniche biochimiche, ematologiche, immunologiche e virologiche per la determinazione dei parametri di *background* della popolazione in studio, che saranno il riferimento per la valutazione dell'esito degli studi del progetto.

In questo contesto, il monitoraggio della prevalenza verrà effettuato, a definite scadenze, utilizzando i kit commerciali di riferimento che ogni Paese adotta; l'incidenza verrà stimata tramite determinazione dell'Indice di Avidità, in un singolo *time point*, 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 di anticorpi verso gli antigeni vaccinali, il loro titolo e le regioni lineari che riconoscono e valutando, tramite Elispot, la produzione di citochine da parte di cellule del sangue periferico stimulate con l'antigene vaccinale. La variabilità virale sarà studiata sottotipizzando, sia sierologicamente, sia tramite sequenziamento, il ceppo virale infettante. Le coorti verranno generate arruolando volontari HIV-positivi e -negativi che siano in grado di ripresentarsi a scadenze ben precise per il monitoraggio immunologico e virale. Infine, la sperimentazione clinica riguarderà *trial* di Fase II con il vaccino sviluppato in ISS in individui sia sani, sia infettati da HIV.

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)

La proteina Tat di HIV-1 è una proteina regolatoria prodotta precocemente dopo l'infezione virale che svolge un ruolo fondamentale per la replicazione e l'espressione genica del virus, per la trasmissione virale da cellula a cellula e per la progressione della malattia. Per tali motivi la proteina Tat rappresenta un bersaglio importante per la risposta immune dell'organismo ospite e un candidato ottimale per lo sviluppo di un vaccino contro la malattia da HIV che possa contrastare la progressione verso l'AIDS. Diversi studi trasversali e prospettici condotti

nell'infezione naturale indicano che una risposta immune contro la proteina Tat può svolgere un ruolo protettivo contro la progressione della malattia e che la determinazione della risposta immune anti-Tat possa avere importanti implicazioni per la gestione clinica e terapeutica dei pazienti. In particolare, la presenza di una risposta umorale (anticorpale) contro Tat correla con la non progressione clinica e lo stato asintomatico, mentre è virtualmente assente negli stadi più avanzati della malattia. Tuttavia, anticorpi anti-Tat sono prodotti solo da una piccola frazione (circa il 20%) di individui con infezione da HIV, mentre risposte immuni cellulari di tipo Th1 (γ IFN) sono dimostrabili con elevata frequenza (50-70%) negli stessi individui. Tale evidenza suggerisce che l'induzione di anticorpi anti-Tat nel corso dell'infezione naturale o mediante vaccinazione, sia un evento auspicabile per contrastare la progressione della malattia e che un vaccino terapeutico basato sulla proteina Tat debba essere diretto a quegli individui che non sviluppano una risposta umorale contro Tat nel corso dell'infezione naturale. D'altra parte è di primaria importanza raccogliere dati inerenti la frequenza, l'intensità, la qualità e la persistenza della risposta immune alla proteina Tat in soggetti con infezione da HIV in trattamento combinato con diverse classi di farmaci antiretrovirali, al fine di valutare gli effetti che diversi regimi HAART possono avere sulla risposta immune naturale contro la proteina Tat. Non sono noti infatti gli effetti che il trattamento HAART può indurre sulle risposte immuni adattative contro gli antigeni virali, né se le diverse classi di farmaci antiretrovirali utilizzate in regimi di trattamento combinato possano influenzare la qualità della ricostituzione immunitaria e il mantenimento e/o la generazione di risposte immuni adattative. È noto che gli inibitori della proteasi di HIV (HIV-PI) sono in grado di interferire con la maturazione e funzionalità delle cellule dendritiche e dei linfociti T citotossici, e di alterare l'apoptosi di cellule T e di precursori ematopoietici. D'altra parte, gli inibitori nucleosidici (NRTI) e non nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI), possono interferire con la crescita di precursori ematopoietici, cellule T e cellule mononucleate del sangue periferico. Pertanto, tramite interferenza diretta o indiretta sul sistema immune, tutti i vari regimi di trattamento antiretrovirale combinato hanno potenzialmente la capacità di alterare la risposta immune sia in soggetti infetti che in soggetti vaccinati.

Gli studi osservazionali promossi dal CNAIDS hanno lo scopo principale di raccogliere dati inerenti la frequenza, l'intensità, la qualità e la persistenza della risposta immune alla proteina Tat in soggetti con infezione da HIV sia in stadio asintomatico che in trattamento antiretrovirale.

Risultati attesi nel triennio

Le informazioni raccolte negli studi osservazionali 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 saranno 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 saranno inoltre essenziali per l'identificazione di potenziali coorti di soggetti eligibili per la vaccinazione, con semplificazione delle procedure di selezione per

l'arruolamento, e 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 infezioni a trasmissione sessuale (MST), 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 sarcoma di Kaposi classico (CKS) è una malattia rara che 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 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 Indinavir come monoterapia in pazienti con CKS iniziale o avanzato. I risultati dell'analisi *ad interim* hanno indicato che il trattamento con Indinavir è ben tollerato e induce un'elevata frequenza di risposta nei soggetti con CKS iniziale; al contrario nel CKS avanzato e

complicato, il trattamento con Indinavir induce una temporanea stabilizzazione di malattia, generalmente seguita da progressione. 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 Indinavir 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 Indinavir in associazione a chemioterapia con Vinblastina e Bleomicina. Lo studio prevede un trattamento *debulcking* di induzione con indinavir associato a Vinblastina e Bleomicina, e una fase di mantenimento con Indinavir in monoterapia.

Obiettivi primari dello studio sono:

- 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 di induzione verrà effettuata una nuova stadiazione di malattia allo scopo di determinare la massa tumorale residua per la valutazione obiettiva 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 Indinavir e chemioterapia, e il profilo farmacocinetico di Indinavir 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 cellule-mediate ad HHV8, un virus oncogeno associato alla patogenesi del sarcoma di Kaposi).

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 degli effetti della proteina Tat sulle attività immunomodulatorie delle cellule dendritiche

Abbiamo recentemente dimostrato che la proteina Tat lega in maniera altamente specifica recettori integrinici ed è efficientemente internalizzata da cellule dendritiche di origine monocitaria (MDDC). In seguito all'internalizzazione, Tat promuove la maturazione e l'attivazione delle cellule dendritiche, come evidenziato dalla modulazione di molecole costimolatorie e di *marker* di attivazione sulla superficie cellulare, e dall'induzione di citochine e chemochine associate ad un'attività polarizzante di tipo Th1. MDDC trattate con Tat si sono dimostrate superiori a MDDC non trattate nell'indurre risposte allogeneiche e di richiamo (tossoidi tetanici) *in vitro*. Questi dati hanno grande rilevanza in vaccinologia, perché costituiscono la prima dimostrazione, nell'ambito della ricerca per lo sviluppo di un vaccino contro l'HIV/AIDS, che un antigene virale possiede attività immunoregolatorie e che pertanto possa funzionare anche come adiuvante. Importanti conferme a queste evidenze sono venute da

studi condotti in modelli animali (topi e scimmie). In questi studi, Tat è stato associato alla vaccinazione con altri antigeni virali (Env, Gag), e la risposta immune indotta confrontata a quella ottenuta vaccinando senza Tat o con un Tat mutato privo della capacità transattivante (Tatcys22). I dati ottenuti in questi modelli hanno dimostrato che solo il Tat nativo è in grado di incrementare e modulare in senso Th1 la risposta immunitaria contro altri antigeni virali. Inoltre è stato notato nel modello murino il mantenimento o l'espansione nel tempo di cellule effettrici specifiche citotossiche per altri antigeni virali, suggerendo ulteriori attività immunomodulatorie di Tat.

Risultati attesi nel triennio

Sono ancora in corso studi per chiarire i meccanismi di internalizzazione e gli effetti di maturazione/attivazione esercitati da Tat, molti dei quali appaiono essere mediati da induzione di TNF-alfa, come indicato da nostri dati recenti, i quali hanno confermato che ciò richiede l'attività transattivante di Tat. Resta da determinare se il Tat ha la capacità di innescare un programma di attivazione specifico (Th1), se questo è modulabile da altri fattori, e se Tat è in grado di deviare una risposta Th2 verso una polarizzazione di tipo Th1, come indicato da nostri recenti studi di immunizzazione di scimmie *cynomolgous* con Tat wt e un mutante (cys22) privo di attività transattivante.

Continueranno inoltre gli studi volti a verificare gli effetti di Tat sulle cellule dendritiche plasmacitoidi. Infine, proseguiranno gli studi volti a verificare se altre proteine regolatore virali quali Rev e Nef esplicano attività immunomodulatorie e come queste si complementano con quelle mediate da Tat (effetto additivo, sinergico, antagonista).

Trasferibilità dei risultati

L'elucidazione delle attività immunomodulatorie di Tat e delle altre proteine regolatorie di HIV-1 costituirà un notevole progresso nella comprensione della patogenesi virale e fornirà uno strumento importante per il disegno di nuove strategie vaccinali sia contro l'HIV che altre malattie infettive e potenzialmente contro i tumori, in cui l'immunogenicità dell'antigene prescelto è spesso limitata e richiede frequenti richiami.

Studio dei microRNA nell'infezione da HIV-1

I microRNA (miRNA) sono RNA non codificanti a singolo filamento composti approssimativamente di 22 nucleotidi, espressi in tutti gli organismi pluricellulari e in alcuni virus. Agiscono regolando l'espressione delle proteine a livello post-trascrizionale, appaiandosi parzialmente alla regione 3' non tradotta (UTR) di mRNA *target*, riducendone la traduzione e/o la degradazione. Negli ultimi anni sono stati identificati centinaia di miRNA nel genoma umano, coinvolti nella regolazione di importanti processi cellulari, come sviluppo, differenziamento, proliferazione, apoptosi e metabolismo.

La replicazione del virus dell'HIV-1 dipende dal macchinario della cellula ospite ed è suscettibile ai meccanismi regolatori di questa. In questo contesto, i miRNA cellulari potrebbero avere un ruolo importante nell'infezione, riconoscendo diversi *target* virali e inibendone l'espressione genica. Recenti lavori hanno evidenziato in cellule linfocitarie infette da HIV-1 la *down*-regolazione di un gruppo di miRNA, mentre altri dimostrano che miRNA possono anche contribuire alla latenza virale, inibendo la produzione dell'HIV in cellule T CD4+ *resting*. Scopo di questo progetto sarà approfondire la distribuzione e la funzione di specifici miRNA nelle principali cellule bersaglio del virus dell'HIV-1, linfociti e macrofagi, in presenza del genoma virale e di studiare i meccanismi molecolari che sono alla base della loro espressione.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio si propone, in un primo momento, di analizzare i linfociti T CD4+ quiescenti e attivati dal punto di vista dei diversi miRNA espressi: quest'analisi si effettuerà su RNA totali estratti da tali cellule e sottoposti a *real time* PCR per specifici miRNA.

Una volta individuati quelli espressi in maniera più significativa, si procederà ad analizzare la loro espressione ed eventuale modulazione in linfociti CD4+ normali e sottoposti ad infezione da HIV-1, a tempi diversi di infezione. Ogni campione sarà analizzato per *real time* PCR specifica, per *Northern blot*, che confermi i dati di PCR, e con esperimenti di *Western blot* su lisati proteici totali.

Questi ultimi serviranno per valutare la modulazione dell'espressione sia di proteine che rappresentano *target* di specifici miRNA, sia di fattori di trascrizione coinvolti nell'induzione o nell'inibizione degli stessi miRNA. In particolare, valuteremo l'espressione del miR 146a che in altri sistemi è stato dimostrato bloccare la traduzione di CXCR4, recettore di SDF-1 e co-recettore dell'HIV-1, studiando i suoi effetti sulla replicazione del virus.

Trasferibilità dei risultati

L'altissima capacità di mutazione del virus dell'HIV-1 è la principale ragione per cui le terapie antiretrovirali non sono in grado di eradicare definitivamente il virus dalla popolazione infetta.

In questo contesto, i miRNA rappresentano uno strumento promettente per risolvere il problema dell'alto grado di mutazioni, poiché richiedono solo una parziale complementarità per ottenere il silenziamento di un gene. L'idea che emerge dai dati in letteratura è che l'aumento dell'espressione di miRNA cellulari anti virali possa costituire una strategia adatta nello sviluppo di terapie anti-HIV-1.

Studio del polimorfismo della regione regolatrice della catena pesante delle Immunoglobuline HS1,2 in soggetti HIV-positivi africani: implicazione per la patogenesi dell'infezione da HIV/AIDS

L'*enhancer* HS1,2 umano della catena pesante (H) delle Immunoglobuline (Ig) svolge un ruolo essenziale nella produzione e nella maturazione delle Ig. L'HS1,2, che fa parte di un complesso di regolazione (IgH3'EC-1) costituito da *enhancer* diversi, è polimorfico e la frequenza di espressione dei quattro alleli fino ad ora identificati è legata all'etnia. In alcune popolazioni africane è stata osservata in particolare, una bassa frequenza dell'allele HS1,2-A*2, che sembra essere correlato a patologie di tipo immune.

Nell'infezione da HIV è nota l'importanza della risposta immune di tipo umorale diretta contro antigeni diversi del virus nel controllo della progressione della malattia. Poiché in popolazioni dei Paesi in via di sviluppo l'infezione da HIV ha un decorso caratterizzato da una progressione più rapida della malattia, con caratteristiche spesso più severa di quanto si osservino nei pazienti HIV-positivi dei Paesi sviluppati, questo studio si propone di investigare il polimorfismo dell'HS1,2 in popolazioni HIV-positive provenienti dal Sudafrica e dallo Swaziland a diversi stadi della malattia e di valutare possibili correlazioni fra l'infezione da HIV/AIDS e l'espressione di specifici alleli HS1,2.

Risultati attesi nel triennio

Da questo studio si otterranno informazioni nuove riguardanti sia la caratterizzazione del polimorfismo della regione regolatoria HS1,2 della catena H delle Ig in individui africani dello Swaziland e del Sudafrica, sia l'identificazione di potenziali correlati di protezione attraverso l'analisi delle frequenze di alleli specifici e delle caratteristiche della risposta immune di tipo umorale in pazienti HIV-positivi a diversi stadi della malattia.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti nel corso di questo studio, aumenteranno la conoscenza dei meccanismi patogenetici che si associano all'infezione da HIV/AIDS e potranno evidenziare nuovi possibili correlati di protezione dall'infezione. Questo studio è quindi di importanza rilevante nella

pianificazione e nell'ottimizzazione di strategie di controllo dell'infezione che includano anche la messa a punto di nuovi approcci vaccinali contro l'HIV/AIDS.

Studio del ruolo della proteina Nef di HIV-1 nello sviluppo del neuro-AIDS

La demenza HIV-associata (HAD), è una neuropatologia caratterizzata da disfunzioni comportamentali, motorie e cognitive che si riscontra nel 20-30% dei pazienti affetti da AIDS. L'infezione produttiva da HIV nel CNS ha luogo prevalentemente nei macrofagi infiltrati e nelle cellule microgliali. Si ritiene che il virus determini profondi cambiamenti morfologici e metabolici della barriera emato/encefalica (BBB) e che tali fenomeni siano causati sia da citochine e sostanze tossiche rilasciate da cellule infette che da prodotti di origine virale. Esperimenti condotti nei nostri laboratori indicano che macrofagi infetti con HIV sono in grado di indurre astrociti a rilasciare citochine infiammatorie in modo Nef dipendente. Lo scopo della presente attività di ricerca è di caratterizzare tale fenomeno nonché di studiare gli effetti di tale disregolazione sull'integrità e permeabilità della BBB e sulla funzionalità e vitalità dei neuroni.

Risultati attesi nel triennio

Gli obiettivi del progetto sono i seguenti:

- Studio dei meccanismi che inducono l'attivazione dei geni di citochine infiammatorie in astrociti co-cultivati con macrofagi infetti. A tal proposito ci proponiamo di caratterizzare le cascate di signaling attivate negli astrociti dai macrofagi infetti;
- Studio degli effetti indotti da macrofagi infetti sulle cellule endoteliali con particolare attenzione al ruolo di Nef. A tal proposito ci aspettiamo che lo spettro di citochine rilasciate dagli astrociti in risposta alla cocultura con macrofagi infetti possa alterare la funzionalità e la vitalità delle cellule endoteliali che sono i componenti fondamentali della BBB;
- Studio dei meccanismi che regolano la migrazione di macrofagi e linfociti attraverso la BBB in condizioni infiammatorie indotte da HIV-1. Ci aspettiamo che l'alterata permeabilità della BBB possa causare la migrazione di cellule bersaglio di HIV in modo da alimentare lo stato infiammatorio indotto dall'infezione;
- Studio degli effetti della disregolazione degli astrociti su HIV sui neuroni. Ci aspettiamo che l'alterazione della funzionalità degli astrociti influenzi profondamente la vitalità dei neuroni.

Trasferibilità dei risultati

La terapia HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*) ha migliorato le funzioni motorie e cognitive dei pazienti affetti da demenza HIV-associata, tuttavia non è in grado di eradicare o prevenire il suo sviluppo nei pazienti sieropositivi non affetti da HAD. La migliore aspettativa di vita dei pazienti nell'era HAART rende più probabile l'insorgenza di complicazioni neurologiche. Inoltre, studi di settore indicano che i costi associati alle cure si raddoppiano nei pazienti sieropositivi affetti da neuro-AIDS.

La comprensione dei meccanismi responsabili della neuro-infiammazione e dell'insorgenza del neuro-AIDS potrebbero contribuire all'individuazione di nuovi bersagli farmacologici e di possibili marcatori di rischio per l'evoluzione della demenza. Infine, poiché i farmaci antiretrovirali hanno una scarsa accessibilità al CNS, è di primaria importanza comprendere i meccanismi che regolano la permeabilità della BBB al fine di migliorare il trasferimento dei farmaci al CNS.

Studio dell'interazione virus-ospite: analisi di una linea di macaco esprimente bassi livelli di TRIM5- α cronicamente infetta da HIV-1.

Nelle cellule di mammifero esistono fattori innati antivirali che prevengono la replicazione dei retrovirus. Tra questi è stato dimostrato che il TRIM5- α blocca l'infezione di HIV-1 in cellule di scimmia di macaco. In un recente studio abbiamo dimostrato che una linea B linfoblastoide (F6) di *Macaca fascicularis* stabilizzata *in vitro*, può essere produttivamente infettata a bassa molteplicità d'infezione con l'HIV-1 T-tropico adattato in laboratorio. In questo contesto è importante evidenziare che l'infezione acuta delle cellule F6 ha dato origine ad una linea cronicamente infetta con il ceppo HXBc2, un evento mai descritto precedentemente in letteratura. Dati preliminari, indicano, che nelle cellule F6 il fattore di restrizione TRIM5 α è espresso a bassi livelli.

Risultati attesi nel triennio

Ci si propone quindi di: i) analizzare il tropismo del virus prodotto dalle cellule F6 cronicamente infette, ii) analizzare a livello molecolare il genoma e le proteine virali, iii) studiare il virus a livello ultrastrutturale.

Trasferibilità dei risultati

Esiste un'urgente necessità di nuovi farmaci e nuove approcci preventivi e terapeutici contro HIV/AIDS. Lo studio del ruolo della proteina TRIM5 α nella suscettibilità dei primati all'infezione da HIV-1, particolarmente in relazione all'interazione con il genoma virale, aprirà nuove prospettive per l'identificazione di novi target terapeutici e nuovi approcci vaccinali. In questo contesto può essere inserito lo studio dell'interazione delle cellule F6 con l'HIV-1.

Studio dell'immunità nativa e adattativa in risposta ad antigeni di HIV/SIV

Abbiamo recentemente dimostrato che la proteina Tat biologicamente attiva promuove la maturazione e l'attivazione delle cellule dendritiche di origine monocitaria e ne potenzia l'attività di presentazione dell'antigene, come dimostrato *in vitro* con saggi di valutazione della risposta allogeneica o ad antigeni di richiamo. Abbiamo inoltre dimostrato che Tat lega Env formando un nuovo complesso di entrata per il virus. È stato inoltre riportato che anche la proteina Nef di HIV-1 ha effetti immunomodulatori/disregolatori. Questi dati hanno grande rilevanza in due ambiti. Da un lato, per la comprensione della patogenesi virale, in quanto Tat e Nef sono espresse molto precocemente nel corso dell'infezione e, pertanto, potrebbero deviare sia la risposta naturale che quella acquisita in una direzione favorevole per il virus. In vaccinologia, perché costituiscono la prima dimostrazione, nell'ambito della ricerca per lo sviluppo di un vaccino contro l'HIV/AIDS, che un antigene virale possiede molteplici attività immunoregolatorie e che pertanto possa funzionare anche come adiuvante. 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 in dettaglio i vari aspetti della risposta immune a queste proteine regolatorie di HIV-1, e all'HIV in generale, *in vitro* ed *ex vivo*, in vari modelli animali e nei soggetti vaccinati.

Risultati attesi nel triennio

Allo scopo di ottenere informazioni rilevanti dagli studi di patogenesi e di vaccinazione sarà necessario continuare a sviluppare e standardizzare una molteplicità di metodiche atte a misurare parametri di immunità naturale e acquisita, sia a livello sistemico che mucosale. In particolare, mediante l'impiego di *microarray* per l'analisi del trascrittoma stanno emergendo dati relativi agli effetti di Tat sul trascrittoma di cellule T CD8 stimulate con peptidi Tat che aiuteranno a definire le modalità e gli effetti di questa adjuvanza a livello di immunità naturale (citochine infiammatorie e soppressore, chemochine, fattori anti- e pro-apoptotici, IFN e

proteine del ciclo cellulare, ecc.) e adattativa. Un approccio simile verrà utilizzato con i PBMC di scimmie vaccinate o non con Tat, prima e dopo *challenge*. Continuerà la determinazione 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. Infine, continuerà l'allestimento e la validazione di nuovi saggi immunologici ivi inclusi attività ADCC, 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.

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 (*Multiply Exposed Uninfected, MEU*) e in pazienti non progressori (*Long Term Non Progressor, LTNP*) diretto ad identificare correlati di protezione immunologica

Lo studio, già avviato, prosegue mirando all'identificazione di correlati di protezione immunologica in corso di infezione e/o esposizione naturale all'HIV, poiché esso rappresenta un aspetto chiave nel processo di sviluppo di un vaccino contro l'HIV/AIDS. Gli individui sieronegativi ripetutamente esposti all'infezione (*Multiply Exposed Uninfected, MEU*) rappresentano un modello naturale di resistenza all'infezione da HIV. D'altra parte, individui sieropositivi non progressori (*Long Term Non Progressor, LTNP*), una piccola frazione (1-2%) di 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.

Gli studi avviati in pazienti LTNP e in individui MEU sono diretti ad esplorare e possibilmente identificare meccanismi e/o correlati di protezione immunologica naturale e antigene-specifica, diretti sia contro prodotti di geni regolatori che strutturali dello HIV-1.

Dal complesso degli studi sin qui condotti emerge una significativa correlazione tra la presenza di una risposta immune contro la proteina Tat dell'HIV e la non progressione della malattia, e tale relazione è altamente significativa proprio in relazione allo *status* clinico di LTNP. I risultati di questi studi potranno contribuire ad ottimizzare i nuovi *target* vaccinali e indirizzare più miratamente gli interventi di tipo immuno-terapeutico in soggetti già infettati. Tali studi proseguono in cooperazione con l'Istituto San Gallicano (IFO), nell'ambito di una convenzione ISS/IFO specificamente dedicata allo 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 ecc.) 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 dello HIV-1.

Studio sui fattori associati alla resistenza alla trasmissione di HIV-1 in coppie discordanti per l'infezione

L'infezione da HIV-1 nei Paesi in via di sviluppo ha raggiunto elevati livelli di prevalenza, soprattutto nell'Africa subsahariana dove la sua diffusione è favorita dalla mancanza di strategie preventive e dalla scarsa disponibilità di terapie antivirali. In particolare le popolazioni più giovani sono a maggior rischio di contrarre l'infezione a causa dell'assenza di un'efficace informazione sulle modalità di trasmissione del virus. La suscettibilità all'infezione virale è determinata dalle caratteristiche dell'isolato virale e da fattori individuali associati con la risposta immune innata e acquisita. Scopo del presente studio è la caratterizzazione dei fattori che determinano la resistenza o la suscettibilità alla trasmissione eterosessuale di HIV-1 in coppie discordanti per la sieropositività ad HIV-1. A tale scopo, campioni di siero e cellule saranno raccolti da un'adeguata casistica di coppie HIV-discordanti provenienti dalla provincia del Gauteng in Sudafrica allo scopo di valutare le caratteristiche del sottotipo virale infettante, la risposta anticorpale contro gli antigeni virali inclusa la siero-neutralizzazione e la risposta cellulo-mediata HIV-specifica. Saranno inoltre effettuati saggi per l'immunità innata, l'analisi dell'aplotipo HLA e indagini genetiche per valutare la predisposizione individuale all'infezione virale. Il ruolo specifico di questi fattori nel determinare la resistenza all'infezione virale sarà valutato mediante un'adeguata analisi statistica.

Risultati attesi nel triennio

L'obiettivo principale del progetto è lo studio dei fattori associati alla trasmissione eterosessuale di HIV-1 in aree del Sudafrica ad alta prevalenza di infezione. A questo scopo saranno raccolti campioni di siero e di cellule ematiche da coppie sudafricane HIV sierodiscordanti per valutare il ruolo del sottotipo virale e dell'immunità innata e specifica nel determinare la resistenza e la suscettibilità alla trasmissione virale. È verosimile che, nell'ambito della casistica dello studio, verranno riscontrati ceppi virali con peculiari e differenti caratteristiche di infettività, sia pure principalmente appartenenti al sottotipo C prevalente in queste regioni. Sarà interessante valutare se nei soggetti protetti dall'infezione sia riscontrabile la presenza di una risposta immune verso specifici antigeni da HIV-1, come già documentato in casistiche di soggetti esposti sieronegativi, e se meccanismi di immunità innata non antigene-specifica possano giocare un ruolo primario nella resistenza all'infezione.

Trasferibilità dei risultati

Attualmente la trasmissione eterosessuale rappresenta la principale modalità di diffusione dell'infezione da HIV-1 nelle regioni dell'Africa subsahariana, soprattutto tra i giovani. Poiché alcuni partner di soggetti infetti non acquisiscono l'infezione negli anni, esistono dei fattori virali o individuali di protezione. La caratterizzazione di questi fattori risulta di notevole importanza per approfondire le conoscenze sulle modalità di trasmissione virale allo scopo di sviluppare vaccini in grado di indurre un'efficiente risposta immunitaria preventiva contro l'infezione da HIV-1. Per tale ragione, le informazioni che saranno acquisite nel presente progetto avranno rilevanza nei programmi di controllo dell'epidemia da HIV-1 a livello locale e in altre regioni con alta prevalenza virale.

Sviluppo di vaccini a *delivery* mucosale per Tat e Delta-V2 Env di HIV-1

I risultati di *trial* preclinici ottenuti nell'ambito di progetti europei AVIP e MUVAPRED indicano che scimmie immunizzate con Tat e Delta-V2 Env somministrati in combinazione per via sistemica o mucosale sviluppano una immunità protettiva al *challenge* mucosale con virus chimerico SIV/HIV SHIVSF162P4AH595 CCR5-tropico. In particolare, anticorpi *cross-neutralizzanti* vengono indotti più precocemente e a i titoli più elevati dai due antigeni somministrati in combinazione rispetto agli antigeni utilizzati singolarmente. In questo contesto, la somministrazione per via intranasale dei due antigeni combinati ha indotto risposte immuni in grado di contenere la disseminazione del virus inoculato per via intrarettale, bloccandone la diffusione ai linfonodi. Nel loro insieme, questi dati indicano che vaccini basati su Tat e Delta-V2 Env somministrati in combinazione sono superiori a vaccini costituiti dai singoli antigeni. Nostri studi recenti indicano, infatti, che Tat e Delta-V2 Env formano un complesso di entrata che aumenta l'infettività di HIV.

Risultati attesi nel triennio

All'interno del progetto europeo MATVAX (proposto per il finanziamento alla Comunità Europea) e nell'ambito di una collaborazione con Novartis verrà valutata l'efficacia protettiva della vaccinazione con Tat e Delta-V2 Env espressi tramite vettori VEE/SIN amministrati per via mucosale. Il vaccino verrà testato in protocolli preventivi e/o terapeutici nel modello della *Macaca fascicularis*. I vettori VEE/SIN sono costituiti da alfavirus chimerici ricombinanti contenenti genomi non completi del virus della encefalite equina venezuelana e dello *Sindbis* virus, e rappresentano un sistema ideale per il *delivery* di antigeni vaccinali in quanto non presentano tossicità, non inducono significative risposte antivettore, ed evocano potenti risposte immuni umorali e cellulari. Riteniamo che la somministrazione per via mucosale di Tat e Delta-V2 Env veicolati da vettori VEE/SIN rappresenti un sistema più efficiente rispetto ad altre modalità di vaccinazione per indurre una immunità mucosale protettiva contro HIV.

Trasferibilità dei risultati

Questi studi contribuiranno ad allestire strategie vaccinali innovative contro HIV/AIDS mediante il *testing* del vaccino Tat/Env con vettori ottimizzati per il *delivery* mucosale di antigeni. L'utilizzo di primati non umani filogeneticamente vicini all'uomo, l'innocuità e immunogenicità dei vettori osservata nei modelli animali fino ad ora impiegati assicurano un veloce trasferimento del vaccino alla sperimentazione umana.

Sviluppo e standardizzazione di tecniche e saggi diagnostici e preparazione di Procedure Operative Standardizzate (SOP) per la sperimentazione di candidati vaccinali in modelli animali e 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 Procedure Operative Standardizzate (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 ed 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 procedure Operative Standard (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 immuna 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.

Sviluppo nel modello preclinico di SIV-*macaca fascicularis* di un vaccino multiproteico contro HIV/AIDS nell'individuo adulto e in età pediatrica

I risultati di precedenti *trial* preclinici da noi ottenuti, hanno indicato che l'efficacia di un approccio vaccinale contro HIV/AIDS è il risultato di risposte dell'immunità sia naturale che adottiva (umorale e cellulare) indotte da una combinazione di antigeni strutturali (Gag, Pol, Env) e regolatori (Rev, Tat, Nef). In un precedente progetto, sponsorizzato dalla Comunità Europea (EU *grant* :ENVEP: QLK2-99-00871), abbiamo dimostrato che una combinazione di vettori (plasmidici e virali) esprimenti geni strutturali (Gag, Pol, Env) e regolatori (Rev, Tat, Nef) di SIV ha indotto risposte immuni cellulari capaci di abrogare nelle scimmie vaccinate la replicazione virale sia a livello sistemico che linfoide dopo *challenge* mucosale con SIVmac251 (Negri D, 2004; Michelini Z, 2004; Maggiorella, 2007) in assenza di anticorpi neutralizzanti. Inoltre, la osservata protezione non dipende dal background genetico dell'ospite

(Mee E, 2009). I risultati ottenuti sottolineano: i) l'efficacia protettiva di un vaccino contenente un ampio spettro di antigeni virali, ii) l'importanza del sistema di *delivery* basato sulla combinazione tripla di vettori che evitano risposte anti-vettore, iii) la capacità protettiva di un vaccino dato per via sistemica verso un *challenge* dato per via mucosale. Ciononostante, riteniamo sia possibile raggiungere una protezione "sterilizzante" poiché abbiamo individuato nel descritto approccio vaccinale due punti potenzialmente deboli: i) *priming* insufficiente da parte dei vettori pDNA dati per via intradermica e ii) insufficiente processamento del transgene da parte delle cellule dendritiche (DC).

Risultati attesi nel triennio

Come continuazione del precedente lavoro, intendiamo retrospettivamente analizzare i potenziali correlati di protezione sia cellulari che umorali (*microarray* genomici, ADCC, ADCVI, fattori antivirali).

Inoltre, al fine di migliorare la immunogenicità (umorale e cellulare) e quindi aumentare l'efficacia protettiva del vaccino multiproteico sia nell'individuo adulto e in età pediatrica, l'idea è di: i) targettare specificatamente l'espressione di antigeni vaccinali in cellule dendritiche utilizzando vettori pDNA codon-ottimizzati (cd-pDNA) esprimenti antigeni di SIV sotto il controllo del promotore della fascia (specifico per cellule dendritiche); ii) co-somministrazione di citochina adiuvante IL-15.

Tale obiettivo sarà perseguito attraverso l'espletamento delle seguenti attività: i) generazione di pDNA contenenti geni *codon optimised* esprimenti proteine di SIV (primo anno); ii) valutazione immunogenicità dei cd-pDNA nei topi in presenza ed assenza di IL-15 (primo anno); iii) valutazione dell'immunogenicità nei topi di una strategia di immunizzazione *prime-boost* con cd-pDNA/SIV, seguito da inoculi con SFV/SIV e MVA/SIV (vettori ricombinanti virali già disponibili dal *Programme EVA Centre for AIDS Reagents* (Potters Bar, UK) in presenza di IL-15 (primo anno); iv) se i risultati attesi saranno confermati, si procederà alla sperimentazione nel modello di SIV-macaca fascicularis al fine di valutare immunogenicità (secondo anno) ed efficacia (terzo anno).

Trasferibilità dei risultati

Per la vicinanza filogenetica con l'uomo, il primate non umano rappresenta ad oggi il migliore modello preclinico per verificare l'immunogenicità ed efficacia protettiva di un vaccino contro HIV/AIDS. Pertanto un vaccino che si dimostri efficace in tale modello può essere con facilità trasferito per la sua applicazione all'uomo

Tat, Nef, Env di HIV-1 bersagli di studi patogenetici e vaccinali nel modello del primate non umano

Nonostante la grande mole di lavoro sulla identificazione di approcci vaccinali efficaci contro HIV/AIDS, in modelli preclinici, tuttavia i risultati non sono ancora soddisfacenti. 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 preventivi o terapeutici 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. È stato descritto che

varianti con modificazioni in Env (es. in V1/V2) sono particolarmente suscettibili alla neutralizzazione. Nell'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*. Dunque al fine di poter verificare l'efficacia vaccinale nei modelli preclinici, è necessario procedere al *challenge* con un ceppo virale non eterogeneo e altamente sensibile alla neutralizzazione.

Risultati attesi nel triennio

Sulla base di queste considerazioni ci proponiamo di:

- Valutare in modelli mucosali (enterociti, cellule endometriali, culture primarie di cordone ombelicale, cellule epiteliali vaginali) *in vitro* il ruolo di Tat e di Nef di HIV-1: i) nell'aumentare l'efficienza dell'infezione; ii) nel modulare il tropismo virale. Inoltre, i supernatanti di rilasciati cellule trattate con Tat e Nef o infettate con HIV saranno utilizzati per determinare il loro effetto su DC, e la presenza di fattori solubili antivirali.
- 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). A brevi intervalli dall'esposizione virale, le scimmie saranno sacrificate e si determinerà: i) la carica virale sistemica e tissutale, ii) gli effetti disregolativi delle risposte immuni sia in tessuti locali che distali tramite tecniche immunoistochimiche e di patologia molecolare, iii) la presenza di varianti virali.
- Costruzione di virus chimerici SIV/HIV contenenti delezioni/modificazioni nella regione V1/V2 di Env. Queste varianti saranno caratterizzate *in vitro* di in termini di infettività su linee T stabilizzate e su colture primarie di linfociti depleti di cellule CD8+ e studio della loro suscettibilità alla neutralizzazione (pseudovirus).
- 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 vicini 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 settembre 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 confacenti 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 dispositivi medici 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 ottobre 2000 e al DM del 25 gennaio 2001, vengono effettuate le valutazioni sperimentali e tecniche per l'autorizzazione alla commercializzazione per i kit da applicare per il rilevamento di acido nucleico virale con metodi di amplificazione.

**Centro Nazionale
Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute**

Attività di ricerca

AdCare (Malattia di Alzheimer e Antipsicotici: una sperimentazione clinica multicentrica)

Lo studio è un progetto di ricerca, finanziato dall'AIFA nell'ambito della ricerca indipendente.

È un progetto non finalizzato alla commercializzazione di nuovi farmaci, ma al miglioramento dell'assistenza sanitaria. AdCare è uno studio clinico multicentrico di fase IV, randomizzato, a gruppi paralleli con gruppo placebo, in doppio cieco.

Allo studio partecipano 20 Unità Valutative Alzheimer accreditate, presenti in 13 Regioni del territorio nazionale. Obiettivo dello studio è aumentare le conoscenze circa la malattia di Alzheimer per migliorare la cura delle persone che ne sono affette. Si propone in particolare di valutare l'efficacia e la tollerabilità di quattro antipsicotici già in commercio.

I pazienti (1.000) saranno randomizzati, in condizioni di cecità, a ricevere risperidone, olanzapina, quetiapina, aloperidolo o placebo in una proporzione di 2:2:2:2:3. L'organizzazione dello studio AdCare cercherà di avvicinarsi il più possibile alla pratica clinica quotidiana. Ai medici sarà permesso di usare dosi flessibili dei farmaci in studio sulla base del loro giudizio clinico e delle risposte dei pazienti. L'efficacia dei farmaci antipsicotici sarà valutata nel corso di 12 mesi su due misure di esito: uno orientato al miglioramento funzionale/globale, e un secondo indirizzato ai cambiamenti comportamentali. Gli strumenti di valutazione che saranno utilizzati in AdCare per valutare gli effetti clinici sono quelli solitamente adottati nella pratica clinica corrente.

Risultati attesi nel triennio

La definizione del profilo beneficio/rischio dei farmaci antipsicotici è di grande rilevanza poiché il trattamento farmacologico della psicosi, agitazione e aggressività nei malati di Alzheimer ha gravi implicazioni per i pazienti, *caregivers* e medici. Lo studio AdCare è progettato per fornire informazioni utili per le Agenzie Regolatorie, poiché l'indicazione d'uso nei pazienti con demenza non è approvata per la maggior parte degli antipsicotici.

Trasferibilità dei risultati

La rilevanza dello studio per l'SSN è sostanziale, considerando il grande numero di pazienti con demenza in corso di trattamento con farmaci antipsicotici in Italia (circa 300.000). Infine, allo stato attuale AdCare non si sovrappone con altre analoghe sperimentazioni in corso.

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

Le azioni e gli obiettivi sono principalmente dedicati alla attuazione delle iniziative, delle progettualità, delle specifiche linee di ricerca e di formazione già attive nel Reparto Salute della popolazione e suoi determinanti e relative ai progetti internazionali, europei e nazionali:

- *WHO Collaborating Centre for Research and Health Promotion on Alcohol and Alcohol-related Problems*
- Progetto VINTAGE
- Progetto AMPHORA
- Progetto PHEPA2 – *Integrating health promotion interventions for hazardous and harmful alcohol consumption into primary health care professionals' daily work, Public Health Programme. EU Public Health Programme.*
- *Alcohol Policy Network in the context of a larger Europe. European Commission*
- INEBRIA Network
- Osservatorio Nazionale Alcol – CNESPS

– Corsi di formazione IPIB

Le attività sono orientate alla produzione di dati epidemiologici, evidenze scientifiche e di strumenti utili all'identificazione precoce dell'alcoldipendenza e alla realizzazione di interventi di prevenzione dei problemi alcol-correlati. I risultati delle attività e l'attiva rete di collaborazioni assicurano un'*expertise* dedicata ai gruppi formali e informali di lavoro definiti a livello internazionale, europeo e nazionale e provvede all'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>). Tutte le attività progettuali sono oggetto di aggiornamento e disseminazione continua sui siti europei riportati di seguito.

Il Centro della WHO per la Ricerca e la Promozione della Salute su Alcol e Problematiche Alcolcorrelate (<http://www.iss.it/chis/coms/cont.php?id=115&lang=1&tipo=19>) svolge su mandato governativo il ruolo formale di *focal point* di raccordo, rispettivamente nazionale e internazionale-europeo, riguardo alle tematiche alcolcorrelate, epidemiologiche e di salute pubblica, da privilegiare attraverso la ricerca, la programmazione, l'implementazione e la valutazione dei programmi, dei progetti, delle ricerche e delle iniziative che il piano di lavoro formale identifica in attività:

- di comunicazione, informazione e sensibilizzazione
- di formazione,
- di prevenzione
- di promozione della salute

che possono contribuire a ridurre il carico di malattia, disabilità e di mortalità evitabile derivante dall'uso inadeguato e dall'abuso di alcol. Tali attività sono e saranno svolte attraverso il personale e le risorse dell'Osservatorio Nazionale Alcol e del Reparto Salute della popolazione del CNESPS e in stretta collaborazione con la Società Italiana di Alcologia e il Centro Alcologico Regionale della Toscana, CAR.

Le attività salienti del Centro possono essere sommariamente identificabili in:

- produzione delle evidenze scientifiche finalizzate alla definizione e disseminazione delle linee guida cliniche per l'integrazione di 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);
- il monitoraggio per indicatori garantito 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>).

L'Osservatorio Nazionale Alcol – CNESPS, attivo dal 1999, è l'articolazione nazionale del Centro Collaboratore della WHO per la Ricerca e la Promozione della Salute sull'Alcol ed è l'organismo ufficiale ISS che si occupa di alcol. Contribuisce alle Relazioni annuali al Parlamento relative alla legge 125/2001, elabora e pubblica sul sito web (www.epicentro.iss.it/alcol/alcol.asp) aggiornamenti periodici originali sui dati epidemiologici e sui risultati dei progetti attuati nell'ISS e sulle Indagini Multiscopo ISTAT attraverso un'attiva e costante collaborazione con il Ministero della Salute che finanzia il Telefono Verde Alcol (800 63 2000) con funzioni di servizio al cittadino. L'Osservatorio organizza annualmente l'*Alcohol Prevention Day* e fornisce consulenza tecnico-scientifica al Ministero della Salute, alle Regioni,

alle ASL con cui collabora alla realizzazione di campagne e di iniziative di promozione della salute attraverso i finanziamenti previsti dalla Legge 125/2001.

Nel prossimo triennio l'Osservatorio Nazionale Alcol del CNESPS continuerà a partecipare alla predisposizione, nell'ambito delle Relazioni sulla sanità pubblica identificate come prioritarie dalla Commissione, delle relazioni sottese alla produzione di Raccomandazioni o Conclusioni del Consiglio e delle Comunicazioni della Commissione al Parlamento UE. Le attività svolte saranno oggetto di regolare pubblicazione alla pagina http://europa.eu.int/comm/health/ph_determinants/life_style/alcohol_en.htm e si avvarranno della collaborazione formale del Centro alcolico regionale della Toscana, CAR e della Società Italiana di Alcolologia, SIA.

Saranno disseminate attraverso la Commissione Europea le relazioni prodotte dal WHO CC e dall'Osservatorio Nazionale Alcol per le programmate Conferenze europee sull'alcol già programmate e che produrranno materiali ed evidenze come quelle già disseminate in occasione dell'*European Conference on Alcohol di Helsinki* (oggi disponibili al sito http://btg.health.fi/?i=111384&s=5&v=11&name=Alcohol_health_policies_italian_Scafato_emanuele-ppt.pdf.) e della Conferenza Europea sull'Alcol del 3-5 aprile 2008 di Barcellona (http://www.dss3a.com/btg/pdf/Parallels/Fri_mor/emanuele_scafato_fri_mor_strand8.pdf).

Saranno prodotte le pubblicazioni delle elaborazioni epidemiologiche richieste per la Relazione al Parlamento (Legge 125/2001) e i *report* dell'Osservatorio Nazionale Alcol per le attività formali di monitoraggio nazionali, della Commissione Europea e del *WHO Global Alcohol Survey* oltre ai *working report* dei progetti AMPHORA, VINTAGE, PHEPA2, INEBRIA sulla cui base si potranno riaggiornare le *Clinical Guidelines on Alcohol* e gli standard di formazione IPIB per i corsi ECM da svolgere presso l'ISS. Proseguirà la collaborazione con la Consulta Nazionale Alcol e con la Consulta Nazionale Tossicodipendenze e il Dipartimento Politiche Antidroga.

Risultati attesi nel triennio

- 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 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.

Ambiente Progetto Strategico – Ricerca Finalizzata 2006

L'Ufficio di Statistica fa parte come Unità Operativa "Indicatori di salute nei Siti Inquinati" del Programma Strategico Ambiente e Salute in cui vengono condotti, in collaborazione con il Dipartimento di AMPP dell'ISS, studi sulla mortalità osservata in aree soggette a bonifica ambientale.

Il programma di ricerca "Impatto sanitario associato alla residenza in siti inquinati, in territori interessati da impianti di smaltimento/incenerimento rifiuti e alla esposizione ad inquinamento atmosferico in aree urbane: valutazione dell'esposizione, indagini epidemiologica, priorità per la prevenzione" riguarda tre principali ambiti tematici:

- Gli effetti sulla salute di esposizioni concentrate in prossimità di particolari insediamenti produttivi, energetici o del ciclo dei rifiuti, o più in generale, nelle aree a rischio ambientale e nei siti di interesse nazionale per le bonifiche, con riferimento alla popolazione ivi residente.
- Gli effetti sulla salute dell'inquinamento atmosferico e la possibile interazione con le ondate di calore.
- L'approfondimento delle conoscenze sulle relazioni fra condizioni meteorologiche e salute.

Gli studi proposti produrranno nuovi elementi conoscitivi utilizzabili nei processi decisionali della sanità pubblica, in particolare l'individuazione delle priorità per l'allocatione delle risorse destinate alla prevenzione e al risanamento ambientale. Si è scelto di selezionare un numero di obiettivi ben definiti, con valore di modelli potenzialmente trasferibili anche in contesti diversi da quelli di origine, e in riferimento particolare alle strutture del SSN.

L'unitarietà del programma poggia in particolare sulle seguenti nozioni.

- Approccio multidisciplinare ai problemi.
- Attivazione di reti di collaborazione fra enti di ricerca e strutture regionali o locali con competenze istituzionali nelle materie in esame.
- Costruzione di percorsi che tengano conto degli indirizzi internazionali e comunitari su queste materie.

La nostra Unità Operativa si inserisce appieno in questo approccio multi-disciplinari e fornisce il suo precioso contributo statistico-epidemiologico.

Risultati attesi nel triennio

Analisi della mortalità specifica per causa in tutti i comuni afferenti ai siti di interesse nazionale per la bonifica selezionati per il Progetto; l'analisi riguarda il periodo che va dal 1995 al 2002. Alcuni di questi siti coincidono peraltro con le aree ad elevato rischio di crisi ambientale che sono state oggetto di una precedente indagine di mortalità svolta dalla WHO e relativa al periodo 1990-94. In tal modo si aggiorna in continuità un panorama dettagliato in termini di mortalità.

Trasferibilità dei risultati

I risultati prodotti, basati su una rigorosa metodologia di analisi dei dati di mortalità, saranno la base di tutta una serie di focus su temi specifici di epidemiologia ambientale relativi ai siti di interesse nazionale per la bonifica.

Aspetti psicosociali di patologie somatiche

Questa linea di ricerca include studi sia trasversali che longitudinali su popolazioni di pazienti affetti da varie patologie somatiche quali epilessia resistente al trattamento farmacologico, infezione da HIV, tumori maligni.

Le principali variabili psicosociali oggetto di studio sono i sintomi psicopatologici con particolare riguardo al livello di depressione e di ansia, la personalità generale, le capacità di regolazione emozionale, la sicurezza nelle relazioni interpersonali strette.

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.

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.

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 contiene freezer a -30°C e a -80°C in cui sono conservati campioni di siero, 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. Campioni di urine vengono conservati a -30°C . Attualmente nella banca sono conservati campioni appartenenti a circa 15.000 persone esaminate 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. 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; dal punto di vista dell'archiviazione dei campioni biologici verrà valutata la sperimentazione tramite il software applicativo ATIM (*Advanced TIssue Management*) del *Canadian Tumor Repository NETWORK* (CTRNET). La banca fa parte del network *Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure* dell'Unione Europea (BBMRI).

Risultati attesi nel triennio

La banca verrà ampliata con l'acquisto di un nuovo contenitore di azoto liquido e di unità di freezer a -80°C. Dal punto di vista tecnico verranno mantenute le condizioni migliori per il buon funzionamento. Verranno resi disponibili i campioni biologici di sangue intero recentemente trasferiti dall'Università di Pavia appartenenti all'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare 1998-2002. Sarà disponibile un software per l'archiviazione dei campioni biologici di tutti gli studi che afferiscono alla banca biologica del CNESPS.

Trasferibilità dei risultati

Disponibilità di campioni biologici per studi caso-controllo annidati nella coorte (*nested case-control studies*). 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.

Buone pratiche sull'alimentazione: valutazione del contenuto di sodio, potassio e iodio nella dieta degli italiani (MINISAL-GIRCSI) – UO ISS

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. Al momento, non sono disponibili dati provenienti da indagini epidemiologiche del consumo alimentare medio di sale su campioni rappresentativi di popolazione italiana su base regionale e per fasce di età.

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

L'unità operativa affidata al Reparto di Epidemiologia delle malattie cardio e cerebrovascolari al fine di 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, si occuperà di: selezionare un campione di individui sufficientemente rappresentativo della popolazione italiana di età compresa tra i 35 e i 79 anni, su base regionale (o almeno macro-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); ottenere da ciascun individuo una raccolta standardizzata delle urine delle 24 ore; misurare la quantità delle urine nelle 24 ore; inviare i campioni all'Università Federico II di Napoli per la determinazione del contenuto di sodio, potassio e iodio dei campioni raccolti; appaiare le determinazioni sul campione di urine con i dati dell'esame della popolazione; analizzare le relazioni tra gli indicatori raccolti con l'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare e le determinazioni delle urine e valutare la concentrazione media di sodio, potassio e iodio nelle urine e le abitudini alimentari per macroaree per l'Italia.

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.

Caratterizzazione clinica, sierologica e molecolare delle infezioni acute da virus dell'epatite B in Italia. GISEBA: Gruppo Italiano di Studio dell'Epatite B Acuta

L'infezione da virus dell'epatite B (HBV) è stata caratterizzata da diversi decenni, tuttavia alcune importanti questioni rimangono ancora aperte per quanto riguarda l'infezione acuta: sono pochi i dati sulla presenza di mutanti *e-minus* che sono più spesso coinvolti nelle infezioni croniche causando una malattia più severa e più resistente agli antivirali; non vi sono dati, a parte segnalazioni sporadiche, sull'incidenza nella popolazione generale dei mutanti dell'HBsAg, descritti finora solo nei neonati da madre HBsAg e nei trapiantati di fegato trattati con immunoprofilassi; distribuzione dei genotipi; recenti studi suggeriscono un'associazione tra alcuni genotipi e il decorso clinico e la risposta alla terapia dell'infezione cronica. Il genotipo D è quello nettamente prevalente nelle infezioni croniche da HBV in Italia, ma non vi sono dati sulla distribuzione dei genotipi nelle infezioni acute. Non sono stati ancora valutati nel campo dell'epatite B i saggi di avidità anticorpale utilizzati per individuare un'infezione recente causata da alcuni virus (es. HIV, CMV)

Lo studio si propone di eseguire una caratterizzazione sierologica, molecolare e clinica di un campione rappresentativo di epatiti acute sintomatiche causate da HBV in Italia.

Per raggiungere questi obiettivi sono stati arruolati in 17 centri clinici italiani 107 pazienti con infezione acuta da HBV, poi seguiti in follow-up clinico-virologico per almeno sei mesi.

Risultati attesi nel triennio

Ottenere un quadro aggiornato sulle caratteristiche virologiche delle "nuove" infezioni da HBV a livello nazionale (mutanti *escape* ed *e-minus*, genotipo, durata della viremia rilevabile con metodica *real-time*)

Valutare l'andamento dei marcatori sierologici di infezione da HBV, e segnatamente i livelli di HBsAg e di IgM anti-HBc e lo sviluppo dell'avidità anticorpale anti-HBc (con metodo sperimentale) in corso di infezione acuta da HBV.

Correlare tali caratteristiche virologiche e sierologiche con l'evoluzione clinica dell'infezione (gravità, tasso di cronicizzazione).

Trasferibilità dei risultati

I risultati dello studio permetteranno di ottimizzare la diagnosi, la prognosi e la terapia delle infezioni acute da HBV e di valutare nuove misure preventive in relazione alla variabilità genetica del virus

Conservazione della fertilità in pazienti oncologici

Il progetto prevede che alcuni Ospedali pubblici, in cooperazione con altre strutture sanitarie, creino una rete operativa che sviluppi in Italia la cultura e le possibilità tecniche di conservare la fertilità nei giovani pazienti oncologici e a rischio di infertilità iatrogena. Per i maschi si dovrà sviluppare una rete di centri che provvedano alla conservazione del liquido seminale, che offrano ai pazienti facile accessibilità delle strutture ove effettuare la conservazione. Le Società scientifiche saranno coinvolte attraverso la realizzazione di linee guida condivise che indirizzino i comportamenti in tale direzione.

Per la conservazione della fertilità femminile si procederà sia tentando di ripristinare la naturale funzione endocrina ovarica sia con studi di crioconservazione degli ovociti e del tessuto ovarico.

Risultati attesi nel triennio

Acquisizione di dati epidemiologici dell'infertilità presso pazienti oncologici promuovendo il contatto e le interazioni con le società scientifiche e gli istituti oncologici e reumatologici, reclutamento di strutture per la conservazione del liquido seminale, percentuale di pazienti che decidono di accedere alle procedure di conservazione del seme e tasso di utilizzo. Valutazione della sopravvivenza di gameti femminili conservati a breve e lungo termine. Definizione di protocolli per la conservazione "sicura da contaminazione neoplastica", dei gameti femminili o del tessuto ovarico.

Acquisizione di migliori conoscenze sulla rete vascolare dell'ovaio e possibilità di trapianto ortotopico per il ripristino della fertilità e della funzione endocrina.

Metodologie di sorveglianza del ripristino della funzione endocrina e riproduttiva attraverso procedure di procreazione assistita. Valutazione e durata temporale della funzione endocrina ripristinata e della funzione ovulatoria. Utilizzo degli ovociti, del tessuto ovarico, degli spermatozoi e del tessuto testicolare eventualmente donati per la ricerca in ambito riproduttivo, oncologico e reumatologico. Risultati riproduttivi nelle pazienti che possono essere sottoposte a trattamenti con strategie di conservazione della fertilità e di autotrapianto, sia per la fertilità naturale che per le eventuali procedure di PMA.

Trasferibilità dei risultati

Realizzazione di una proposta di linee guida per la conservazione della fertilità in pazienti oncologici e a rischio di infertilità iatrogena. Espansione sul piano nazionale della rete integrata di strutture dell'SSN, che garantisca a tutti i cittadini che dovessero essere affetti da una patologia tale da mettere a rischio il futuro riproduttivo, le migliori opzioni che la medicina attualmente può offrire ed una accessibilità ottimale su tutto il territorio nazionale.

Sviluppo delle conoscenze sulla perdita precoce della funzione riproduttiva per cause iatrogene o naturali con strategie di carattere sanitario e sociale per la prevenzione di questa forma di sterilità, rimuovendo altresì uno dei fattori che più frequentemente determinano quelle forme di sterilità per le quali i cittadini italiani tendono a cercare soluzione all'estero con la donazione di gameti, pratica non consentita in Italia.

Controllo di stato riguardo alla potenza di vaccini virali

Controllo di neurovirulenza vaccino antipolio orali.

Su richiesta del Dipartimento di MIPI verrà eseguita l'analisi statistica pertinente al saggio di neurovirulenza da partite madri e relative referenze di vaccini antipolio orale.

Risultati attesi nel triennio

Mediamente in un anno vengono eseguiti circa 15 controlli.

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

- Miglioramento della comunicazione tra la sala situazioni italiana e l'analoga sala operativa dell'ECDC
Verranno acquisite le procedure operative della sala situazione dell'ECDC e verrà valutata la opportunità di replicazione a livello nazionale (centrale e territoriale) di procedure che permettano di migliorare l'efficienza della comunicazione e della risposta. Nell'ambito di tale attività sono previste visite all'ECDC di Stoccolma di personale in punti chiave della comunicazione e risposta italiana. Verrà costruita una base di dati con le indicazioni delle *expertise* istituzionali e non per argomenti di sanità pubblica candidati ad essere oggetto di emergenze.
- Messa a punto di procedure operative standard per la sorveglianza e la risposta rapida in un contesto internazionale
Verranno acquisiti i piani regionali di risposta alle emergenze o comunque la documentazione atta ad identificare le procedure di comunicazione, azione e i relativi responsabili per area geografica. Potranno essere utilizzati a questo proposito i piani pandemici regionali. Verranno valutati i documenti raccolti e la disamina dei punti rilevanti in comune e di quelli differenti verrà proposta al Ministero della Salute e al Coordinamento Inter-regionale della Prevenzione. Verrà consultata anche la sezione della DGSANCO che si occupa di preparedness e response al fine acquisire modelli anche esteri. Verranno successivamente proposte procedure operative standardizzate per la sorveglianza e la risposta rapida.
- 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.

Creare e comunicare cultura riproduttiva: azioni informative e preventive dell'infertilità della popolazione giovanile italiana

A partire dall'analisi della letteratura e delle ricerche sul tema dell'infertilità verrà sviluppata un'indagine sulla relativa percezione di questa tematica e sugli atteggiamenti legati alla salute riproduttiva della popolazione giovanile studentesca attraverso dei *Focus group*. Inoltre verranno indagati i vissuti dell'infertilità delle coppie, attraverso la mediazione di consultori e centri pubblici/privati che trattano problemi legati all'infertilità e alle scelte procreative attraverso interviste individuali e *focus group*. Si analizzerà la semantica dei media in relazione alla salute riproduttiva e si osserveranno le *community* online. L'indagine si rivolgerà a due distinti gruppi: gli studenti delle scuole superiori e la popolazione giovane con problemi di infertilità (18-35 anni) in centri campione in diverse aree geografiche italiane.

Risultati attesi nel triennio

Delineare le linee guida per azioni di informazione e prevenzione dell'infertilità e per la promozione della salute riproduttiva della popolazione giovanile italiana. Questo obiettivo prioritario si svilupperà in due sotto-obiettivi:

- l'obiettivo di indagare percezioni, atteggiamenti valoriali e comportamenti nella popolazione giovanile al fine di prevenire problemi di infertilità;
- l'obiettivo di cogliere vissuti, aspettative e problemi della popolazione giovane-adulta con problemi di infertilità. Attivazione di un sito web per la diffusione scientifica dei risultati della ricerca.

Trasferibilità dei risultati

Il sito web oltre a comunicare la ricerca *in progress* intende contribuire alla costruzione di un network multidisciplinare di studiosi sul tema. Esso sarà uno strumento di promozione delle azioni di informazione/prevenzione.

Attivazione sperimentale di un blog tematico sulla salute riproduttiva dei giovani. I contenuti del blog saranno gestiti insieme agli studenti delle scuole superiori, attraverso azioni di sensibilizzazione e informazione (ipotesi di primo lancio sperimentale di un concorso nazionale). L'informazione sulla salute riproduttiva viene quindi gestita "dal basso", a partire da vissuti, aspettative e interessi degli stessi destinatari.

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

- Obiettivo generale
Definizione e diffusione di un programma di elevato standard metodologico per la rilevazione della qualità percepita nei servizi di salute mentale e sua applicazione pilota nella realtà dei servizi italiani anche allo scopo di promuovere e rendere possibile la valutazione e il miglioramento interno ed esterno in un'ottica di benchmarking.
- Obiettivi specifici
 - definire il concetto di soddisfazione e rendere possibile la valutazione della stessa nei confronti delle prestazioni ricevute alla luce delle più recenti acquisizioni in campo

- internazionale e di quanto sperimentato nello svolgimento di studi già condotti nei DSM italiani;
- definire e misurare le componenti della dimensione “soddisfazione degli utenti”;
 - promuovere il confronto degli esiti di soddisfazione tra strutture, ASL e/o aree territoriali (in termine di dimensione del bacino di utenza, tipi di servizio e localizzazione geografica);
 - rendere possibile l’individuazione di possibili problemi su cui avviare iniziative di miglioramento continuo di qualità dell’assistenza;
 - monitorare l’andamento degli esiti di soddisfazione nel tempo.
- Programma di attività e Metodi
- I metodi utilizzati sono basati su:
- la recente proposta della WHO (Murray & Evans, 2003), di valutare per quanto riguarda gli aspetti di qualità percepita la capacità del servizio di rispondere ai bisogni personali degli utenti (*responsiveness*) nella consapevolezza che i giudizi di soddisfazione nei confronti delle prestazioni ricevute sono troppo influenzate dalle attese e non sono quindi confrontabili, almeno tra classi sociali diverse, e che quindi è meglio indagare le specifiche esperienze degli utenti;
 - l’adozione/adattamento di metodi e strumenti dell’Istituto Picker, un istituto indipendente no-profit di ricerca e sviluppo, principale fornitore di *survey* sulla qualità percepita condotte sugli utenti del sistema sanitario nazionale inglese allo scopo di migliorare la qualità delle cure. Il programma utilizzato dall’Istituto Picker presenta elevati standard metodologici ed è adottato oltre che nel Regno Unito anche in Australia, Canada, Germania, Giappone, Svezia, Svizzera e USA. Il programma utilizzato deriva dalla consapevolezza che la soddisfazione dipende dalle aspettative del paziente le quali a loro volta sono influenzate dalle sue conoscenze e dalla relazione con e dipendenza da chi fornisce le cure. Non ritiene pertanto che sia corretto valutare la soddisfazione del paziente ma l’occorrenza di buone/cattive pratiche di assistenza nella sua esperienza.

Risultati attesi nel triennio

Definizione e raccomandazione di diffusione nei servizi di salute mentale di un programma di elevato standard metodologico per la valutazione della qualità percepita.

Disponibilità di schede tecniche su procedure raccomandate per il coinvolgimento degli utenti, la conduzione della valutazione, la diffusione dei risultati, la progettazione del piano d’azione, il monitoraggio dei risultati.

Presentazione dei risultati di applicazioni pilota del programma in alcuni DSM a diversi destinatari istituzionali e di popolazione.

Trasferibilità dei risultati

Il programma può fornire alle istituzioni dell’SSN:

- tecniche e procedure per l’implementazione di un programma prototipale esportabile nei 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 database/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 scadenziario delle azioni.

Descrizione dei Servizi di Salute Mentale preposti per il ricovero di pazienti psichiatrici acuti con messa in luce delle differenze sia quantitative che qualitative

Sono continuate le analisi dei dati relativi alle strutture di ricovero per i pazienti psichiatrici acuti nell'ambito del progetto PROGRES Acuti e dei pazienti ivi presenti. In particolare esse hanno riguardato: i) la descrizione del processo di cura delle stesse e la valutazione comparativa nelle varie tipologie di strutture di un campione rappresentativo di pazienti dimessi (N=1.330) per definirne i profili clinici; ii) la descrizione del processo di cura e la valutazione comparativa tra tipi di strutture di un campione rappresentativo di pazienti ammessi (N=1.577) iii) lo studio delle variabili associate ai trattamenti sanitari obbligatori; iv) lo studio delle variabili associate ai primi ricoveri nella vita.

Risultati attesi nel triennio

Disponibilità e diffusione di dati di struttura e clinici delle strutture di ricovero per pazienti psichiatrici acuti presenti in Italia, in particolare riguardanti:

- caratteristiche edilizie, personale, attività (durata media dei ricoveri, tasso di *turnover* dei pazienti, proporzioni e tassi di trattamenti sanitari obbligatori), tipi di trattamenti erogati, integrazione dei servizi, organizzazione della vita quotidiana dei pazienti ospitati e diritti loro riconosciuti, costi diretti, frequenza di eventi-sentinella (contenzioni, comportamenti etero- e autolesivi, ecc.) e continuità dell'assistenza dopo le dimissioni.
- tipo di assistenza fornita dalle strutture territoriali dei Dipartimenti di Salute Mentale prima del ricovero e fattori determinanti il ricovero.

Disponibilità degli strumenti di rilevazione utilizzati nella ricerca, in particolare della "Scheda Censimento", della "Scheda Struttura" e della "Scheda Paziente".

Trasferibilità dei risultati

Possibile trasferibilità ad altri Paesi europei della metodologia di ricerca adottata (attualmente in Europa, un'indagine analoga per completezza di rilevazione è stata condotta solo nel Regno Unito); e possibili collaborazioni internazionali a scopo di confronto e scambio di strumenti e conoscenze.

Uso dei dati a scopo di valutazione e miglioramento di qualità da parte delle Regioni.

Development and planning of a pilot EHES (European Health Examination Survey) in EU and EFTA Members

Il Progetto, configurato come *Tender*, è la prosecuzione del Progetto Europeo FEHES, che si proponeva di verificare la fattibilità di un'indagine di tipo "HES" (*Health Examination Survey*) in Europa.

Questo tipo di indagine, che è basata non solo su un questionario (come le indagini sulla salute svolte in Italia all'ISTAT), ma anche sulla rilevazione di parametri biochimici, clinici e antropometrici è indispensabile per conoscere lo stato di salute di una popolazione.

Nel Progetto FEHES il contributo ISS è stato in primo luogo la partecipazione al coordinamento generale (facendo parte del *Coordination Team*) e poi nello specifico, leader del WP “*Legal and Ethical Issues*” che ha condotto una *Survey* sugli aspetti di *Date Protection*, *Confidentiality* e *Informed Consent* implicati nella conduzione di una HES, realizzata attraverso la predisposizione di un questionario *ad hoc*, la creazione di un network di referenti in 32 Paesi UE ed EFTA che hanno compilato il questionario, l’elaborazione di tali dati e la loro organizzazione in una base dati disponibile sul sito del Progetto.

L’ufficio di Statistica è stato l’unico partner italiano del Progetto.

Sulla scorta di questa esperienza, apprezzata a livello di Comunità Europea, l’ISS è stato chiamato a far parte (con alcuni collaboratori già coinvolti nel Progetto FEHES) come unico partner italiano del *Reference Group* dell’attività di sviluppo e pianificazione di una HES a livello europeo. Il campo specifico sarà di nuovo costituito dagli aspetti relativi alla problematica dei dati personali.

Risultati attesi nel triennio

Predisposizione di una metodologia standard per la preparazione di *Health Examination Survey* a livello europeo, attraverso la conduzione di corsi di formazione e di manuali.

Trasferibilità dei risultati

I risultati prodotti verranno messi a disposizione della UE e di tutti i Paesi UE ed EFTA, in modo che ne possano trarre spunto per la pianificazione di un’indagine di tipo HES.

Effetti a lungo termine dell’inquinamento atmosferico: studio di coorte di adulti e bambini

Obiettivo principale del progetto, di durata biennale, è l’arruolamento e il follow-up di popolazioni reclutate in studi trasversali già condotti per valutare gli effetti a lungo termine sulla salute in età adulta e pediatrica dell’inquinamento atmosferico in aree di diverse regioni italiane.

All’interno di questo progetto, l’ISS è responsabile scientifico dell’Unità Operativa “Valutazione del ruolo dei fattori ambientali e genetici”. Questa UO si propone di condurre uno studio su gemelli monozigoti (MZ) e dizigoti (DZ) per stimare il peso relativo dei fattori ambientali e genetici nell’insorgenza di patologie correlate all’esposizione di lungo periodo ad inquinamento atmosferico, con un riferimento particolare ai disturbi respiratori e allergici (e ai loro 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. La popolazione oggetto di studio sarà costituita da circa 1.500 coppie di gemelli MZ e DZ, in parte già arruolati nel Registro Nazionale Gemelli dell’ISS, residenti in aree geografiche (del Nord, del Centro e del Sud) precedentemente interessate dall’indagine SIDRIA (“Studio Italiano sui Disturbi Respiratori nell’Infanzia e l’Ambiente”).

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 MZ e DZ;
- quantificare il contributo dei fattori genetici (cioè dell’ereditabilità) e ambientali nel determinare la suscettibilità;
- chiarire l’origine della comorbidità, specialmente tra asma e rinite, stabilendo se la frequente concomitanza delle due condizioni sia il risultato dell’influenza di stessi fattori genetici (pleiotropismo) o dell’esposizione a stessi determinanti ambientali.

Trasferibilità dei risultati

Le patologie respiratorie e allergiche come l'asma e la rinite sono condizioni ad elevato impatto sociale per diverse ragioni: alta prevalenza; impatto sulla qualità della vita; impatto sul rendimento scolastico e lavorativo; costo economico.

Per questo, lo studio dei determinanti della suscettibilità a queste patologie 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.

Efficacia a lungo termine della vaccinazione anti-epatite B

La vaccinazione rappresenta uno dei mezzi di prevenzione più efficaci contro l'infezione da virus dell'epatite di tipo B. L'Italia è stata una delle prime nazioni ad istituire un programma di vaccinazione anti-epatite B rivolto sia alla popolazione generale che a gruppi a rischio.

Dall'inizio dell'obbligo vaccinale (1991) per tutti i nuovi nati e i dodicenni, in Italia sono stati vaccinati oltre 15 milioni di bambini con notevoli risultati in termini di sicurezza ed efficacia. I vaccini anti-epatite B attualmente in uso sono altamente immunogenici e in grado di conferire protezione a lungo termine. Rimangono tuttavia alcune questioni aperte sulla necessità o meno di somministrare dosi *booster* per mantenere nel tempo l'immunità.

Lo studio è di tipo osservazionale, prevede il richiamo di una coorte di circa 1.200 ragazzi, nati nel 1992 e vaccinati alla nascita, già testati, per la presenza di anticorpi anti-epatite B, nel corso del 2003. Il precedente studio concludeva che a distanza di dieci anni dalla somministrazione del ciclo vaccinale primario, i bambini esaminati mantenevano una memoria immunologica e pertanto non erano necessarie dosi *booster* di vaccino. Tuttavia, si suggeriva la necessità di continuare nel tempo il follow-up di tale coorte, per valutare la protezione a lungo termine.

Risultati attesi nel triennio

Valutare l'efficacia della vaccinazione anti-epatite B a circa 15 anni di distanza dalla sua somministrazione in bambini vaccinati nel primo anno di vita.

Valutare la persistenza a lungo termine dell'immunità umorale (anti-HBs) in coorti di neonati vaccinati nei primi anni '90 e, sulla base dei risultati ottenuti, stabilire la necessità e la tempistica per effettuare eventuali richiami vaccinali.

Studiare, in soggetti che si sono infettati nonostante la vaccinazione, l'emergenza di mutanti virali (*escape mutant*) del gene S e delle regioni pre-S1 e pre-S2 del genoma di HBV.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questa ricerca saranno di grande utilità per il Ministero della Salute per dare indicazioni alla popolazione circa l'eventualità di ricorrere o meno ad una dose *booster* dopo la vaccinazione effettuata nel primo anno di vita.

Efficacia nella pratica e rapporto costi/benefici di un programma di screening e gestione della depressione in diversi contesti medici. Unità Operativa "Banca biologica" (UOB)

L'UO si occupa del disegno, dell'implementazione e dell'analisi dei dati della parte relativa allo studio epidemiologico sui correlati genetici e sulla rispondenza al trattamento terapeutico per la depressione. Della definizione delle procedure operative inerenti le varie fasi di allestimento di una raccolta di campioni biologici da donatori risultati positivi allo screening per la depressione (raccolta, manipolazione, stoccaggio) presso la Banca biologica del CNESPS, in

accordo con i codici di buon utilizzo e corretto comportamento delle banche previsti dall'OCSE e dai vari organismi internazionali, nonché dal Consiglio d'Europa (rec. 4/2006). L'UO si occupa inoltre della definizione degli strumenti etico-legali per tale allestimento (consensi informati, note informative, anonimizzazione dei campioni in formato collegabile, comunicazione dei risultati ai partecipanti, sistemi di sicurezza degli archivi informatici e dei campioni codificati ecc.).

Risultati attesi nel triennio

Stima della risposta al trattamento psicoterapeutico in relazione ai correlati genetici.

Allestimento di una raccolta organizzata e standardizzata di campioni biologici provenienti da soggetti positivi allo screening della depressione che sia disponibile per ipotesi future di studio medesimo ambito di ricerca, nella cornice etico-legale più aggiornata rispetto le linee guida, le raccomandazioni nazionali e internazionali e la normativa legale nazionale.

Trasferibilità dei risultati

Contribuire alla caratterizzazione epidemiologico-genetica dei pazienti non responsivi al trattamento antidepressivo, il che potrebbe favorire in futuro l'identificazione di tali pazienti e guidare verso altro tipo di terapie, evitando impiego di risorse per trattamenti dimostratisi poco efficaci.

La banca biologica da campioni di soggetti affetti da depressione potrà essere impiegata per implementare nuovi studi e testare nuove ipotesi relative alla etiologia e la terapia della depressione, con notevole risparmio dei tempi tecnici e di risorse per l'allestimento di nuove raccolte prospettiche.

Epidemiologia dell'infezione da HIV in Uganda

Il Progetto è nato nel 1994 e ha portato alla creazione di un sito di ricerca italiano presso l'Ospedale Lacor nel distretto di Gulu in Nord Uganda. Il Progetto ha come obiettivo generale quello di monitorare l'andamento dell'epidemia da HIV e i fattori di rischio ad essa associati nel Nord Uganda. Questa regione è afflitta da guerra civile da oltre 20 anni e registra una elevata prevalenza di infezione da HIV e un'altissima percentuale di popolazione rifugiata in campi protetti. In Uganda, al fine di monitorare l'andamento dell'epidemia da HIV, oltre 15 anni fa è stato stabilito un sistema di sorveglianza sentinella basato sul test anonimo di donne in gravidanza, le quali costituiscono un gruppo di popolazione facilmente raggiungibile e rappresentativo della popolazione generale adulta. Attualmente il sistema include 20 cliniche prenatali ma poche di queste, a causa delle condizioni di insicurezza e della carenza di strutture sanitarie adeguate, sono situate nel nord del Paese. Al fine di colmare questa lacuna, il Progetto ha creato un sito sentinella presso la clinica prenatale dell'Ospedale Lacor. Il sito di sorveglianza è attivo dal 1994 ed è ufficialmente riconosciuto dalle autorità ugandesi. Nel 2005, con lo scopo di aumentare la disponibilità di dati epidemiologici per il Nord Uganda, il Progetto ISS in collaborazione con l'ONG italiana AVSI ha esteso l'attività di sorveglianza sentinella dell'HIV ad altre due cliniche prenatali nei distretti di Kitgum e Pader.

Risultati attesi nel triennio

- Stima dell'andamento temporale generale e distinto per classi di età dell'epidemia da HIV/AIDS in tre distretti del Nord Uganda tramite un sistema di sorveglianza sentinella tra le donne gravide afferenti alle cliniche pre-natali.
- Identificazione dei fattori socio-demografici associati con l'infezione da HIV.
- Stima della differenza nel profilo di rischio e nella prevalenza di infezione da HIV tra la popolazione rifugiata in campi protetti e quella residente fuori dai campi.

- Valutazione della validità di metodi per stimare la prevalenza di HIV/AIDS nella popolazione generale adulta correggendo i dati di prevalenza osservati tra le donne gravide.
- Valutazione dell'accesso ai programmi di prevenzione e cura dell'HIV/AIDS basati su trattamenti con farmaci antiretrovirali (programmi per la prevenzione della trasmissione materno-infantile dell'HIV).
- Mantenimento di una banca biologica costituita da sieri anonimi provenienti da popolazione ugandese con disponibilità di informazioni demografiche e status HIV.

Trasferibilità dei risultati

Il contesto operativo, seppure distante geograficamente da quello italiano, permetterà di contribuire allo sforzo della comunità scientifica internazionale volto a migliorare le conoscenze e il controllo di malattie infettive che, vista la crescente mobilità della popolazione mondiale, hanno una rilevanza sanitaria anche per i Paesi sviluppati. Inoltre il Progetto appare in sintonia con l'obiettivo di lotta all'HIV/AIDS riconosciuto come prioritario dalle principali organizzazioni internazionali e dalle autorità ugandesi.

I risultati dell'attività contribuiranno infine a fornire un adeguato background di conoscenze epidemiologiche a supporto di eventuali future ricerche da condurre nel Nord Uganda, dove il sito italiano di ricerca costituito nel 1994 dall'ISS rappresenta una base operativa altamente strategica per la conduzione di studi sulle malattie infettive.

Epidemiologia descrittiva dei tumori rari in Italia ed Europa

Non c'è consenso sulla definizione di tumore raro e una stima dell'impatto di queste patologie nella popolazione non è facilmente calcolabile. I tumori rari presentano inoltre una serie di quesiti, poiché cause, diagnosi e trattamento sono difficili da studiare e di conseguenza prevenzione e trattamento sono problematici. Gli investimenti per lo sviluppo commerciale e la ricerca translazionale sono limitati, così come è complesso il reclutamento di un sufficiente numero di pazienti per gli studi randomizzati.

Si è costituito un gruppo di lavoro, composto da oncologi, ricercatori, epidemiologi e anatomo-patologi, per la definizione e compilazione di una lista di neoplasie rare.

Risultati attesi nel triennio

Giungere a un consenso internazionale sulla definizione di tumore raro. Produrre un elenco delle neoplasie rare definite sulla base della sede oppure sulla combinazione di sede e morfologia e corredato dal tasso di incidenza della popolazione europea e di quella statunitense. Questa analisi sarà possibile sulla base di due grandi database di popolazione (EUROCARE e SEER).

Trasferibilità dei risultati

Definizione di farmaci orfani, programmazione degli studi clinici.

ERA "Studio della Mortalità evitabile ed Elaborazione Atlante Ricoveri Ospedalieri"

Nell'ambito del Progetto di Ricerca Corrente ISS "ERA" (Epidemiologia e Ricerca Applicata) e che vede la collaborazione di varie Istituzioni ed Enti che svolgono attività scientifica in ambito di sanità pubblica, quali l'Università di Tor Vergata, l'ISTAT, la NEBO Ricerca e il Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, vengono condotti studi sulla mortalità evitabile e sui ricoveri ospedalieri che producono Atlanti a livello territoriale fine (di singola ASL) oltre che Provincia e Regione.

Ricordiamo che una causa di morte viene detta "evitabile" quando si conoscono interventi capaci di ridurre il numero di decessi da essa provocati, con particolare riferimento all'età non

avanzata. La mortalità evitabile si distingue in tre categorie, che si differenziano a seconda del tipo di intervento in grado di contrastare le varie cause. Vi è quindi la mortalità evitabile con interventi di prevenzione primaria (ad esempio il tumore al polmone attraverso la lotta al tabagismo), quella evitabile attraverso interventi di prevenzione secondaria (ad esempio il tumore al collo dell'utero attraverso la diffusione di screening per la diagnosi precoce) e quelli evitabili attraverso interventi di igiene e assistenza sanitaria (le gravi patologie cardiache che si giovano di tempestivi interventi di soccorso).

ERA si occupa in primo luogo di un fenomeno critico in termini di sanità pubblica quale la mortalità evitabile, che peraltro rappresenta la punta dell'iceberg della situazione dello stato di salute delle popolazioni e delle strutture sanitarie, ma passa anche ad analizzare un nuovo "universo" di informazioni sanitarie, costituito dalle Schede di Dimissione ospedaliera (SDO).

Anche se le SDO non hanno una finalità strettamente epidemiologica, ma si inseriscono piuttosto in processi di natura amministrativo-contabile, tuttavia l'analisi dei ricoveri per diagnosi fornisce un quadro ampio e articolato dell'ospedalizzazione, fenomeno di grandissimo rilievo per la sanità pubblica, sia per l'importanza delle patologie per le quali si ricorre a questo servizio, sia per il consistente impegno finanziario che le varie realtà territoriali della sanità dedicano alle strutture ospedaliere.

Risultati attesi nel triennio

Produzione di Atlanti che descrivono:

- la mortalità evitabile per genere e ASL, avvalendosi degli ultimi dati resi disponibili dall'ISTAT
- i ricoveri ospedalieri per genere e ASL, avvalendosi degli ultimi dati resi disponibili dal Ministero della Salute.

Trasferibilità dei risultati

Tali Atlanti costituiscono una base conoscitiva, elaborata con metodologia statistica adeguata, da mettere a disposizione sia delle cittadine e cittadini per renderli consapevoli di importanti temi di sanità pubblica, che delle amministrazioni locali che possano così avvalersi di evidenze epidemiologiche da utilizzare come strumenti di *policy* per la pianificazione e la gestione, per la valutazione delle politiche e più genericamente, in ambito di sanità pubblica, per approntare raccomandazioni e linee guida.it.

Esposizione a benzene nell'infanzia

Il progetto consiste in uno studio multicentrico sull'intensità e la variabilità dell'esposizione a benzene in un campione di bambini residenti nelle province di Torino, Milano, Firenze, Roma, Catania, Palermo, Cagliari e partecipanti allo studio caso-controllo SETIL. L'indagine ha incluso bambini con leucemia e bambini di controllo. Sono state effettuate misure ripetute di concentrazioni di benzene in zona respiratoria, di indicatori biologici urinari e di concentrazioni di benzene *outdoor*, per quattro settimane in un anno (una settimana per stagione).

La raccolta dati è terminata nel 2005. Nel triennio 2006-08 è stato effettuato il controllo di qualità dei dati e il *merge* tra i file contenenti i dati anagrafici dei bambini, alcune informazioni raccolte all'intervista dei genitori e i risultati delle determinazioni chimiche effettuate sui campioni raccolti. È stato anche elaborato un piano di analisi statistiche consistente in quattro moduli, in ciascuno dei quali verranno utilizzate tecniche appropriate all'analisi di campioni multipli individuali.

- Analisi finalizzate alla valutazione dell'intensità dell'esposizione a benzene e dei suoi determinanti [concentrazioni *outdoor*, fumo passivo da questionario, cotinina urinaria, *status* di caso o controllo, residenza (urbana/rurale), stagione, sesso ed età].

- Analisi della relazione tra esposizione personale a benzene e concentrazioni urinarie di metaboliti del benzene, tenendo conto dell'influenza di alcune covariate (dati anagrafici; *status* di caso o controllo; cotinina urinaria, esposizione personale a toluene e xileni).
- Analisi di confronto delle concentrazioni *outdoor* di benzene tra partecipanti e non partecipanti (separatamente per casi e controlli), finalizzate a stimare la presenza e l'entità di un eventuale *bias* di selezione.
- Analisi della relazione tra esposizione personale a benzene (o concentrazioni *outdoor* di benzene) e induzione magnetica *indoor*. Lo scopo di queste analisi è stimare l'eventuale confondimento tra esposizione a benzene ed esposizione a campi magnetici ELF.

Il triennio 2009-11 sarà dedicato alla realizzazione delle analisi descritte e alla pubblicazione dei risultati.

Risultati attesi nel triennio

Pubblicazioni scientifiche.

European Hospital Benchmarking by Outcomes in Acute Coronary Syndrome Procedures (PHP 2008-2013)

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.

Formazione per l'investigazione epidemiologica rivolta agli Osservatori Epidemiologici Regionali e alle ASL

Seguendo le indicazioni del Piano Sanitario Nazionale, il CNESPS ha rafforzato la messa a regime nel Paese della sorveglianza della popolazione da 18 a 69 anni (sistema di sorveglianza PASSI). Nell'ottica di contribuire a creare una sorveglianza di popolazione che seguisse anche altri gruppi di popolazione il progetto ha contribuito alla realizzazione della sperimentazione del sistema di sorveglianza OKkio alla SALUTE e opererà per la sperimentazione e successiva messa a regime della sorveglianza PASSI d'argento per il gruppo di popolazione con 65 e più anni. Nell'ambito di questo contesto si sono venuti sviluppando due percorsi formativi, entrambi master universitari, uno sull'epidemiologia applicata (PROFEA) e l'altro sulla sorveglianza e management (detto anche Master PASSI) con l'obiettivo di creare a livello locale un livello di competenza, nel personale locale, necessario per sostenere tecnicamente e

organizzativamente, un sistema di sorveglianza di popolazione. Un intervento simile si sta costruendo per la costituzione dei Centri Epidemiologici Aziendali con la regione Sardegna, mentre con il Ministero della Salute è allo studio un progetto di sostegno e messa a regime della sorveglianza della popolazione anziana. 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

Il PROFEA avrà formato alla fine del 2009 circa 50 operatori sanitari strutturati nel sistema sanitario regionale o locale che avranno competenze utilizzabili nella realizzazione di indagini epidemiologiche, in particolare sulle epidemie e su altre situazioni di emergenza, nella preparazione dei profili di comunità, nella prioritizzazione dei problemi di salute, nello studio e nella realizzazione di interventi sanitari, mentre circa 20 operatori del sistema di sorveglianza PASSI avranno acquisito le competenze per creare una rete capace di far funzionare sul Paese una raccolta continua e confrontabile di dati che, tempestivamente usati, potranno essere utili per seguire i fattori di rischio nella popolazione e monitorare nel tempo la penetrazione delle azioni di prevenzione nella comunità. L'appoggio alla costituzione di otto centri epidemiologici aziendali e dell'osservatorio regionale in Sardegna produrrà una rete capace di offrire un'analisi dei problemi/aspetti sanitari immediatamente utilizzabile per la programmazione urgente e ordinaria. Il Bollettino Epidemiologico Nazionale produrrà 12 articoli *peer reviewed* ogni anno. Attraverso una *mailing list* mirata agli operatori sanitari interessati, oltre 10.000, si invierà un link per coloro che in tempo reale vorranno avere lettura dell'ultimo numero uscito.

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.

Frequenza di obesità e di determinanti del rischio cardiovascolare ad essa associati in una popolazione di adolescenti in una città del Mediterraneo – MAREA (*Metabolic Alterations Reggio Calabria Adolescents*)

Un precedente studio di popolazione, sulla prevalenza di alterazioni croniche dei marcatori di danno epatico, condotto in una cittadina del sud Italia, Cittanova, ha evidenziato, sorprendentemente, frequenze di sovrappeso, obesità e danno epatico metabolico [steatosi epatica, *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD)] del tutto sovrapponibili a quelle registrate in aree industrializzate del Nord-America. L'obesità ha raggiunto, nel mondo industrializzato, livelli di diffusione tali da determinare la nuova emergenza sanitaria. È soprattutto tra i bambini e gli adolescenti che si registra un preoccupante trend alla diffusione dell'eccesso ponderale. Le ragioni di tale fenomeno è da ricercare nella diffusione di uno stile di vita caratterizzato dalla sedentarietà e dalle errate abitudini alimentari. Maggiori informazioni sono inoltre necessarie riguardo alla capacità predittiva dei sistemi di valutazione dell'eccesso di adiposità nei bambini e negli adolescenti, rispetto alle alterazioni del metabolismo glico-lipidico e al rischio cardiovascolare. A tale proposito nell'ambito di uno studio a disegno trasversale, a cui si

prevede di aggiungere un periodo di follow-up, è stato selezionato un campione di soggetti tra 11 e 13 anni rappresentativo della popolazione di Reggio Calabria limitrofa al comune di Cittanova.

Risultati attesi nel triennio

Determinazione della prevalenza di obesità da individuare attraverso il BMI (criteri CDC e IOTF) e dei surrogati per la valutazione dell'adiposità viscerale (circonferenza addominale e rapporto circonferenza addominale/altezza), in una popolazione scolare di 1.000-1.200 bambini-adolescenti (10-18 anni d'età).

Determinazione della capacità predittiva degli indicatori dell'eccesso di adiposità rispetto alla NAFLD e al danno vascolare precoce.

Definizione nella fase di follow-up (fase longitudinale) dell'evoluzione delle condizioni cliniche di interesse: eccesso di adiposità, sindrome metabolica, NAFLD, danno vascolare precoce.

Trasferibilità dei risultati

I risultati che verranno conseguiti nel corso del suddetto progetto risulteranno da stimolo per l'adozione di una strategia preventiva orientata alla Sindrome metabolica negli adolescenti e per intervento mirato alla diminuzione delle alterazioni del metabolismo glico-lipidico e al rischio cardiovascolare. Le conoscenze acquisite favoriranno l'implementazione di interventi di prevenzione primaria e la messa in opera di azioni di *counseling* per i soggetti a rischio elevato di patologia.

Genetica dell'invecchiamento in salute, GEHA (*Genetics of Healthy Aging*)

Numerosi studi hanno evidenziato come l'invecchiamento in salute e la longevità siano almeno parzialmente sotto il controllo genetico (nucleare e mitocondriale) e suggeriscono una sostanziale ereditabilità dell'invecchiamento in salute, nell'ambito di una complessa interazione con una grande varietà di fattori ambientali (tra cui stile di vita, alimentazione, cultura). Obiettivo di questo progetto, coordinato dall'Università degli Studi di Bologna e finanziato dalla Commissione Europea nell'ambito del VI Programma quadro, è quello di identificare i fattori genetici coinvolti nell'invecchiamento in salute e in particolare della longevità e, quindi, in grado di consentire agli individui portatori di particolari varianti di geni candidati di rimanere in buona forma fisica e cognitiva, evitando o superando le malattie età-correlate più frequenti. Il progetto GEHA coinvolge 26 Unità di ricerca di 12 Paesi europei. Saranno reclutate 2.800 coppie di fratelli ultranovantenni in 17 diverse aree geografiche e 2.800 soggetti più giovani da utilizzare come controllo (60-75 anni), provenienti dalle stesse aree geografiche dei soggetti ultranovantenni. La popolazione in studio, sul territorio nazionale, è costituita in totale da 500 coppie di fratelli ultranovantenni e 500 controlli di età tra i 60 e 75 anni. L'unità dell'ISS si occuperà dell'arruolamento di 150 coppie di fratelli (inclusi gemelli) ultranovantenni e 150 controlli.

Risultati attesi nel triennio

- Mappatura fine dei cromosomi umani e identificazione delle regioni cromosomiche maggiormente coinvolte nella longevità e nell'invecchiamento in buona salute mediante "ASP analysis" (con l'uso di circa 400 marcatori di tipo microsatellite).
- Studio del *linkage disequilibrium* a livello di due regioni cromosomiche (D4S1564 nel cromosoma 4, 11p15.5 nel cromosoma 11).
- Studi di bioinformatica, genomica, proteomica e biologia molecolare sulle regioni cromosomiche che, in base ai dati ottenuti tramite analisi ASP e di "LD mapping" risulteranno eventualmente correlate alla longevità.

- Accertamento del ruolo svolto da tre regioni cromosomiche candidate (nel cromosoma 4, nel cromosoma 11 e la zona comprendente l'ApoE sul cromosoma 19) nel favorire la longevità.
- Verifica del ruolo svolto dagli aplogruppi del DNA mitocondriale, studiando anche la possibile interazione tra essi e i geni nucleari identificati di recente.
- Differenziamento dei campioni sulla base delle varianti genotipiche a livello del gene dell'ApoE, l'unico marcatore genetico finora associato con la riduzione della longevità in diverse popolazioni.
- Identificazione dei *target* per l'allestimento di approcci preventivi e terapeutici innovativi.
- Sviluppo di strategie di analisi innovative (basate su metodi statistici e matematici), capaci di integrare e combinare tutti i dati (clinici, socio-economici, demografici, genetici) e i risultati ottenuti dagli studi delle diverse Unità Operative.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto europeo GEHA, cercando di identificare i geni coinvolti nell'invecchiamento in salute, soddisfa le politiche dell'Unione Europea sulla salute pubblica in quanto i risultati attesi contribuiranno ad approfondire le conoscenze sui meccanismi biologici dell'invecchiamento umano. Tali informazioni porranno le basi per attuare interventi di diagnosi precoce e di prevenzione e per influenzare il processo della malattia e migliorarne il trattamento, contribuendo a diminuire le spese per la salute pubblica.

L'eventuale riconoscimento di modificazioni di parametri immunitari coinvolti nella risposta infiammatoria, lo stress ossidativo e il riparo del DNA ad opera di fattori genetici e/o ambientali potrebbe consentire l'individuazione di *marker* biologici prognostici di maggior rischio per lo sviluppo di patologie invalidanti nell'anziano e le possibili strategie preventive e/o terapeutiche da effettuare.

Genomica per la sanità pubblica: costituzione di una rete nazionale di banche genetiche di popolazione

Obiettivo generale di questo progetto è 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 (*Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure*) dell'Unione Europea. 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 ed 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.

Health Examination Survey (HES)

Le HES si basano su campioni di popolazione generale estratti in modo casuale e sono 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.

Con questo obiettivo, alle determinazioni sui fattori di rischio cardiovascolari (misurazione della pressione arteriosa, assetto lipidico, indice di massa corporea, realizzate attraverso l'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare) sono stati aggiunti una serie di esami quali la spirometria per valutare la capacità vitale, la VEMS e l'indice di Tiffeneau, la densitometria ossea per valutare la capacità del calcio di legarsi alle ossa, quali indice di Stiffness, z test e t test, 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 l'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 sia nella regione Friuli Venezia Giulia che nella regione Molise e sono state valutate le procedure e le metodologie per la realizzazione dello screening. Gli esami ematochimici verranno effettuati nel Centro Giovanni Paolo II di Ricerca e Formazione ad Alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche dell'Università Cattolica di Campobasso e in parte verranno conservati nella banca di campioni biologici del CNESPS. Al termine dell'esame sarà possibile avere un quadro obiettivo della distribuzione e 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, saranno disponibili sul sito web www.cuore.iss.it; al completamento delle regioni che costituiscono la macroarea geografica, i dati saranno 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 derivati dallo studio PASSI (Progressi delle Aziende Sanitarie per la salute in Italia) sulla percezione dello stato di salute.

Identici ma diversi: ricerca di cause (epi)genetiche per associazioni Oculo-auriculo-vertebral spectrum (OAVS) e VATER/VACTERL in gemelli monozigoti discordanti

Obiettivo dello studio è l'identificazione dei meccanismi epigenetici che giocano un ruolo chiave nello sviluppo di due malformazioni congenite "Oculo-auriculo-vertebral spectrum" (OAVS) e "Vertebral defects, Anal atresia, TracheoEsophageal and associated anomalies of the heart (Cardiac), kidney (Renal) and Limbs" (VACTERL). Capire l'eziologia di queste condizioni è necessario per migliorare diagnosi, contribuire all'ottimizzazione del trattamento e fornire un miglior *counselling* genetico. L'approccio prescelto si basa sull'arruolamento di gemelli monozigoti discordanti per una di queste malformazioni sui quali verrà effettuata l'analisi di espressione genica.

I gemelli verranno arruolati a partire dai dati del Registro nazionale gemelli e avvalendosi della collaborazione di alcuni Registri italiani di malformazioni congenite.

Risultati attesi nel triennio

Identificazione di geni coinvolti nello sviluppo delle due patologie oggetto dello studio tramite tecniche di espressione genica.

Trasferibilità dei risultati

Le due malformazioni oggetto dello studio possono richiedere significativi e ripetuti interventi chirurgici, interferire con la performance e l'aspetto fisico. La nostra conoscenza di OAVS e VACTERL è per ora molto limitata. Il *goal* dello studio a lungo termine è quello di traslare i nostri risultati in possibili obiettivi di prevenzione efficace a terapia futura.

La scoperta del meccanismo patogenetico che sottosta a OAVBS e VACTERL aumenterà al nostra conoscenza dello sviluppo dell'embrione. I risultati dello studio ci permetteranno di investigare ulteriormente l'espressione e la funzione dei geni coinvolti nell'embriogenesi e nello sviluppo successivo.

Identificazione delle azioni prioritarie per la riabilitazione dei sopravvissuti oncologici

Stima a livello nazionale della prevalenza e dei bisogni assistenziali dei pazienti oncologici lungo-sopravvissuti. Individuazione degli interventi socio-sanitari prioritari.

Risultati attesi nel triennio

Calcolo della prevalenza dei più importanti tumori per periodo dalla diagnosi sui dati dei registri tumori. Stima della prevalenza di pazienti oncologici lungo-sopravvissuti a livello nazionale e del relativo carico sanitario. Valutazione di priorità degli interventi.

Trasferibilità dei risultati

Acquisizione e diffusione di conoscenze epidemiologiche rilevanti ai fini di sanità pubblica.

Identificazione di profili di rischio nella popolazione per lo sviluppo di interventi di prevenzione; Unità Operativa 1: stima della ereditabilità a mutageni ambientali

L'obiettivo principale del progetto è di coordinare gli studi epidemiologici e genetici volti a chiarire il ruolo di alterazioni nei meccanismi di controllo della stabilità del genoma e/o dell'esposizione a fattori ambientali nella suscettibilità individuale al cancro. Il contributo specifico dell'Unità Operativa 1 al progetto consiste nello stimare l'ereditabilità della sensibilità individuale (possibile *marker* genetico di suscettibilità al tumore) a differenti agenti mutageni ambientali noti, allo scopo di mirare interventi di riduzione dell'azzardo ambientale e/o comportamentale in gruppi di popolazione con elevati profili di rischio.

Gli studi gemellari rappresentano un potente modello per rispondere a questo scopo e valutare come fattori genetici e ambientali interagiscano nello sviluppo delle malattie complesse quali le neoplasie.

L'Unità Operativa 1 è responsabile delle procedure di identificazione e arruolamento di un campione di coppie di gemelli, coordina le attività sperimentali condotte sui linfociti donati dai gemelli partecipanti, si fa carico dell'analisi statistica dei dati.

Risultati attesi nel triennio

Identificazione, tramite l'anagrafe del comune di Roma, della popolazione gemellare *target* per questo studio: si tratta di coppie di gemelli MZ e DZ in tre fasce di età (giovani adulti, adulti e anziani, circa 300 coppie dello stesso sesso) che saranno invitate a presentarsi presso l'ISS, dove verranno intervistati e verrà loro chiesta la donazione di un campione di sangue.

Messa punto dei questionari per la raccolta delle informazioni relative allo stato di salute dei partecipanti e alle loro abitudini di vita. Una sezione del questionario è dedicata alla anamnesi familiare per le patologie tumorali.

Messa a punto dei protocolli per la raccolta e la conservazione del materiale biologico.

Messa a punto il protocollo per l'attività sperimentale di *challenge assay* in linfociti crioconservati.

È stato messo a punto il protocollo per misurare le glicosilasi (*enzymatic DNA repair assays*).

È stato messo a punto il protocollo per misurare le modificazioni della cromatina (metilazioni e acetilazioni).

Sono stati individuati metodi di analisi statistica che integrano tecniche di regressione multivariata con elementi di genetica quantitativa.

Numerose ipotesi potranno essere testate, quali per esempio l'esistenza di fattori genetici e ambientali comuni alla sensibilità a più mutageni, ipotizzando quindi *pathway* di instabilità cromosomica comuni.

Trasferibilità dei risultati

Lo studio del ruolo di alterazioni nei meccanismi di controllo della stabilità del genoma nella suscettibilità al cancro permetterà lo sviluppo di “biomarcatori” utili nell’identificazione di soggetti a rischio e nel disegno di terapie antitumorali personalizzate.

L’identificazione di modificatori genetici e ambientali di rischio permetterà l’individuazione di soggetti vulnerabili e l’adozione di misure preventive di riduzione dell’azzardo ambientale e/o comportamentale della popolazione a rischio.

Il Progetto *MONica Risk, Genetics, Archiving and Monograph* (MORGAM)

Il Progetto MORGAM (*MONica Risk, Genetics, Archiving and Monograph*) 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. Il Progetto MORGAM è parte del progetto GenomEUtwin, un Network di Eccellenza per la genomica in Europa.

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 Latina (Priverno, Sezze, Bassiano e Roccamare) con linea-base nel biennio 1983-84, 1986-87, 1993-95 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. Termine del periodo di follow-up per eventi fatali e non-fatali: 31 dicembre 2002.

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-points 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;
- valutazione del potere predittivo dei fattori di rischio per i singoli Paesi e in *pool*;
- identificazione di funzioni per la valutazione del rischio di malattie cardiovascolari secondo tre modalità gradualmente: 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 leghi i valori dei fattori di rischio alla malattia coronarica e all'ictus.

Il Registro Nazionale Ipotiroidei congeniti e l'Osservatorio Nazionale per il Monitoraggio della Iodoprofilassi in Italia

L'ipotiroidismo congenito (IC) è la più frequente patologia endocrino-metabolica dell'infanzia. L'incidenza media in Italia è di un caso su 2.500 nati vivi. L'introduzione dei programmi di screening ha reso possibile il trattamento precoce dei nuovi casi di IC diagnosticati in Italia e quindi di prevenire le gravi sequele neuropsichiche conseguenti al deficit tiroideo alla nascita.

Il Registro Nazionale degli Ipotiroidei congeniti (RNIC) raccoglie le informazioni su tutti i nuovi casi di IC diagnosticati e consente parallelamente all'attività di sorveglianza, di intraprendere nuovi studi mirati alla comprensione dei fattori coinvolti nell'insorgenza dell'ipotiroidismo congenito. In particolare si vuole studiare la distribuzione geografica dei casi di IC sul territorio italiano.

Nell'ambito dell'Osservatorio Nazionale per il Monitoraggio della Iodoprofilassi in Italia (OSNAMI) proseguiranno, in collaborazione con il Dipartimento di BCN, le attività finalizzate alla verifica periodica dell'efficacia della iodoprofilassi e al monitoraggio di eventuali variazioni nella frequenza di patologie tiroidee nella popolazione.

Risultati attesi nel triennio

Verranno periodicamente aggiornati i dati su scala nazionale e stimate le incidenze per comune di residenza al fine di tracciare una mappa dettagliata dei casi di IC nelle diverse aree geografiche del nostro Paese. Inoltre, verrà eseguita una valutazione dell'eterogeneità tra macro aree e una analisi di clustering per identificare aggregati comunali. La distribuzione dei casi di IC in alcune aree verrà valutata anche in relazione alle malformazioni diagnosticate alla nascita.

Le attività connesse all'OSNAMI riguarderanno: la verifica periodica dell'efficienza e dell'efficacia della iodoprofilassi e il monitoraggio della frequenza dei nuovi casi di ipertiroidismo.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questi studi contribuiranno all'individuazione di possibili fattori di rischio modificabili la cui riduzione potrà contribuire alla prevenzione primaria dell'IC. Le attività dell'OSNAMI saranno di grande rilevanza per la prevenzione delle patologie conseguenti alla carenza nutrizionale di iodio.

Impact of female gender on major risk factors of cardiovascular disease and cancer and other chronic diseases: comparison of the women enrolled into the "moli-sani" project with two large Italian cohorts of women

Obiettivo dello studio è quello di valutare l'impatto dell'obesità e della sindrome metabolica come fattori di rischio delle malattie cardio-cerebrovascolari nelle donne italiane. A tal fine saranno utilizzate le coorti del progetto CUORE e confrontati i risultati con quelli raccolti nella coorte di donne arruolate più di recente nel progetto MOLI-SANI.

Attraverso la costruzione di un database confrontabile dei due progetti, l'aggiornamento del follow-up della coorte di donne del progetto CUORE con l'identificazione dei nuovi eventi coronarici e cerebrovascolari sospetti occorsi fino al 2004 da aggiungere a quelli già raccolti e la validazione con criteri diagnostici standardizzati, sarà possibile con analisi uni e multivariata, stabilire il ruolo eziologico di obesità e sindrome metabolica verso le malattie cardio-cerebrovascolari nelle donne. Indagini preliminari, già condotte sulla sindrome metabolica nelle

coorti del progetto CUORE, hanno identificato solo nelle donne un ruolo importante della trigliceridemia e dell'HDL-colesterolemia nella predizione delle malattie cardio-cerebrovascolari. È quindi prioritario valutare il ruolo eziologico e indipendente di obesità e sindrome metabolica nella predizione delle malattie cardio-cerebrovascolari nelle donne in modo da poter includere questi fattori negli strumenti di valutazione del rischio da applicare nella pratica clinica.

Risultati attesi nel triennio

Studio della relazione tra componenti della sindrome metabolica (trigliceridemia, glicemia, HDL-colesterolemia, pressione arteriosa, obesità) come variabili dicotomiche (presenza o assenza della condizione in eccesso), come variabili continue e sviluppo di malattie cardio-cerebrovascolari nelle donne, secondo i diversi livelli socio-economici. Confronto della distribuzione dei fattori di rischio e delle condizioni a rischio in due popolazioni generali osservate a dieci anni di distanza.

Trasferibilità dei risultati

Contributo all'aggiornamento della carta del rischio cardio-cerebrovascolare delle donne; possibile inserimento di nuove variabili.

Indagine sulla prevalenza di HBsAg tra le gestanti in Italia

La trasmissione perinatale del virus B dell'epatite ha come assai frequente conseguenza la cronicizzazione dell'infezione. L'obiettivo di interrompere il ciclo della trasmissione verticale può essere raggiunto vaccinando i nati da madre HBsAg positiva, e a questo fine si rende necessario lo screening per HBsAg di tutte le partorienti.

In Italia, dal 1985, è fortemente raccomandato lo screening delle gestanti durante l'ultimo trimestre di gravidanza. Dal 1991 lo screening è diventato obbligatorio. Ai nati da madre HBsAg positiva vengono somministrate alla nascita immunoglobuline + vaccino.

Scopo di questo studio è valutare l'efficacia di questa politica di vaccinazione su un campione di gestanti.

Inoltre, poiché in Italia, come in altri Paesi europei, esiste un importante flusso immigratorio dai Paesi in via di sviluppo, è importante anche valutare l'efficacia del programma sui nati da madre straniera.

Uno studio simile a quello che si propone, è già stato condotto nel 2001; a sette anni di distanza, appare opportuno andare a verificare se e come sia cambiata la situazione, anche alla luce del maggior numero di donne che sono vaccinate per legge.

La popolazione in studio sarà costituita da tutte le gestanti che partoriranno consecutivamente negli ospedali pubblici e privati. Gli ospedali verranno scelti in base alla partecipazione spontanea.

Risultati attesi nel triennio

Percentuale di donne che hanno effettuato lo screening per HBsAg prima del parto. Caratterizzazione delle gestanti non screenate, anche in riferimento al luogo del parto. Prevalenza di HBsAg tra le gestanti, nel complesso e separatamente per italiane e straniere; tra le straniere verrà poi valutata anche la prevalenza per area geografica di provenienza e per nazione, dove lo consentirà la numerosità delle gestanti reclutate.

Frequenza dell'attuazione della profilassi attraverso immunoglobuline e vaccino, nei nati da madre HBsAg positiva.

Trasferibilità dei risultati

Valutare la reale applicazione della legge che prevede lo screening per HBsAg obbligatorio nelle gestanti. Valutare l'attuazione della profilassi nei nati da madre HBsAg positiva. Queste

valutazione vanno fatte nell'ottica di individuare eventuali carenze riguardo la copertura dello screening e la profilassi nei bambini.

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 principali attività di ricerca-azione sono relative alla partecipazione italiana a quelle concordate a livello europeo e formalizzate attraverso il Progetto "ECHIM" *European Community Health Indicators and Monitoring* – Commissione Europea e ECHIM2.

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 collaborativo già collaudato e l'attivo 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). Le attività dinamiche ECHIM sono rivolte all'implementazione dei modelli, dei sistemi e degli indicatori identificati nelle fasi precedenti. In stretta collaborazione e attivo coordinamento con Eurostat, WHO, OCSE e Commissione Europea i contributi forniti dal Reparto Salute della popolazione del CNESPS confronteranno il grado di integrazione della *core list* ECHIM negli standard nazionali di monitoraggio di 16 Stati membri (Europa meridionale e bacino mediterraneo) ai fini della definizione dello standard europeo di monitoraggio dello stato di salute dei cittadini europei. Attraverso la progettualità e le competenze nazionali coordinate dall'ISS si completerà la valutazione esaustiva delle fonti disponibili, delle basi di dati esistenti, dei gaps esistenti rispetto al formato e alle definizioni di indicatori stabiliti dalla *short list* dell'ECHIM e alla produzione successiva dei dati nazionali da far confluire sul Portale europeo *Knowledge and Information System*. I nuovi dati nazionali prodotti, relativi a tutti gli Stati membri, continueranno a confluire sul Portale europeo *Knowledge and Information System* secondo modalità concordate di *reporting* periodico dello stato di salute della popolazione. Proseguirà in collaborazione con il CDC di Atlanta un progetto sul *Burden of Disease* semplificato ad integrazione delle attività dei due progetti attivati nel 2008 nell'ambito del Sistema Nazionale di Verifica e controllo dell'Assistenza Sanitaria (SIVeAS). Sempre nel SIVeAS si proseguirà nel progetto Validazione europea indicatori della qualità dell'assistenza: saranno definite e approntate le metodologie degli strumenti idonei alla realizzazione di uno o più database utili all'elaborazione delle valutazioni di merito del progetto; sarà attivata la rete di contatti europei istituzionali e governativi favoriti dal Gruppo di Ricerca europeo ECHIM.

Le attività del nuovo Progetto "ECHIM II" *European Community Health Indicators and Monitoring – Public Health Programme* proseguiranno per l'intero triennio e garantiranno l'implementazione reale delle attività ECHIM delineate dal meeting europeo ECHIM ospitato presso il CNESPS (<http://www.echim.org/docs/ECHIM4/echim4min.pdf>) e dal contributo metodologico all'attuazione della *survey* europea prodotta dal Reparto Salute della popolazione (<http://www.echim.org/docs/ECHIM4/pres3.pdf>). Verrà applicata agli Stati membri la metodologia già preventivamente attuata in una *survey* europea con le controparti governative di 32 Stati membri (http://www.echim.org/docs/echim_contact.pdf) attraverso un questionario e incontri bilaterali svolti in Lussemburgo (<http://www.echim.org/docs/WP5/pres4.pdf>) per la validazione e applicazione nel periodo 2009-2010. Attraverso la costituzione di un gruppo di lavoro coordinato dal Reparto Salute della popolazione attraverso una modalità già sperimentata nel corso del Progetto SINDIS e l'attivo coinvolgimento di ISTAT, Ministero della Salute, CCM, Università, Agenzia per i Servizi Sanitari Regionali i dati nazionali prodotti nei singoli Stati

membri confluiranno sul Portale europeo *Knowledge and Information System* secondo modalità concordate di *reporting* periodico dello stato di salute della popolazione che consentano, a regime, la piena comparabilità delle informazioni come previsto dal *report* finale dell'intero progetto pubblicato nel corso del 2008 secondo le modalità e le tematiche concordate (http://www.echim.org/docs/echim_finalreport_contents.pdf).

Il gruppo di ricerca ECHIM attivo presso il Reparto Salute della popolazione del CNESPS continuerà a garantire anche un ruolo di coordinamento nell'ambito di un Network europeo di cinque *public Health Institute* (dettagli sul sito http://europa.eu.int/comm/health/ph_projects/2004/action1/action1_2004_02_en.htm) assicurando alla Commissione Europea la verifica e l'applicabilità del sistema di monitoraggio ECHIM negli Stati del Sud-Europa. Le ricadute per l'ISS sono prevedibili in un ulteriore consolidamento della *leadership* europea nel settore del monitoraggio della salute per indicatori e del ruolo centrale dell'ISS, su mandato della Commissione Europea, nell'*assessment* e nella valutazione di implementabilità del sistema e degli indicatori per tutti e 25 gli Stati membri e nel ruolo di primo piano nella definizione delle finalità, delle funzioni e delle procedure relative all'*Health Monitoring*, ispirata al CDC ma dedicato agli aspetti di più ampio respiro di salute pubblica. A tale riguardo goveranno anche le attività nazionali già programmate:

- Progetto SIVEAS, “Validazione e comparazione Italia/EU degli indicatori LEA-SIVeAS”, anni 2008-2011.
- Progetto SIVEAS, “Strumenti flessibili per determinare le priorità sanitarie”, anni 2008-2011. Costruzione di uno strumento flessibile basato su web, basato su un database di patologie e fattori di rischio, per ciascuno dei quali si ricavano una serie di quantità epidemiologica, che vengono usate per calcolare le priorità.
- Progetto CCM Centro Controllo Malattie “Raccolta e analisi centralizzata di flussi informativi e dati per il monitoraggio dell'impatto dell'uso e abuso di alcol sulla salute in Italia, in supporto alla implementazione delle attività del Piano Nazionale Alcol e Salute”. Anno 2009.

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*.

Risultati attesi nel triennio

- Identificazione, definizione e implementazione dei modelli, dei sistemi e degli indicatori utili al monitoraggio dello stato di salute nella popolazione
- Definizione dello standard europeo di monitoraggio dello stato di salute dei cittadini europei
- Standardizzazione delle modalità 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 Commissione Europea, nell'*assessment* e nella valutazione di implementabilità del sistema e degli indicatori per tutti e 25 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 dedicato agli aspetti di più ampio respiro di salute pubblica come peraltro testimoniato dalla futura prosecuzione delle attività. I risultati sono ampiamente trasferibili ai contesti europei, nazionali e regionali. Le attività consentiranno di finalizzare lo standard europeo di

monitoraggio dello stato di salute dei cittadini europei e di garantire il trasferimento delle modalità standardizzate di rilevazione epidemiologica dello stato di salute insieme alle modalità di *Health Reporting* europeo periodico condivise dagli Stati membri. 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 EU di *Public Health* e attraverso l'implementazione nazionale dello standard europeo.

Indicatori per il controllo del cancro in Italia

L'impatto a livello di popolazione delle attività di controllo del cancro (prevenzione, diagnosi precoce, ricerca clinica e traslazionale, biotecnologie) deve essere appropriatamente sorvegliato attraverso i maggiori indicatori di frequenza (incidenza, prevalenza e mortalità) e *outcome* (sopravvivenza). Per questa ragione è importante assicurare la disponibilità di tali indicatori sia a livello nazionale che sistematicamente nelle regioni italiane. I registri tumori di popolazione sono la principale sorgente di dati per la sorveglianza epidemiologica del cancro. Nel nostro Paese i registri tumori coprono tuttavia al momento attuale circa il 25% della popolazione nazionale, con una diffusione sul territorio sbilanciata verso il nord e il centro.

I dati dei registri possono però essere utilizzati per la produzione di indicatori sistematici (incidenza, prevalenza, sopravvivenza e mortalità) a livello sia nazionale che regionale, per proiezioni temporali a breve e medio termine.

Attraverso modelli statistici i dati di incidenza e sopravvivenza forniti dai registri tumori vengono integrati con i dati di mortalità ISTAT per stimare i rischi di malattia e di morte e la loro evoluzione temporale. Un recente esempio di questo tipo di analisi è dato dal numero monografico di Tumori (2007) con stime e proiezioni per sei sedi tumorali.

Nel futuro, il numero di sedi dovrebbe essere sistematicamente ampliato. Inoltre, per essere efficace, questa attività deve essere mantenuta aggiornata incorporando via via tutti i dati più recenti che i registri mettono a disposizione.

Infine, poiché tali informazioni sono richieste anche da medici, mezzi di informazione, associazioni di pazienti e pubblico generale, vanno potenziati i mezzi di diffusione e disseminazione, particolarmente in rete web.

Risultati attesi nel triennio

Produzione di stime di sopravvivenza in Italia e analisi comparativa con gli altri Paesi europei. 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. Estensione delle stime a due ulteriori sedi tumorali (cervice uterina, melanoma). Analisi sistematica dei trend di incidenza, prevalenza e mortalità.

Contribuire allo sviluppo e al mantenimento del sito web per la diffusione dei dati essenziali agli operatori sanitari e al pubblico (www.tumori.net).

Trasferibilità dei risultati

Valutazione delle politiche sanitarie per il controllo delle malattie tumorali. Indicatori per la valutazione di impatto degli screening oncologici (mammella, cervice uterina e colon-retto). Trasferibilità alle Regioni e agli organi dell'SSN.

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 (v. obiettivo 1) 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.

Informatizzazione del sistema routinario delle segnalazioni e notifiche delle malattie infettive (SIMIWEB) e formazione a cascata sulla analisi dei dati di sorveglianza

Il sistema di notifica dati routinari per la sorveglianza delle malattie infettive e delle sorveglianze speciali è affidato alle singole Regioni che devono far per pervenire agli organi competenti le informazioni relative ai casi individuali o aggregati secondo le specifiche del DM del 15/12/1990. Ogni Regione ha provveduto, nel tempo, a organizzarsi con sistemi informatici propri o utilizzando il SIMI2, un software sviluppato dall'ISS come sperimentazione a partire dal 1994 e poi entrato nell'uso comune in diverse Regioni italiane. La diffusione dei computer e della rete Internet ha permesso oggi di creare un nuovo sistema di raccolta dati basato su un server web (SIMIWEB) facilmente accessibile a tutti i livelli di segnalazione inclusi i medici di medicina generale, i pediatri di libera scelta e gli ospedali. È prevista una piena interoperabilità con il PREMAL, il nuovo sistema informativo del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali.

Questa attività non è un puro sviluppo di un software, ma un'attività scientifica in cui vengono prioritizzati i bisogni informativi per il controllo e la prevenzione delle malattie infettive in Italia.

A marzo 2009 le Regioni Veneto, Abruzzo e Valle d'Aosta usano il SIMIWEB per la gestione delle notifiche di malattie infettive. Contemporaneamente viene portato avanti un

progetto di addestramento a cascata sulla analisi dei dati di sorveglianza raccolti attraverso sistemi informativi per le malattie infettive.

Risultati attesi nel triennio

- Dimostrazione dei vantaggi di un sistema di segnalazione/notifica basato sull'immissione dati eseguita dai medici segnalatori (flusso informativo).
- Un sistema (SIMIWEB) evoluzione del SIMI2 basato su un sito web che permetta di raccogliere tutte le notifiche di malattie infettive di tutte le classi, con possibilità di inserimento a vari livelli e gestione dei casi sospetti.
- Integrazione con i flussi di sorveglianza speciale e gli altri sistemi informativi delle Regioni.
- Produzione di materiale per la preparazione di un corso regionale per la sorveglianza epidemiologiche delle malattie infettive e l'uso dei dati di sorveglianza.
- Realizzazione di una piattaforma per l'interrogazione di diversi server collegati per ottenere delle tabelle in tempo reale per la diffusione delle malattie infettive.

Trasferibilità dei risultati

Questa attività si basa su una attività cardine del sistema di sorveglianza delle malattie infettive in Italia e i suoi obiettivi e risultati sono, per definizione, strettamente correlati all'SSN.

Il software è messo a disposizione delle Regioni che ne vorranno fare uso routinario.

Il corso preparato per la formazione a cascata è stato disegnato per l'uso a livello delle Regioni italiane e comprende tutto il materiale disponibile.

Interazione Gene-ambiente e marker di Neurosviluppo nelle prepSicosi e depressione: uno Studio integrato multidisciplinare (GENESIS)

Le psicosi maggiori sono patologie sempre più comuni nella popolazione giovanile con effetti devastanti sul funzionamento e l'autonomia personale, rappresentando un alto costo per la comunità. L'individuazione di *marker* genetici e neurobiologici delle psicosi maggiori permetterebbe la diagnosi precoce dei pazienti, con la possibilità di migliorare la prognosi. Il nostro obiettivo è quello di approfondire l'interazione geni-ambiente e i *marker* neurobiologici delle psicosi, studiando pazienti e gemelli pediatrici.

Questo progetto, di durata biennale, nasce da una collaborazione tra il Reparto di Epidemiologia genetica dell'ISS, l'Università degli Studi di Udine e la Libera Università "Vita Salute S. Raffaele" di Milano, ed è stato proposto nell'ambito del Bando per Giovani Ricercatori. La popolazione in studio sarà costituita da: i) una coorte di 600 pazienti bambini/adolescenti già caratterizzati dal punto di vista clinico e socio-demografico, i quali saranno rivalutati per problemi comportamentali ed emozionali; ii) una coorte di circa 1.500 coppie di gemelli, arruolate nel Registro Nazionale Gemelli dell'ISS, di età 8-25 anni, che saranno esplorate per la presenza di tratti psicotici. I pazienti, i gemelli a rischio di psicosi e i gemelli a basso rischio (che fungeranno da controlli) verranno sottoposti ad una caratterizzazione clinica, genetica, immunologica, cognitiva e di *imaging*. Ci aspettiamo, nello specifico, di reclutare 30 bambini/adolescenti a rischio, 20 coppie gemellari a rischio alto e 20 a rischio basso. In concomitanza, verrà studiato con le stesse metodiche un campione comparativo di pazienti adulti già caratterizzati dal punto di vista socio-demografico e clinico, composto da 20 pazienti con disturbo bipolare, 20 pazienti con schizofrenia e 20 controlli sani.

Risultati attesi nel triennio

Nel presente progetto di ricerca intendiamo studiare, mediante un'applicazione multimodale di Risonanza Magnetica, i substrati morfo-funzionali in soggetti ad alto rischio di sviluppare psicosi maggiori e correlarli, in un'ottica multidisciplinare, con indici genetici, neuropsicologici e immunologici, validando queste analisi in un gruppo comparativo di pazienti adulti con

schizofrenia o disturbo bipolare. Esploreremo la connettività cerebrale che sottende le capacità immaginative da un punto di vista: i) anatomico mediante RM strutturale e *diffusion tensor imaging* (DTI), ii) biochimico mediante RM spettroscopica (MRS) e iii) funzionale mediante Risonanza Magnetica funzionale (fMRI). Approfondiremo inoltre la componente genetica, cercando di chiarire come i geni di suscettibilità alla malattia possano modulare eventuali patologie di connettività della sostanza bianca e del pensiero immaginativo. Infine, completeremo lo studio correlando i dati di imaging ad un'approfondita valutazione: i) neuropsicologica che includerà aspetti legati alle funzioni esecutive e al linguaggio e ii) immunologica ottenendo informazioni sull'assetto di citochine e chemochine.

Trasferibilità dei risultati

Questo studio potrà agire come modello per interventi di prevenzione precoce, riducendo potenzialmente la conversione a psicosi e le conseguenze nefaste delle psicosi maggiori sul neurosviluppo cerebrale e sul funzionamento generale in età adulta. Ci si aspetta che questo modello possa aiutare nel migliorare la diagnosi attraverso l'identificazione precoce di bambini/adolescenti a rischio di psicosi maggiori, e in ultima analisi ridurre i costi sanitari di presa in carico e trattamento dei disturbi psicotici e depressivi. Inoltre, la caratterizzazione genetica, cognitiva, immunologica e di *imaging* di pazienti a rischio e gemelli fornirà una valida informazione sull'interazione geni-ambiente e sui meccanismi neurobiologici delle psicosi, permettendo una migliore caratterizzazione della suscettibilità a sviluppare psicosi maggiori. Questo progetto rappresenta il primo programma gemellare sulle pre-psicosi in Italia. Parte di questo programma è già iniziato, ed è già stata effettuata una prima valutazione dei tratti psicotici su una coorte di gemelli giovani adulti del Registro Nazionale Gemelli.

Interferenti endocrini e funzionalità tiroidea

L'esposizione a pesticidi e fertilizzanti riguarda ampi strati della popolazione. L'assorbimento di queste sostanze può infatti avvenire secondo diverse modalità: diretta (produzione e uso nel settore agricolo); indiretta (esposizione in ambienti in cui i pesticidi vengono utilizzati); alimentare. Studi sperimentali hanno dimostrato che la tiroide rappresenta uno dei principali bersagli di alcuni interferenti endocrini i quali svolgono la loro azione interferente attraverso meccanismi d'azione che possono alterare la sintesi, il metabolismo e il trasporto degli ormoni tiroidei, possono sostituirsi a questi a livello recettoriale o possono indurre una risposta autoimmune tiroide-specifica. Nonostante l'esposizione a queste sostanze coinvolga ampi strati della popolazione sono pochi gli studi epidemiologici di tipo analitico condotti su campioni rappresentativi.

Risultati attesi nel triennio

Sulla base dei risultati preliminari di uno studio descrittivo condotto nella provincia di Caserta che ha messo in evidenza una più elevata frequenza di patologie tiroidee in soggetti con esposizione professionale a pesticidi e fertilizzanti, è stato avviato nella stessa zona un nuovo studio in collaborazione con il Dipartimento di BCN dell'ISS. Lo studio si propone di stimare il rischio di patologie tiroidee nei lavoratori agricoli e in soggetti residenti in aree urbane o rurali non professionalmente esposti. Per il raggiungimento degli obiettivi un campione randomizzato di 150 agricoltori e 300 non agricoltori verrà arruolato in concomitanza dei trattamenti delle colture. Utilizzando le informazioni socio-demografiche e lavorative raccolte tramite questionario e quelle relative ai marcatori di esposizione e di effetto, misurati attraverso esame delle urine e del sangue (pannello biochimico funzionalità tiroidea), e la valutazione clinica ed ecografia della funzionalità tiroidea, sarà possibile valutare se l'esposizione a sostanze chimiche di sintesi, quali pesticidi e fertilizzanti, interferisce con la funzione tiroidea attraverso diversi meccanismi d'azione.

Inoltre, nell'ambito di questo studio e di una indagine condotta nell'area fiorentina del Chianti e nella Provincia di Bolzano, sarà possibile valutare la presenza di un effetto sinergico sulla funzione tiroidea dovuto alla contemporanea esposizione a carenza iodica ambientale ed esposizione ad interferenti endocrini.

Trasferibilità dei risultati

Gli studi, per i quali si prevede una dettagliata caratterizzazione dei livelli di esposizione e degli effetti sulla ghiandola tiroidea, consentiranno di definire il rischio associato ad esposizioni professionali e non professionali. Inoltre, considerato l'elevato potenziale di esposizione a queste sostanze nella popolazione generale, sarà possibile promuovere strategie di prevenzione.

Interventi riabilitativi in oncologia: analisi dei percorsi ospedalieri dei pazienti oncologici

Nell'ambito del progetto "Definizione delle priorità di azioni di riabilitazione per i pazienti sopravvissuti al tumore" afferente al "Programma Integrato Oncologia (PIO): Interventi riabilitativi in Oncologia" (Programma per la ricerca oncologica – 2006 – Ministero della Salute), l'UO dell'Ufficio di Statistica (cap.508 – fasc. Q3E), si propone di analizzare i percorsi ospedalieri di pazienti oncologici lungo-sopravvissuti e i loro bisogni assistenziali.

La durata del progetto è triennale, 2008-2010.

L'obiettivo principale è valutare la possibilità di utilizzare i dati relativi alle Schede di Dimissione Ospedaliera (SDO) per descrivere i bisogni assistenziali e di cura dei pazienti oncologici lungo-sopravvissuti attraverso la descrizione dei loro "percorsi ospedalieri", ovvero le pratiche cliniche e chirurgiche cui vengono sottoposti, e attraverso l'analisi delle co-morbilità e dei rischi in competizione.

La SDO è lo strumento di raccolta delle informazioni relative ad ogni paziente dimesso dagli istituti di ricovero pubblici e privati in tutto il territorio nazionale, è compilata obbligatoriamente sia in caso di ricovero ordinario sia in caso di day hospital e viene trasmessa dalle Regioni al Ministero della Salute, che le colleziona in una base dati nazionale. Un accordo di collaborazione scientifica fra Ministero della Salute e l'ISS garantisce la possibilità di utilizzare tale base di dati per fini di ricerca in sanità pubblica. La base di dati SDO viene implementata ogni anno, attualmente i dati disponibili presso l'ISS si riferiscono a tutti i ricoveri avvenuti in Italia fra il 2001 e il 2005 (circa 12 milioni di ricoveri ogni anno).

Tra le informazioni incluse nella base di dati delle SDO vi sono le diagnosi e sintomi rilevanti, gli interventi chirurgici e le procedure diagnostico-terapeutiche effettuate durante il ricovero, la durata del ricovero, il tipo di ammissione e dimissione (trasferimento da/verso altra struttura, dimissione con/senza assistenza domiciliare, etc).

I dati sono anonimi, tuttavia attraverso un codice alfanumerico univoco è possibile identificare i ricoveri relativi ad uno stesso paziente, ed è quindi possibile ricostruire i "percorsi ospedalieri" di pazienti affetti da una specifica patologia tumorale, al fine di definire i loro bisogni assistenziali.

I risultati di questa analisi saranno posti a confronto con quelli provenienti dalle altre unità operative dello stesso progetto e dagli altri progetti afferenti allo stesso PIO, per valutare l'affidabilità e la potenzialità informativa della SDO in questo utilizzo in ambito di ricerca in sanità pubblica.

Risultati attesi nel triennio

Analisi dei percorsi ospedalieri di pazienti affetti da una specifica patologia tumorale, attraverso la descrizione degli interventi chirurgici e trattamenti terapeutici cui vengono sottoposti nel corso di cinque anni di osservazione (incrementabili agli anni che si renderanno

disponibili), attraverso la costruzione di indicatori più prettamente quantitativi sul numero di ricoveri, tipologia e durata.

Verifica della attendibilità e validità interna della SDO, anche attraverso un confronto con i risultati ottenuti dai progetti afferenti allo stesso PIO.

Verifica della possibilità di ottenere stime di incidenza e prevalenza per la patologia presa in esame.

Trasferibilità dei risultati

Verificare la possibilità di utilizzare una fonte routinaria come le SDO, con copertura nazionale, per ottenere informazioni sul follow-up clinico di pazienti affetti da una determinata patologia, è un risultato importante che può essere esteso allo studio di altre patologie. Tutte le patologie, che come alcune neoplasie, sono caratterizzate dalla necessità di ricovero ospedaliero per la diagnosi (perché richiedono una batteria di indagini strumentali o diagnostici che solo una struttura ospedaliera può offrire) o, per un trattamento chirurgico/terapeutico di elezione, possono essere adeguatamente studiate attraverso le SDO, descrivendo i “percorsi ospedalieri” dei pazienti che ne sono affetti, analizzando i loro bisogni assistenziali, evidenziando eventuali differenze sul territorio nazionale nella risposta offerta a tali bisogni.

Inoltre, la possibilità di utilizzare questa fonte con riferimento a lassi temporali sempre più ampi, offre anche l’opportunità di ottenere stime di incidenza per queste patologie. È quindi possibile, in una prospettiva futura di implementazione continua della base dati delle SDO, pensare di costituire degli osservatori permanenti in grado di fornire informazioni anche in termini di incidenza e prevalenza di determinate patologie.

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:

- Progetto IPREA (*Italian Project for Epidemiology of Alzheimer disease*)
- Progetto ILSA (*Italian Longitudinal Study on Ageing*)
- EERA-AGE – *Extended European Research Area in Ageing research*. Unione Europea, VI Programma Quadro di Ricerca
- ERA-NET – *European Research Area Network on Ageing research* Unione Europea, VII Programma Quadro di Ricerca.

Le attività di stretta natura epidemiologica sono dedicate all’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. Inoltre, parte delle attività è specificamente dedicata all’identificazione delle priorità di programmazione della ricerca europea finalizzata al miglioramento della condizione e dello stato di salute degli anziani e alla creazione di banche dati nazionali e di interscambio europeo anche attraverso una *Supported Action* già inoltrata alla DG *Research* nell’ambito del Programma Quadro di Ricerca: *HEALTH-AGE, HEALTHy AGEing in Europe: A multidisciplinary approach to identify common markers*.

Proseguirà l’attività progettuale del gruppo di ricerca nazionale attualmente incentrata sulla possibilità di promozione di un coordinamento dei programmi e progetti di ricerca italiani basati sulla *partnership* tra i differenti finanziatori della ricerca sull’invecchiamento (MIUR, Ministero

della Salute, IRCSS, ISS) è tesa allo scambio di buone pratiche che prendano l'avvio dalle conoscenze già acquisite contribuendo a garantire che i programmi di ricerca sull'invecchiamento siano sistematicamente inseriti nelle strategie di finanziamento nazionali/regionali. Le attività europee sono prevalentemente rivolte all'identificazione delle buone pratiche relative alla ricerca sull'invecchiamento in Europa, all'aggiornamento del database comune (<http://era-age.group.shef.ac.uk/database.php?country=6>) delle progettualità specifiche, all'identificazione delle priorità emergenti e oggetto di strategie nell'ambito dell'ERA-NET e del VII Programma Quadro di Ricerca (dettaglio alla pagina web <http://era-age.group.shef.ac.uk/>). L'attività progettuale del gruppo di ricerca nazionale è incentrata sulla valutazione dei programmi e progetti di ricerca italiani e attività correlate, promuovendo lo sviluppo di nuovi programmi interdisciplinari basati sulla *partnership* tra i vari Paesi, e sulla condivisione della buona pratica nel coordinamento e nella gestione di programmi nazionali di ricerca sull'invecchiamento (MIUR, Ministero della Salute, IRCSS, ISS). Il raggiungimento di questo obiettivo sarà verificato tramite produzione e diffusione di informazioni relative alla buona pratica, riunioni congiunte, confronto, intensificazioni di attività comuni e sviluppo di nuovi programmi che prendano l'avvio dalle conoscenze già acquisite contribuendo a garantire che i programmi di ricerca sull'invecchiamento siano sistematicamente inseriti nelle strategie di finanziamento nazionali/regionali (dettagli alla pagine web www.iss.it/binary/publ/publi/0404.1106653088.pdf).

Risultati attesi nel triennio

- 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 è coerente con gli obiettivi proposti e di valenza nazionale e transnazionale. La creazione di un database unico soggetto all'aggiornamento continuo dei dati relativi ai follow up delle coorti storiche ILSA, la disponibilità della banca biologica, genetica e di *neuroimaging* della nuova coorte IPREA e la costante collaborazione tra gruppi di ricerca internazionali hanno determinato la confluenza di tali attività in quelle del *Transatlantic Network on Ageing Issues* che coinvolge numerose nazioni europee e gli Stati Uniti (NIA-NIH) nella prospettiva di una ricerca collaborativa sull'invecchiamento di ampio respiro; l'ISS è l'unica istituzione di riferimento nell'ambito dell'*International Council ad hoc* costituito. A livello europeo i Progetti ERA-AGE e EERA-AGE nell'ERA-NET sono tra i più avanzati del Programma Quadro di Ricerca e verosimilmente si candideranno al prossimo *call* europeo sulle Malattie neurodegenerative con la coorte IPREA per lo studio europeo sulla Malattia di Alzheimer consolidando il ruolo dell'ISS nella rete di eccellenza già creata e che ha consentito la definizione delle linee strategiche comuni da seguire attraverso *joint-call* europei e un *consortium agreement* che garantisce la trasferibilità costante dei risultati agli utilizzatori finali: *policy maker, health professional*, utenti.

L'Etica della ricerca scientifica negli studi clinici e di popolazione

L'Etica della ricerca studia e cerca soluzioni ai problemi etici sollevati dalla pratica scientifica su esseri umani. Dagli iniziali principi che stabilivano le condizioni di eticità per studi con rischi non evitabili, è passata a dettagliare le prescrizioni sul rispetto dei diritti dei soggetti in studio e sulla deontologia degli scienziati. Seguendo un'utile distinzione proposta da Giovanni Berlinguer si può ricondurre l'Etica della ricerca alla Bioetica del quotidiano in

contrapposizione alla cosiddetta Bioetica di frontiera che affronta le questioni poste dalle innovazioni della bio-scienza.

L'Etica della ricerca è strettamente connessa alla metodologia scientifica, questo legame è riconoscibile anche nelle più recenti normative e linee-guida che spesso prescrivono procedure di salvaguardia etica secondo categorie collegate alla metodologia scientifica.

Peraltra normative e linee-guida rischiano di cristallizzare il ragionamento etico. La storia ci mostra che gli standard non sono immutabili e debbono essere riformulati per rispondere alle sollecitazioni della società che evolve e assicurare l'opinione pubblica a volte disorientata da scandali scientifici. A tale proposito questo progetto intende contribuire a una visione dinamica dell'etica della ricerca clinica e di popolazione attraverso la coniugazione delle istanze scientifiche con l'espressione attuale degli obblighi etici.

Risultati attesi nel triennio

Il lavoro di sintesi del dibattito etico nazionale e internazionale su ricerche cliniche e studi epidemiologici osservazionali servirà alla preparazione di aggiornamenti di quattro lezioni e tre esercitazioni per il Corso su Etica della ricerca scientifica: studi clinici, di popolazione, genetici. Tale corso è stato istituito nel 2007, con cadenza annuale, si occupa della protezione del soggetto di ricerca secondo le istanze a volte contrastanti della metodologia scientifica e dell'etica. L'obiettivo è di riuscire a rappresentare questi due aspetti non separatamente, ma secondo una analisi specifica e perciò originale degli snodi in cui sono articolati.

È prevedibile inoltre la realizzazione di indagini di Etica empirica, e la verifica della fattibilità di un secondo corso sull'etica applicata alla sanità pubblica.

Trasferibilità dei risultati

I componenti dei più di 300 comitati etici accreditati presso il Ministero della Salute sono chiamati a rispondere ai dilemmi etici posti dalla comunità scientifica. Ai ricercatori della sanità, opinione pubblica e normative richiedono un'accresciuta attenzione agli aspetti etici in ogni fase della ricerca. Per tutte queste persone può risultare importante un punto di vista che abbracci sia l'uno che l'altro settore. Il successo di questo approccio è dimostrato dall'ampia produzione letteraria presente sia in riviste a carattere umanistico che scientifico che dal successo delle due edizioni del Corso di Etica della ricerca.

Le attitudini, le motivazioni, il consenso dei partecipanti alla ricerca e alla donazione per le banche biologiche

La ricerca genetica e le banche biologiche come strumenti necessari per la conduzione di molti studi sono in veloce sviluppo. A livello internazionale si sta sviluppando un vasto dibattito sulla partecipazione dei soggetti alla ricerca genetica, sulle motivazioni alla partecipazione, 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 etico-legale, è necessario approfondire queste tematiche nel contesto della ricerca in Italia. Il progetto realizzerà ricerche empiriche (soprattutto con uso di questionari e interviste) su diversi campioni di popolazione per indagare l'attitudine e le motivazioni che spingono gli individui a partecipare e a donare materiale biologici per la ricerca. Relativamente a questo, si intende indagare i fattori di interesse e di preoccupazione dei donatori (consenso informato, *privacy* e confidenzialità, obiettivi del singolo studio, *feedback*), la consapevolezza e la disponibilità a delegare decisioni ai Comitati Etici per l'uso e il riuso dei campioni. Disponendo di popolazione gemellare ad ampia copertura nazionale (Registro nazionale gemelli) ci si orienterà ulteriormente allo studio delle correlazioni genetiche per i tratti di interesse di questo filone di ricerca (es. attitudine pragmatica o attitudine moralista alla donazione).

Risultati attesi nel triennio

Sviluppare una comprensione basata su evidenze empiriche della attitudine di vari gruppi di popolazione alla partecipazione alla ricerca scientifica di tipo genetico, 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, soggetti affetti da patologia, minorenni (genitori) ecc.

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 della 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 Commissione Europea impegnata nella definizione e nell'aggiornamento delle raccomandazioni e delle linee guida per la ricerca che fa uso di materiale biologico.

Malattie Neurodegenerative – Studio sulle angioplastiche coronariche e del Registro italiano per lo Stenting Carotideo

Un gruppo costituito da quattro studi analitici di esito: “*IN-ACS Outcome – Italian Network on Acute Coronary Syndromes*” – Epidemiologia clinica e *outcome* dei pazienti con sindromi coronariche acute ospedalizzati in Italia; “*OSCAR*” – *Outcome Survey* sui Centri che eseguono Angioplastiche coronariche: Risultati a un anno per valutare la Qualità; “*RISC*” – Registro Italiano dello Stenting Carotideo; “*Mattone Outcome – BYPASS*” – Metodi di *Risk-Adjustment* per la valutazione degli esiti a breve termine di interventi di Bypass aortocoronarico, definiti “sperimentazioni” del progetto “*Mattoni dell’SSN – Misura dell’Outcome*” e successivamente integrati nel programma PROGRESSI, hanno il compito di rispondere a importanti quesiti relativi agli studi osservazionali per la valutazione degli esiti.

Le quattro sperimentazioni sono state disegnate come studi prospettici multicentrici a partecipazione volontaria. Nei centri coinvolti, per ogni paziente che abbia soddisfatto i criteri di eleggibilità specifici di ciascuno studio, è stata condotta un'indagine prospettica con la raccolta sistematica di un set minimo di informazioni cliniche, anatomiche e procedurali standardizzate, utili a definire il profilo di rischio del paziente e della eventuale procedura o terapia adottata; la raccolta degli esiti specifici relativi a ciascuno studio; il confronto, mediante verifica incrociata, degli esiti oggetto dello studio rilevati clinicamente con i dati da sistemi informativi correnti rilevati dagli organi competenti regionali a partire dalle procedure o diagnosi indice individuate tramite i codici SDO. Per tutti gli studi, la raccolta dati si è conclusa il 31 dicembre 2008.

Risultati attesi nel triennio

Verranno prodotti risultati clinici pertinenti a ciascuno studio clinico, secondo quanto stabilito nei rispettivi protocolli di studio.

Da un punto di vista più strettamente legato alle metodologie adottate negli studi osservazionali di valutazione degli esiti su database amministrativi, i risultati definitivi di queste quattro sperimentazioni permetteranno di valutare:

- il contributo al confronto tra le informazioni disponibili da sistemi informativi correnti (SDO) e quelle più specifiche e di maggiore validità clinica raccolte dai singoli progetti, nelle procedure di *risk-adjustment*;

- l'opportunità di introdurre variabili cliniche aggiuntive nei sistemi informativi correnti, al fine di migliorare le stime di esito attualmente ottenibili in modo routinario;
- l'affidabilità delle procedure di follow-up da sistemi informativi correnti;
- la definizione del ruolo dei registri di patologia nella validazione delle misure comparative di esito.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questo progetto saranno utili alle società scientifiche coinvolte e ai singoli professionisti per le loro valutazioni interne relativamente alla qualità delle prestazioni fornite ai cittadini; saranno di fondamentale importanza anche per i decisori politici, sia a livello regionale sia a livello centrale, nella preparazione dei propri piani di attività. Permetteranno, inoltre, di stabilire quanto i sistemi informativi correnti possano essere utilizzati quale strumento scientifico per rispondere a quesiti specifici relativi alla valutazione comparativa degli esiti di interventi sanitari e quanto possa essere invece indispensabile affinare il sistema con una opportuna integrazione di variabili prettamente cliniche.

Mantenere e tutelare la salute sessuale e riproduttiva dei giovani in collaborazione con gli operatori dei Consultori Regione Toscana, Emilia Romagna, Sicilia e Liguria

Progetto rivolto agli studenti maschi e femmine delle scuole medie superiori che ha come scopo quello di mantenere e tutelare la loro salute sessuale. Il progetto si realizzerà attraverso incontri con i responsabili dei vari consultori giovanili coinvolti e con gli studenti delle classi seconde degli Istituti che hanno aderito al progetto. Durante gli incontri sarà fornita la possibilità, ai ragazzi autorizzati dai genitori, di effettuare una visita andrologica o ginecologica.

Risultati attesi nel triennio

Aumento delle conoscenze da parte dei giovani delle classi seconde delle scuole medie superiori coinvolte riguardo ai Servizi che si occupano di tutela della salute sessuale giovanile, alla diagnosi precoce di malattie dell'apparato riproduttivo maschile e femminile e alla prevenzione dell'infertilità e delle patologie maschili e femminili.

Trasferibilità dei risultati

L'interazione con i ragazzi, utenti principali della formazione e informazione fornita dal progetto riguardo le tematiche sessuali, può fornire ulteriori spunti per progetti sempre più rispondenti alle esigenze dei giovani circa le tematiche affrontate.

Messa a punto di un intervento di promozione della salute mentale nelle scuole, con particolare attenzione alla prevenzione primaria della depressione

Obiettivi del progetto sono la messa a punto di un intervento di promozione della salute mentale nelle scuole basato su un manuale rivolto agli studenti e la valutazione in una applicazione pilota della sua capacità di raggiungere gli obiettivi di miglioramento delle abilità di comunicazione, di cooperazione, di definizione e raggiungimento di obiettivi, di soluzione dei problemi, di controllo degli impulsi e di empatia degli studenti partecipanti.

Il Programma si articola nelle seguenti fasi:

- Messa a punto del manuale per studenti del primo biennio delle scuole secondarie superiori
- Analisi e scelta degli strumenti di valutazione dell'intervento
- Messa a punto dell'intervento formativo per i conduttori (studenti universitari o neolaureati)
- Messa a punto dell'intervento formativo per gli insegnanti supervisor
- Stesura e diffusione dei risultati

Metodi

- i) completamento della prima stesura del manuale per gli studenti dove vengano illustrati, con linguaggio semplice e con esempi adatti alla cultura giovanile, i principi e gli strumenti pertinenti agli obiettivi, vengano suggerite esercitazioni a due, a tre e in piccolo gruppo e raccomandato ai partecipanti di commentare in modo costruttivo le prestazioni di chi più si espone nelle esercitazioni; ii) revisione della stesura da parte di “esperti”; iii) prova pilota in quattro classi; iv) valutazione di gradimento e apprendimento da parte degli studenti.
- esame e scelta degli strumenti per la valutazione dell’efficacia del programma fra quelli proposti per valutare l’intelligenza emotiva e il benessere psichico, il sostegno sociale e la presenza di depressione. Per ogni incontro venga anche chiesto agli studenti di rispondere a due domande sull’utilità e la piacevolezza dell’incontro.
- i) stesura del manuale per conduttori; ii) *focus group* con potenziali conduttori; iii) revisione del manuale; iv) effettuazione di un corso per conduttori; v) valutazione del gradimento e dell’apprendimento.

Risultati attesi nel triennio

I risultati verranno comunicati, oltre che come relazione al committente, alla comunità scientifica sotto forma di articoli scientifici e anche in modo sintetico e divulgativo agli allievi, ai genitori e gli insegnanti delle scuole coinvolte e ad altri parti interessate. Verranno predisposte apposite pagine sul sito web del CNESPS e del Ministero della Salute.

Trasferibilità dei risultati

Tra le ricadute vi è indubbiamente la disponibilità dei manuali suddetti. Disponibilità e diffusione di dati sulla fattibilità di un programma per migliorare 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.

Disponibilità di elementi conoscitivi utili alla pianificazione e valutazione di attività di promozione della salute nelle scuole.

Miglioramento della sorveglianza delle tossinfezioni alimentari

In Italia, le tossinfezioni alimentari (TA) vengono segnalate nell’ambito del sistema di notifica obbligatoria delle malattie infettive coordinato a livello nazionale dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, a cui afferiscono sia le segnalazioni da parte dei Servizi di Igiene Pubblica (SISP) che le sorveglianze speciali condotte da Centri nazionali di Referenza o dall’ISS. A questi si affiancano le attività di monitoraggio e controllo dei Servizi di Igiene degli alimenti e della nutrizione (SIAN) territoriali e dei Servizi Veterinari. I dati relativi alle notifiche obbligatorie hanno il vantaggio di riferirsi ad un lungo periodo di tempo, con la disponibilità di lunghe serie storiche, e di essere riferiti all’intera popolazione nazionale. Tuttavia, questi dati sono spesso fortemente distorti sia dalla mancata diagnosi eziologica, che dalla sottonotifica; inoltre, la trasmissione delle informazioni spesso è poco tempestiva e non consente di attuare le indagini di campo necessarie per stabilire la fonte e le modalità di trasmissione (ad esempio, iniziale fonte alimentare, seguita da trasmissione interumana). In particolare, la mancata diagnosi eziologica è attribuibile ad uno scarso ricorso ad accertamenti di laboratorio in caso di sintomatologia compatibile con TA (vomito, diarrea, dolori addominali).

Risultati attesi nel triennio

- Definizione del livello di sottonotifica delle TA nell’uomo attraverso la valutazione del sistema di sorveglianza esistente individuando indicatori quantitativi e qualitativi.
- Stima dell’impatto delle TA sostenute da agenti eziologici a trasmissione alimentare, o attraverso altri veicoli (es. acqua) o interumana.

- Valutazione delle capacità di laboratorio a livello regionale per agente responsabile di TA (batteri, virus, parassiti intestinali).
- Identificazione e censimento dei laboratori di riferimento regionale di secondo livello per migliorare l'accertamento diagnostico ed etiologico.
- Sviluppo di protocolli di indagine di consenso con le strutture dell'SSN, che prevedano un set di procedure specifiche (indagine epidemiologica) da attivare in caso di TA, incluso il supporto di laboratorio (di primo e secondo livello) per identificazione e tipizzazione dei microrganismi responsabili.
- Sviluppo di piani di intervento rapidi per rintracciare e intervenire sulle fonti di esposizione per l'uomo (alimenti, acqua, portatori sani e cronici).

Trasferibilità dei risultati

Tale progetto si inserisce in un contesto di attività già esistenti a livello nazionale e comunitario. Esso può quindi costituire un'occasione per razionalizzare e ottimizzare i flussi informativi e le attività di controllo relative alle TA. Inoltre lo sviluppo di protocolli integrati per indagini di campo, attraverso la preparazione di protocolli d'intervento e la definizione delle strutture e dei soggetti di riferimento al livello regionale e nazionale, fornirà agli operatori sanitari presenti sul territorio un valido strumento per migliorare la sorveglianza epidemiologica delle TA.

Migrants and Ethnic health Observatory (MEHO)

MEHO *project*, è un progetto europeo lanciato nell'ambito degli *Health Monitoring Programme* con l'obiettivo di identificare e costruire nei vari Paesi una mappa di indicatori disponibili che definiscano i gruppi etnici. Il *Working Group 6* si occupa in particolare di definire questi indicatori nell'ambito delle malattie cardio-cerebrovascolari e del diabete. Identificati gli indicatori comuni per tutti i paesi sarà possibile valutare le differenze nella mortalità e nella frequenza delle malattie cardio-cerebrovascolari nonché nelle cure adottate nelle minorità etniche.

L'Italia, rispetto ad altri Paesi europei, ha la particolarità di essersi trasformato negli ultimi trenta anni da un Paese ad alta emigrazione ad un Paese ad alta immigrazione. Attualmente non si prevede un'alta frequenza di ricoveri o decessi per malattie cardio-cerebrovascolari e diabete, ma aumenti sono previsti in seguito all'inserimento e all'invecchiamento delle popolazioni di minorità etnica. Il progetto si prefigge anche di valutare le differenze nell'andamento di queste malattie nelle diverse minorità etniche (africane, asiatiche, est-europee).

Risultati attesi nel triennio

Partecipare ad un network europeo di ricercatori per costruire un inventario degli indicatori disponibili nei vari paesi identificando fonti e dati al fine di costruire un data base comune sulle malattie cardio-cerebrovascolari e sul diabete. In particolare valutare se esistono differenze nella frequenza di queste malattie nelle varie etnie e fra i vari Paesi allo scopo di ridurre le disuguaglianze.

Trasferibilità dei risultati

Ad oggi, in Italia, nelle principali fonti di dati istituzionali, disponiamo di un'unica informazione relativa alle etnie, che non fornisce una indicazione diretta e precisa e che può essere utilizzata solo come *proxy* dell'etnia: il luogo di nascita. Costruire un inventario con le possibili fonti di informazioni e indicatori in collaborazione con gli altri Paesi dell'Unione Europea può garantire per il futuro la raccolta di dati attendibili e la pianificazione di azioni di prevenzione.

Modelli di analisi della prescrizione farmaceutica a livello regionale

I principali elementi che hanno caratterizzato in Italia l'andamento della prescrizione farmaceutica nell'ultimo decennio hanno riguardato un incremento della spesa farmaceutica di circa il 10% l'anno e una rilevante variabilità regionale. Nel tentativo di contenere l'incremento di spesa sono stati via via adottati, a livello nazionale e regionale, diversi interventi (quali la revisione dei prezzi dei farmaci inclusi nel prontuario, l'introduzione del prezzo di riferimento per i farmaci generici, la distribuzione diretta da parte delle strutture pubbliche, le modalità di compartecipazione degli assistibili, ecc. Nonostante questi interventi, si è mantenuta inalterata la variabilità regionale nei livelli di prescrizione. La complessità del fenomeno dell'assistenza farmaceutica rende dunque necessaria un'analisi di molti fattori: dagli aspetti normativi sia nazionali che regionali, alle dinamiche prescrittive del mercato. Diverse Regioni dispongono da alcuni anni di sistemi di monitoraggio delle prescrizioni farmaceutiche che consentono di avere il dettaglio sul singolo paziente.

L'attività è finalizzata allo sviluppo di modelli per l'analisi della variabilità a livello di ASL e di équipe territoriale di medicina generale, alla produzione di rapporti periodici sull'andamento dei consumi farmaceutici, e alla predisposizione di database utili per la conduzione di studi sul profilo di sicurezza dei farmaci.

Questa attività è svolta in collaborazione con le Regioni dell'Umbria e del Lazio.

Risultati attesi nel triennio

L'obiettivo generale è quello di promuovere l'appropriatezza della prescrizione farmaceutica sia in ambito territoriale che ospedaliero, di stimare l'impatto sui livelli di prescrizione delle variazioni nelle modalità organizzative di erogazione dell'assistenza farmaceutica, e di migliorare le conoscenze relative al profilo di beneficio/rischio dei farmaci. Ciò sarà perseguito attraverso la realizzazione di una reportistica strutturata per le Regioni, quale strumento di base per l'analisi corrente degli andamenti della spesa e dei consumi farmaceutici, e per la valutazione degli interventi regolatori.

Trasferibilità dei risultati

I modelli sviluppati nell'ambito di questa linea possono essere adattati e utilizzati nelle diverse realtà regionali.

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. Le possibilità di applicazione sono numerose, tuttavia 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 e la Chikungunya che a malattie classiche come l'influenza stagionale. Inoltre, dovendo considerare l'efficacia di alcune misure di contenimento e di prevenzione per la pandemia influenzale è cruciale comprendere come la popolazione potrebbe spontaneamente comportarsi in caso di eventuale pandemia influenzale e se accetterebbe eventuali misure non farmacologiche che limitino la libertà di movimento della popolazione (quarantena, chiusura delle scuole e dei luoghi di lavoro non essenziali, ecc). Quindi nell'ambito del progetto è prevista la conduzione di una *survey* in quattro Paesi europei (Italia, Finlandia, Romania e Gran

Bretagna) per definire quali potrebbero essere i comportamenti della popolazione in caso di introduzione di misure di distanziamento sociale.

Risultati attesi nel triennio

- 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.
- Stimare il numero riproduttivo di base (R_0) e di altri parametri essenziali per meglio comprendere l'epidemia di Chikungunya che si è verificata nell'estate 2006 in Italia.
- Stima dei comportamenti pianificati sia spontanei che legati all'introduzione di misure di distanziamento sociale da parte delle autorità sanitarie nazionali e locali per una eventuale pandemia influenzale.

Trasferibilità dei risultati

I dati scaturiti dall'indagine sui comportamenti della popolazione in caso di pandemia influenzale saranno inseriti all'interno di un modello europeo di diffusione della pandemia (Progetto europeo FLUMODCONT) per descrivere dettagliatamente al livello internazionale e di singoli paesi l'impatto che una non compliance della popolazione rispetto a specifiche misure di distanziamento sociale potrebbe avere sulla diffusione della malattia.

MOMO “Euro MOMO – European Monitoring of Excess Mortality for Public Health Action”

Il Progetto europeo MOMO (*Mortality Monitoring*), si propone di mettere a punto un modello condiviso a livello europeo per la sorveglianza della mortalità ai fini della preparedness rispetto a situazioni di allarme (pandemia influenzale, eventi climatici estremi).

Esso coinvolge 18 Paesi europei e l'Ufficio di Statistica è l'unico partner italiano. L'ISS è leader del WP “*Inventory of the Existing Mortality Monitoring Systems*” di cui fanno parte, oltre all'Ufficio di Statistica, vari Paesi europei (quali Slovenia, Grecia e Regno Unito), che sta costituendo la base di dati sui Sistemi di Sorveglianza della Mortalità e i Sistemi di Raccolta Routinaria dei Dati di Mortalità in 31 Paesi (27 Paesi UE a cui si aggiungono Scozia, Svizzera, Norvegia, Islanda e Turchia). L'attività consiste in primo luogo nel costituire un network di persone che per ciascuno dei 32 Paesi siano i referenti per la raccolta routinaria (a scopo demografico) e per la sorveglianza della mortalità (a scopo di sanità pubblica). Viene poi condotta una *survey* – che si avvale di due questionari disegnati appositamente – per conoscere la situazione, rispetto ai sistemi suddetti, in ciascuno dei 32 Paesi oggetto dello studio. I dati raccolti verranno organizzati in una base di dati, appositamente disegnata, e analizzati per farne una sintesi. Essa sarà messa a disposizione – insieme ai dati originali – di tutti i partner del Progetto che potranno avvalersene.

Risultati attesi nel triennio

Conoscenza di tutti i Sistemi di Sorveglianza della mortalità e di raccolta routinaria esistenti a livello europeo.

Sviluppo di un prototipo di Modello Europeo di Sistema di Sorveglianza della Mortalità da sperimentare attraverso uno studio pilota.

Trasferibilità dei risultati

Una volta sperimentato il Sistema di Sorveglianza in un Paese europeo sarà possibile avviare tali sistemi nei paesi coinvolti nel progetto che intendano proporsi.

Nuove strategie per lo sviluppo di un vaccino profilattico e terapeutico per l'infezione da Virus dell'Epatite C

In conseguenza dei risultati per varie ragioni ancora soddisfacenti forniti dalla terapia con antivirali, la ricerca di un vaccino per la prevenzione dell'infezione da HCV rappresenta oggi un obiettivo primario. L'elevata difficoltà di sviluppare un vaccino anti-epatite C di tipo tradizionale, legata all'elevata variabilità genetica del virus, rende necessario ricorrere a strategie non convenzionali. Lo studio della storia naturale dell'infezione acuta da HCV è l'approccio più corretto per ottenere gli elementi di conoscenza necessari per la generazione di un efficace vaccino anti-HCV. Per cui, gli obiettivi principali dell'attività di ricerca proposta nell'ambito di questo progetto comprendevano e comprendono: i) studio prospettico dei fattori virali e dell'ospite nel corso dell'infezione acuta da HCV; ii) analisi della risposta immunitaria cellulo-mediata e definizione di correlati immunologici di risoluzione o cronicizzazione dell'infezione acuta; iii) generazione di un vaccino candidato di tipo genetico per il trattamento profilattico e terapeutico dell'infezione da HCV e studio dell'efficacia profilattica del vaccino candidato nel modello dello scimpanzé tramite vaccinazione e *challenge*; iv) Studio di fattibilità di un *trial* clinico di efficacia per la vaccinazione profilattica contro l'Epatite C, che si sostanzierà in uno studio d'incidenza in una popolazione ad alto rischio (tossicodipendenti afferenti ai Ser.T.; studio SIRECAT).

Risultati attesi nel triennio

Le prime tre attività sono state portate a termine consentendo un pieno raggiungimento degli obiettivi preposti. Stiamo ora portando a termine la quarta attività. A causa della bassa incidenza dell'infezione da HCV nella popolazione generale, per valutare l'efficacia del nuovo vaccino genetico sarebbe necessario saggiarlo in un gruppo di popolazione ad alto rischio d'infezione. In Italia il gruppo di popolazione più adatto allo scopo è rappresentato dai tossicodipendenti (TD) che fanno uso di droga per via endovenosa, tra i quali si sono rilevati in studi precedenti tassi d'incidenza alti ma variabili. La quarta attività, propedeutica all'esecuzione di un *trial* d'efficacia con vaccino anti-HCV, consiste in uno studio prospettico sull'incidenza dell'infezione da HCV in un rappresentativo ampio campione di TD italiani. La stima dell'incidenza in tale campione è cruciale per determinare poi il numero di soggetti a cui somministrare il vaccino in un *trial* vaccinale d'efficacia. La necessità di reperire un largo campione di TD, reclutati presso i SerT operanti nelle varie parti del Paese, è dovuta alla grande variabilità dei tassi d'incidenza fin qui riportati nelle varie regioni italiane. Si è previsto così di reclutare almeno 1.000 TD presso 18 SerT distribuiti nel nord, centro e sud dell'Italia comprese le isole maggiori. Dopo il reclutamento, della durata di 6 mesi, è previsto un follow-up di 12 mesi durante il quale le nuove infezioni saranno rilevate mediante test anti-HCV e HCV RNA eseguiti ad intervalli di sei mesi. In questo studio è inoltre previsto un *counselling* sulle infezioni da virus epatitici e la somministrazione del vaccino anti-epatite B e/o anti-epatite A. Finora sono stati reclutati 377 TD anti-HCV negativi.

Trasferibilità dei risultati

Lo studio potrà avere importanti ricadute sulla possibilità di un'efficace prevenzione ed eventualmente terapia dell'infezioni da HCV in fase acuta e cronica

Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare (OEC)

Obiettivi dell'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare (OEC) sono: descrivere alcune caratteristiche individuali riconosciute come fattori di rischio quali le abitudini di vita, la prevalenza di condizioni a rischio, la prevalenza delle malattie cardio-cerebrovascolari per le quali è necessario intervenire in termini preventivi, diagnostici, terapeutici e assistenziali, e studiare gli andamenti temporali su campioni statistici rappresentativi della popolazione generale di età 35-79

anni. Sarà arruolato un campione di 10.000 individui di età compresa fra 35 e 79 anni (un campione di 220 persone ogni milione e mezzo di abitanti, con la condizione che ogni regione abbia almeno un campione, anche se la popolazione fosse di numerosità inferiore).

Verranno 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. Verranno 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 con determinazione di sodio, potassio, creatinina urinaria.

Verranno prelevati e conservati campioni biologici delle persone arruolate (siero, plasma, *buffy coat*, emazie impaccettate 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 cardiovascolari, della prevalenza delle condizioni a rischio e delle malattie cardio-cerebrovascolari.

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 nelle misurazioni e nella raccolta dei dati. Utilizzando i dati raccolti nelle due indagini sarà 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 2009-2011 saranno pubblicati e disponibili nel sito web del progetto CUORE per le singole regioni, per macro-aree e per l'Italia nel suo complesso (www.cuore.iss.it).

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 nazionale 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 ed interpretare i fattori principali che possono influenzarne la variabilità.

PATED (Procedure per Analisi Territoriale di Epidemiologia Descrittiva) nell'ambito di "Valorizzazione di fonti e flussi informativi"

Nell'ambito di un Progetto del Ministero della Salute viene coordinato lo sviluppo – da parte di Unità Operative esterne all'ISS – di software per analizzare e rappresentare graficamente varie tipologie di dati attinenti alla salute (mortalità, ricoveri ospedalieri ecc.) e la sperimentazione di un sistema di acquisizione ed analisi a scopo epidemiologico degli accessi alle strutture di Pronto Soccorso.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto produrrà dei software versatili e potenti per l'analisi geografica di fonti di dati correnti e un prototipo di sistema di connessione a scopo epidemiologico del Pronto Soccorso.

Trasferibilità dei risultati

Attraverso la produzione periodica di pubblicazioni (cartacee e web) che integrino gli ultimi dati disponibili i risultati saranno messi a disposizione della comunità scientifica e degli operatori dell'SSN.

Persistenza degli anticorpi anti HBs in due corti di bambini immunizzati con vaccini esavalenti: implicazioni per strategie vaccinali e booster

L'obiettivo primario dello studio è quello di determinare la durata dell'immunità umorale e cellulare in bambini immunizzati nel primo anno di vita con i due vaccini esavalenti disponibili in commercio negli anni 2001-2005 (Hexavac e Infanrix), a distanza di 3-5 anni dalla vaccinazione. Allo studio stanno partecipando due ASL del Piemonte e quattro ASL della Lombardia.

Risultati attesi nel triennio

I risultati di questo studio forniranno dati sulla persistenza degli anticorpi protettivi anti-HBs (≥ 10 mIU/ml) e sulla memoria immunologica in bambini immunizzati durante il primo anno di vita, a distanza di circa 3-5 anni dalla vaccinazione con entrambi i vaccini esavalenti. I risultati ottenuti daranno informazioni rilevanti per le attività sia dell'AIFA che dell'SSN italiano, perché chiariranno se i bambini vaccinati con Hexavac richiedono o meno una dose *booster* o un ciclo addizionale completo di vaccinazione anti-epatite B per garantire loro una protezione a lungo termine.

Trasferibilità dei risultati

Le evidenze scientifiche permetteranno di decidere la necessità di una dose *booster* per i bambini vaccinati con Hexavac.

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. In altri Paesi la formazione adeguata dei professionisti che si prendono cura del paziente con ictus cerebrale acuto o a rischio di recidiva è da tempo parte integrante dei processi di modernizzazione dei sistemi sanitari.

Obiettivo dello studio è quello di realizzare un manuale per la prevenzione delle recidive coronariche e cerebrovascolari ad integrazione di quello 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 del manuale della prevenzione primaria e secondaria delle malattie cardio-cerebrovascolari per la gestione integrata dei pazienti con ictus e infarto del miocardio da offrire nei corsi di formazione ai medici di medicina generale.

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 agli MMG durante i corsi di formazione organizzati dalla Regione e dalle Associazioni della Medicina generale. Manuali di formazione per gli operatori sanitari che lavorano nelle *stroke unit*.

Piano di sorveglianza nazionale delle esposizioni pericolose e delle intossicazioni acute

La presenza in ambienti di vita e di lavoro di agenti potenzialmente pericolosi per la salute umana richiede la disponibilità di sistemi di sorveglianza in grado di segnalare condizioni di pericolo e orientare adeguati interventi di prevenzione. In considerazione di questi aspetti, nel

triennio 2006-2008 è stato sviluppato un progetto dedicato all'implementazione di un sistema nazionale di sorveglianza delle esposizioni pericolose e delle intossicazioni basato sui Centri Antiveleni (CAV). In tale ambito, sono stati definiti i seguenti strumenti operativi: procedure standard per la rilevazione dei dati (set minimo di dati e definizioni delle variabili di interesse), recepite dall'Accordo tra Stato, Regioni e PA del 28 febbraio 2008 su attività e requisiti basilari di funzionamento dei CAV; un prototipo di sistema informatico per la gestione integrata dei dati rilevati dai diversi Centri accessibile via web; un database che, a partire dal 2006, acquisisce annualmente circa 45.000 nuovi casi di esposizione umana, pari al 60% della casistica gestita a livello nazionale dall'insieme dei CAV.

Il sistema informativo reso disponibile dall'applicazione di queste modalità viene sistematicamente analizzato per la caratterizzazione a livello nazionale e regionale delle esposizioni accidentali e intenzionali ad agenti chimici e per approfondimenti su tematiche specifiche, svolti anche in collaborazione con sistemi di sorveglianza che si avvalgono di altre fonti di dati.

Risultati attesi nel triennio

Le informazioni acquisite, oltre a essere analizzate per fornire dettagliate indicazioni sulle diverse modalità e tipologie di esposizione e sul loro andamento temporale, saranno utilizzate per lo sviluppo delle seguenti attività: sorveglianza delle esposizioni pericolose in ambiente domestico, in collaborazione con il Sistema Informativo Nazionale Infortuni in Ambienti di Civile Abitazione riferito alla L n. 493/1999; sorveglianza delle intossicazioni da antiparassitari, riferita al DL.vo 194/1995 per l'attuazione della normativa 91/414/CEE in materia di immissione in commercio di prodotti fitosanitari e al DL.vo n. 174/2000 in attuazione della normativa 98/8/CE per il controllo dei biocidi immessi sul mercato; farmacovigilanza, con specifico riferimento a errori terapeutici, abuso, esposizioni accidentali e reazioni avverse, come previsto dal DL.vo n. 219/2006 in attuazione della direttiva 2001/83/CE concernente i medicinali di uso umano; sorveglianza di eventi anomali (selezionati effetti clinici/sindromi ed esposizioni) e generazione di allerte, in riferimento all'Accordo tra Stato, Regioni e PA su attività e requisiti basilari di funzionamento dei CAV del 28 febbraio 2008; verifiche sulla sicurezza dei prodotti in commercio e attività di supporto per la loro revisione in sede europea, a supporto del regolamento comunitario per il controllo delle sostanze chimiche 1907/2006 (REACH); caratterizzazione dei tentati suicidi per avvelenamento in Italia.

Trasferibilità dei risultati

I risultati delle analisi effettuate saranno oggetto di rapporti periodici che verranno trasmessi ai competenti referenti nazionali e regionali e saranno proposti come contributo informativo per l'individuazione di priorità di intervento mirati alla riduzione del rischio di esposizione ad agenti specifici. In particolare, potranno essere utilizzati per interventi normativi e per indirizzare piani di formazione e informazione rivolti a selezionati gruppi di popolazione. Inoltre, la sistematica revisione della casistica rilevata dai CAV potrà contribuire alla caratterizzazione della tossicità per l'uomo di principi attivi e formulati in commercio, integrando le informazioni disponibili, principalmente basate su dati sperimentali. L'implementazione di un sistema di allerta rapido, orientato alla rilevazione di eventi di origine dolosa e accidentale, permetterà la definizione di protocolli per interventi coordinati di verifica, approfondimento e prevenzione a livello locale e nazionale.

Prevenzione del carcinoma della cervice uterina

Il carcinoma della cervice uterina, causato nella totalità dei casi dall'infezione con tipi oncogeni di papillomavirus umano (HPV), in Italia colpisce 3.500 donne ogni anno con circa 1.000 decessi.

Il CNESPS sta conducendo varie attività di ricerca finalizzate alla raccolta di informazioni di tipo epidemiologico in tema di prevenzione del cervicocarcinoma.

- Il Reparto Salute della donna e dell'età evolutiva e il Reparto Epidemiologia delle malattie infettive (REMI), in collaborazione con il CPO di Torino, stanno conducendo un progetto nazionale (PreGio) con il triplice obiettivo di: i) realizzare un'indagine CAP su prevenzione del cervicocarcinoma; ii) descrivere la prevalenza dell'infezione da tipi oncogeni di HPV; iii) valutare la fattibilità dell'offerta del vaccino contro l'HPV, in donne di età 18-26 anni campionate da ASL distribuite sul territorio italiano.
Il protocollo prevede l'offerta, presso i centri screening delle ASL, di Pap-test e test HC2 a 4.000 donne di 18-26 anni, della vaccinazione anti-HPV a 1.000 donne e la somministrazione di un questionario per rilevare conoscenze e comportamenti verso la prevenzione del cervicocarcinoma ad altre 1.000 donne.
- Il Reparto Epidemiologia dei tumori sta svolgendo uno studio finalizzato a: costruire la linea di base dell'incidenza e della mortalità per cervicocarcinoma per coorti di età delle donne italiane, per area geografica e per copertura dello screening, attraverso i dati desunti dal Registro Tumori, dalle schede di morte ISTAT, dall'indagine annuale GISCI, dall'indagine multiscope ISTAT e dallo studio Passi; identificare i metodi per rilevare la sottostima di mortalità per cervicocarcinoma dovuta alla misclassificazione nella codifica per diagnosi di morte; descrivere le caratteristiche dei programmi di screening per cervicocarcinoma in Italia.
- Il REMI collabora con il Coordinamento Interregionale della Prevenzione per la rilevazione periodica e l'analisi delle strategie vaccinali regionali e delle coperture vaccinali per HPV per coorte di nascita (1982-1997), mediante una modulistica condivisa e distribuita a livello regionale.

Inoltre, nell'ambito del progetto Europeo VENICE II, il REMI coordina il monitoraggio, attraverso questionari online, dello stato di introduzione del vaccino anti-HPV in Europa, in termini di processi decisionali per l'introduzione della vaccinazione, strategie vaccinali e coperture vaccinali.

Risultati attesi nel triennio

- Il progetto PreGio permetterà di raccogliere le seguenti informazioni su un campione di giovani donne (18-26 anni) italiane:
 - proporzione di donne positive ai tipi oncogeni di HPV e distribuzione per sottotipo;
 - attitudini, comportamenti e conoscenza del cervicocarcinoma, dell'HPV e delle opportunità di prevenzione;
 - grado di accettabilità ed eventuali ostacoli all'offerta vaccinale in una fascia di età diversa da quella per cui è raccomandata;
 - stima della compliance alla vaccinazione (numero di *drops-out* sulle tre dosi);
 - stima della frequenza di eventi avversi comuni dopo ogni somministrazione.
- Lo studio di incidenza e mortalità per cervicocarcinoma permetterà di conoscere:
 - tassi di incidenza e mortalità per cervicocarcinoma per età, area geografica e copertura dello screening;
 - tasso di mortalità "corretto per misclassificazione"
 - numero di donne in età 25-64 anni invitate da un programma di screening organizzato sul totale delle donne in età da screening per area geografica;
 - numero di donne che aderiscono all'invito sul totale delle donne invitate per area geografica;
- c) Le attività di rilevazione condotte a livello regionale e, nell'ambito di VENICE II, a livello europeo permetteranno di conoscere:

- strategie e coperture vaccinali per HPV in Italia, per regione e coorte di nascita (coorti 1982-1997)
- strategie e coperture vaccinali per HPV negli Stati europei
- studi (studi di impatto dell'infezione, modelli matematici, valutazioni economiche) condotti per supportare la decisione di introdurre o non introdurre la vaccinazione per l'HPV nei Paesi europei.

Trasferibilità dei risultati

I risultati prodotti costituiranno la base per la definizione e la valutazione delle politiche di sanità pubblica per la prevenzione del cervicocarcinoma.

PreGio fornirà dati nazionali di prevalenza delle infezioni da HPV a rischio oncogeno, che al momento non sono disponibili per donne in età pre-screening e per le residenti nel Sud Italia. Il progetto permetterà, inoltre, di stimare l'adesione alla vaccinazione della popolazione in età 18-26 anni per la quale il Consiglio Superiore della Sanità ha raccomandato di raccogliere maggiori evidenze prima di procedere con un'offerta attiva.

Le informazioni raccolte con l'indagine CAP si riveleranno preziose per definire i contenuti della comunicazione che gli operatori sanitari si trovano ad affrontare a seguito dell'introduzione sul mercato del vaccino contro l'HPV. I dati raccolti potranno essere utili per la stesura di un protocollo di studio su interazione tra vaccinazione e screening.

Il monitoraggio delle coperture vaccinali, la raccolta di esperienze e studi condotti a livello europeo forniranno informazioni utili per il miglioramento delle strategie di offerta della vaccinazione anti-HPV in Italia e in Europa.

PROBE (Programma per il Biomonitoraggio dell'Esposizione della Popolazione Generale)

Il programma PROBE intende fornire elementi conoscitivi per la valutazione del rischio per la popolazione italiana in conseguenza dell'esposizione a particolari inquinanti. Inizialmente sarà criticamente valutato quanto disponibile in sede nazionale per individuare quelle misure che, offrendo adeguate garanzie di qualità, potranno essere utilizzate per dare un primo quadro nazionale dell'esposizione della popolazione a metalli, in termini di definizione dei Valori di Riferimento per gruppi di popolazione.

Contemporaneamente le attività saranno focalizzate allo sviluppo operativo e al successivo consolidamento di una rete di sorveglianza attraverso l'individuazione delle competenze presenti sul territorio. I soggetti del network si occuperanno, previa idonea formazione, della selezione dei gruppi di popolazione e del campionamento dei fluidi biologici necessari per la misura di biomarcatori da esposizione.

Obiettivo generale del progetto è fornire alle istituzioni normative una base di dati affidabile e sufficientemente completa del grado di esposizione della popolazione generale ai metalli, attraverso una sorveglianza a cadenza biennale di gruppi omogenei e rappresentativi della situazione italiana.

La presente unità operativa si occupa della gestione integrata delle informazioni e dei dati di monitoraggio.

Risultati attesi nel triennio

Si realizzeranno campagne di biomonitoraggio di gruppi di popolazione (ognuno di circa 150 soggetti) per l'esposizione generale a metalli (popolazione urbana, suburbana) con diversa suscettibilità per età (bambini, giovani, adulti, anziani) o per particolari condizioni fisiologiche (donne in gravidanza). I metalli che si monitoreranno sono quelli riportati anche nell'ultimo *National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals* dei CDC americani e cioè: Antimonio, Bario, Berillio, Cadmio, Cesio, Cobalto, Mercurio, Molibdeno, Piombo, Platino,

Tallio, Tungsteno e Uranio. A questi si aggiungeranno: Arsenico, Iridio, Manganese, Nichel, Palladio, Rodio, Stagno, Stronzio e Vanadio, in quanto elementi che rappresentano noti e/o emergenti problemi tossicologici e che sono stati inseriti dagli stessi CDC in liste di priorità.

Le campagne di sorveglianza avranno cadenze operative biennali in modo di avere disporre di un quadro storico funzionale ad evidenziare possibili variazioni temporali, oltre che geografiche, dell'esposizione ambientale della popolazione italiana e, eventualmente, mettere in evidenza i risultati delle azioni normative prese per diminuire i livelli ambientali di metalli tossici.

Trasferibilità dei risultati

Il prodotto finale sarà una serie di Atlanti dei Valori di Riferimento per i Metalli nella popolazione italiana, a cadenza biennale come conclusione delle campagne di biomonitoraggio.

Procedure innovative per l'identificazione di fattori eziopatogenetici e di infertilità maschile

Verranno studiati 100 pazienti con problemi di fertilità di cui la metà con motilità spermatozoaria nei limiti della norma secondo la WHO (1999) e metà con motilità spermatozoaria inferiore ai limiti della norma.

I parametri del liquido seminale verranno valutati con spermioγραμμα e spermocitogramma. Inoltre, su tutti i liquidi seminali verranno effettuati test di vitalità. Nei 100 pazienti verrà valutata la funzionalità dei mitocondri degli spermatozoi con citofluorimetria in modo da identificare variazioni nel potenziale di membrana. Tutte le valutazioni saranno ripetute sui pazienti dopo trattamento con antiossidanti e procinetici.

Risultati attesi nel triennio

Il presente studio, grazie alle metodiche diagnostiche innovative proposte, potrà individuare nuovi meccanismi etiopatogenetici dell'infertilità a livello di espressione genica, dal DNA mitocondriale e/o dei geni nucleari implicati nella fosforilazione ossidativa, principale generatore di ATP e quindi di energia e motilità per lo spermatozoo. Inoltre lo studio si propone di individuare l'efficacia degli schemi terapeutici testati e sia a livello del DNA genomico che mitocondriale.

L'elevato numero di pazienti che il progetto si propone di studiare, e le valutazioni di studi con *microarray* conferiranno allo studio particolare significatività e un notevole interesse sociale in quanto potranno determinare nuove possibilità diagnostiche ai problemi di infertilità da fattore maschile.

Trasferibilità dei risultati

Implementazione degli strumenti diagnostici utilizzati nel campo della infertilità maschile. Validazione dell'efficacia di protocolli terapeutici utilizzati per migliorare l'esito delle terapie.

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 saranno selezionati campioni di soggetti tra i 18 e i 75 anni rappresentativi delle popolazioni di Abbiategrasso in Lombardia e Cittanova in Calabria.

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.

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 biomorali 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 cardio-cerebrovascolare 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. Attraverso questo database è stato possibile costruire una funzione di rischio per la predizione degli eventi cardio-cerebrovascolari nella popolazione italiana adulta nei successivi dieci anni sulla base dei seguenti fattori di rischio: sesso, età, presenza di diabete, abitudine al fumo, pressione arteriosa sistolica, colesterolemia totale e HDL. Questa funzione è stata pubblicata dal Gruppo di Ricerca del Progetto CUORE nel 2004 e da allora il suo utilizzo sta entrando a far parte della pratica clinica. L'obiettivo di questo progetto è quello di svolgere analisi statistiche volte all'aggiornamento della funzione per la stima del rischio cardio-cerebrovascolare nella popolazione adulta italiana e all'introduzione di questa nella valutazione del rischio utilizzata in pratica clinica.

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 (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 sia in termini di follow-up degli eventi fatali e non fatali cardio-cerebrovascolari che attraverso l'introduzione di una coorte più recente di persone.

Risultati attesi nel triennio

Le attività del Progetto si realizzano attraverso:

- Inclusione di una nuova coorte. Nel database del Progetto CUORE è previsto l'inserimento della coorte 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 all'aggiornamento della funzione di rischio per la stima del rischio cardio-cerebrovascolare nella popolazione italiana adulta.

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'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 saranno 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 cardiovascolari.

Progetto CUORE, Studi longitudinali – nuovi fattori di rischio

Nell'ambito del Progetto CUORE, nel 1998 è stato costruito un database dei fattori di rischio cardio-cerebrovascolare 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 volte alla valutazione della predittività della familiarità per malattie cardiovascolari precoci e dell'obesità per la stima del rischio cardiovascolare nella popolazione adulta italiana e all'introduzione di queste nuove variabili nella valutazione del rischio utilizzata in pratica clinica.

Le analisi statistiche che hanno portato alla costruzione della funzione di rischio per la predizione del rischio cardio-cerebrovascolare pubblicata nel 2004 avevano evidenziato una significativa statistica della familiarità per eventi cardio-cerebrovascolari e dell'obesità quando considerate come fattori singoli, ma non quando combinati con altri fattori di rischio. Tale perdita di significatività ha portato all'esclusione di queste due 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 (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 sia in termini di follow-up degli eventi fatali e non fatali cardio-cerebrovascolari che attraverso l'introduzione di una coorte più recente di persone.

Risultati attesi nel triennio

Le attività del Progetto si realizzano attraverso:

- Inclusione di una nuova coorte. Nel database del Progetto CUORE è previsto l'inserimento della coorte 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 arruolati 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 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 della familiarità per eventi cardiovascolari precoci e dell'obesità 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 una coorte recente, l'introduzione di un quinquennio di età in più (69-74 anni) e la valutazione dell'introduzione della familiarità per eventi precoci e dell'obesità. Tali strumenti saranno 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 e del diabete in particolare pone il sistema-salute di fronte a nuove sfide che richiedono una revisione critica dei modelli assistenziali e dell'agire professionale. Queste esigenze richiedono risposte formative adeguate e innovative, che coinvolgano i professionisti e i cittadini nell'identificazione e nella realizzazione di nuove strategie d'intervento condivise. Verrà definito un modulo formativo per la promozione delle competenze delle persone con diabete e dei 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.

Per sostenere la corretta implementazione di sistemi informativi per la gestione integrata del diabete si rende necessaria la definizione di una mappa concettuale degli scambi informativi necessari alla 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. A questo scopo 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, anche parziali, 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

- 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

- 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.

Progetto per la realizzazione di uno spot televisivo sul tema della fertilità

Realizzazione di uno spot televisivo rivolto alle giovani coppie e ai giovanissimi, che tratterà le cause dell'infertilità prendendo in considerazione i fattori individuali sui quali l'informazione e la prevenzione possono direttamente incidere a tutela della fertilità modificando i comportamenti e stimolando abitudini di vita sane attraverso un linguaggio chiaro, diretto e semplice.

Risultati attesi nel triennio

Informare correttamente sulle cause che possono provocare l'infertilità e la sterilità, sensibilizzare il *target* di riferimento sull'importanza della prevenzione, osservando stili di vita salutari sottoponendosi a controlli periodici preventivi.

Trasferibilità dei risultati

Adottare un linguaggio idoneo per i giovani/giovanissimi che riesca a trattare il delicato tema della preservazione della fertilità e della prevenzione dell'infertilità. La sperimentazione del linguaggio può essere utile per ulteriori messaggi di informazione/prevenzione rivolti a questo *target*.

Programma d'informazione e comunicazione a sostegno degli obiettivi del programma "Guadagnare Salute" DPCM 4 maggio 2007

Secondo i dati WHO, l'86% dei decessi, il 77% della perdita di anni di vita in buona salute in Europa e in Italia sono provocati da patologie croniche che hanno in comune fattori di rischio modificabili, quali fumo di tabacco, abuso di alcol, scarso consumo di frutta e verdura, sedentarietà. In questo scenario continuare ad investire solo in assistenza non è sostenibile e certamente parte dell'attenzione va focalizzata sulla prevenzione. Il programma "Guadagnare Salute", promosso dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali e approvato con il DPCM del 4 maggio 2007, in linea con gli orientamenti della WHO, risponde a tale esigenza e intende facilitare i singoli cittadini nella scelta di stili di vita salutari attraverso accordi e iniziative integrate interministeriali. La concreta realizzazione del programma è condivisa con le Regioni e con i Servizi sanitari locali ed è sostenuta dal CCM. Il presente progetto intende contribuire all'attuazione del Programma Guadagnare Salute. A tale scopo ha progettato una strategia di comunicazione che valorizza e integra le iniziative già presenti sul territorio e che predisposizione attività di comunicazione e formazione rivolte sia alla popolazione generale o a gruppi specifici di essa, sia agli operatori sanitari e non sanitari. Tali

attività sono finalizzate alla promozione di processi di consapevolezza e di *empowerment* per scelte di vita salutari a livello individuale e collettivo.

Risultati attesi nel triennio

- Sviluppare le competenze conoscitive sui quattro fattori di rischio (fumo, obesità, alcol, mancanza di attività fisica) tra gli operatori per favorire la diffusione di messaggi corretti e omogenei rivolti alla popolazione generale e a specifici *target*.
- Sviluppare le competenze comunicativo-relazionali e di *counselling* tra gli operatori coinvolti nell'attività di formazione per favorire la modifica degli atteggiamenti nella popolazione e in gruppi specifici e l'accrescimento della consapevolezza nei confronti di specifici comportamenti a rischio.
- Facilitare scelte salutari attraverso un richiamo alla responsabilità istituzionale e alla responsabilità individuale (il cittadino al centro delle scelte per la propria salute), raggiungendo i gruppi di popolazione più a rischio (disuguaglianze sociali, approccio multiculturale).
- Promuovere la salute tra i giovani sviluppando la loro capacità di definire obiettivi realistici, di affrontare e risolvere problemi.
- Favorire la memorizzazione di alcuni importanti messaggi semplificati ("cinque al giorno" riferito alle cinque porzioni di frutta o verdure da consumare ogni giorno) o messaggi sull'attività fisica.
- Aumentare il numero di adulti che si rivolgono al medico o al farmacista per misurare la pressione arteriosa e i livelli di colesterolo.
- Favorire la modifica degli atteggiamenti e l'accrescimento della consapevolezza nei confronti di specifici comportamenti a rischio quali l'abuso di alcol e l'abitudine al fumo.

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.

Registro Nazionale della Procreazione Medicalmente Assistita

Raccolta dei dati aggregati relativi alle tecniche di procreazione medicalmente assistita e dei nati in tutti i centri di PMA in Italia. Preparazione della relativa relazione annuale al Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali.

Risultati attesi nel triennio

Valutazione dell'efficacia delle tecniche di PMA.

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.

Registro Nazionale degli Accidenti Cerebrovascolari (ACV)

Partendo dall'esperienza maturata nelle aree italiane MONICA, il CNESPS ha coordinato il Registro degli ACV 1998-99 che ha applicato e validato procedure semplificate per produrre stime attendibili dei tassi di attacco e della letalità degli ACV in sette aree al Nord, Centro e Sud del Paese.

Questo Registro basato su 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 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-9 342, 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:

- i tassi di incidenza e di attacco degli ACV maggiori;
- i tassi di letalità per ACV maggiori;
- la 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 Nazionale degli Eventi Cerebrovascolari fornisce un'immagine globale della malattia nella comunità, evidenzia le aree problematiche e suggerisce dove è maggiormente necessario migliorare i servizi per il trattamento.

Il Registro è rivolto ai professionisti della salute e agli amministratori e fornisce le basi per comprendere le caratteristiche ed il peso della malattia e le conseguenze della malattia nella popolazione attraverso:

- il monitoraggio dell'occorrenza della malattia;
- l'interpretazione delle differenze e dei cambiamenti nella dinamica naturale della malattia tra sessi, fasce di età, classi sociali, gruppi etnici;
- l'identificazione dei gruppi vulnerabili;
- il monitoraggio della letalità intra ed extra ospedaliera;
- la valutazione delle relazioni tra occorrenza, letalità e mortalità della malattia;

- il monitoraggio delle conseguenze della malattia nella comunità in termini di prescrizioni mediche e riabilitazione;
- l'utilizzo e l'impatto di nuovi strumenti diagnostici e trattamenti.

Ciò è fondamentale per:

- sviluppare politiche e strategie sanitarie;
- pianificare servizi sanitari e spese sanitarie;
- migliorare l'allocazione delle risorse in modo appropriato;
- valutare l'efficacia degli interventi.

Registro Nazionale degli Eventi Coronarici (EC)

Sulla base dell'esperienza maturata nelle aree italiane MONICA, il CNESPS ha coordinato il Registro degli EC 1998-99 che ha applicato e validato procedure semplificate per produrre stime attendibili dei tassi di attacco e della letalità degli EC in otto aree al Nord, Centro e Sud del Paese.

Questo Registro basato su 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 EC potenziali. Il numero di eventi occorsi nella popolazione sotto sorveglianza e quindi i tassi vengono stimati sulla base di un campione di 1.000 EC validati selezionati in modo casuale per area nel biennio.

Il Registro attivato per il biennio 2004-05 utilizzerà 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 AHA, WHF, ESC, CDC e 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:

- i tassi di incidenza e di attacco degli EC maggiori;
- i tassi di letalità per EC maggiori;
- la 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, sia secondo i nuovi criteri. La validazione degli eventi con i doppi criteri permetterà una valutazione più precisa e soprattutto permetterà 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.

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 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 maggiormente necessario migliorare i servizi per il trattamento.

Il Registro è rivolto ai professionisti della salute e agli amministratori e fornisce le basi per comprendere le caratteristiche ed il peso della malattia e le conseguenze della malattia nella popolazione attraverso:

- il monitoraggio dell'occorrenza della malattia;
- l'interpretazione delle differenze e dei cambiamenti nella dinamica naturale della malattia tra sessi, fasce di età, classi sociali, gruppi etnici;
- l'identificazione dei gruppi vulnerabili;
- il monitoraggio della letalità intra ed extra ospedaliera;
- la valutazione delle relazioni tra occorrenza, letalità e mortalità della malattia;
- il monitoraggio delle conseguenze della malattia nella comunità in termini di prescrizioni mediche e riabilitazione;
- l'utilizzo e l'impatto di nuovi strumenti diagnostici e trattamenti.

Ciò è fondamentale per:

- sviluppare politiche e strategie sanitarie;
- pianificare servizi sanitari e spese sanitarie;
- migliorare l'allocazione delle risorse in modo appropriato;
- valutare l'efficacia degli interventi.

Rete d'informazione rapida per malattie infettive e i focolai epidemici

La gestione delle situazioni di emergenza richiede, di norma, l'attivazione tempestiva di una serie di risorse (umane e materiali) che vengono messe in campo *ad hoc* per gestire l'emergenza in applicazione di opportuni protocolli e piani operativi che vengono definiti e tarati in base alle caratteristiche della situazione e alla relativa evoluzione. Una situazione di emergenza può essere caratterizzata da differenti livelli di complessità riconducibili a fattori quali: l'impatto territoriale, i rischi per la salute pubblica, la rapidità della risposta, ecc. La gestione di tali situazioni richiede il coordinamento di diversi enti e soggetti che, ciascuno in base alla propria area di competenza e ambito di intervento, concorrono nella gestione e risoluzione dell'emergenza mettendo a disposizione mezzi e strumenti e utilizzando strutture operative progettate e realizzate proprio in relazione all'esigenza di affrontare una possibile situazione di emergenza. Di fatto la gestione di un'emergenza richiede l'attivazione di una rete di cooperazione costituita da diversi soggetti che concorrono a vari livelli e con ruoli differenti alla risoluzione di un'emergenza.

Tra le attività previste al livello nazionale alcune prevedono sia il monitoraggio della sorveglianza routinaria delle malattie infettive (notifica delle malattie infettive attraverso la segnalazione di casi individuali o aggregati secondo le specifiche del DM del 15/12/1990) che la raccolta delle informazioni attraverso metodiche non convenzionali come l'*epidemic intelligence* (dati e informazioni messe a disposizione da molteplicità di fonti informative ufficiali e non sia a livello nazionale che locale, ad es media), con modalità periodica o *ad hoc* (in base alle esigenze).

Risultati attesi nel triennio

- Raccolta di dati /informazioni per le finalità di *epidemic intelligence* e di sorveglianza.

- Redazione di procedure operative per disciplinare le attività.
- Raccordo con sistemi e strutture analoghe esistenti in altri Paesi sia dell'EU che sovranazionali (ECDC, WHO, ecc).
- Censimento e valutazione di piani e/o linee guida presenti al livello regionale e locale per la preparazione ad eventi inattesi, inclusa la pandemia influenzale.

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 del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali. 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 e la conseguente formazione pratica degli stessi nel campo dell'epidemiologia con particolare riferimento alle indagini epidemiologiche delle epidemie.

Riabilitazione cardiologica intensiva e continuità assistenziale nel paziente fragile dopo evento cardiovascolare – UO ISS

Negli ultimi decenni si è assistito ad un progressivo invecchiamento della popolazione europea e mondiale e ad un allungamento della speranza di vita. Ciò ha determinato l'emergere di nuovi bisogni dovuti all'aumentare delle patologie croniche, in particolare delle malattie cardiovascolari, alla comparsa di disabilità e non autosufficienza, che hanno portato alla identificazione di una categoria di persone (anziani fragili) con limitazione nella capacità di compiere azioni quotidiane che si associano ad una peggiore qualità di vita e ad un aumento della spesa socio-sanitaria.

La condizione di fragilità pone la necessità di apportare consistenti modifiche nella pianificazione dei servizi sanitari, delle attività di sanità pubblica e nell'assetto sociale e di identificare i fattori di rischio predittivi della condizione di fragilità, al fine di pianificare adeguati interventi di prevenzione.

Lo studio si avvale della disponibilità di dati raccolti nell'ambito di studi longitudinali, studi trasversali, registri di popolazione e di campioni biologici raccolti durante gli esami di popolazione: caratteristiche demografiche (età, sesso, scolarità, stato civile), presenza di patologie (malattie cardiovascolari, neoplasie, malattie dell'apparato respiratorio), misure antropometriche, misurazione della pressione arteriosa, rilevazioni elettrocardiografiche e spirometriche, valutazione delle capacità cognitive raccolte tramite la somministrazione di test (*Mini Mental State Examination*, Scala ADL – *Activity of Daily Living*, IADL – *Instrumental Activity of Daily Living*), livello di attività fisica, campioni biologici (siero, plasma, *buffy coat* ed emazie) conservati presso la Banca Biologica del CNESPS.

Risultati attesi nel triennio

Verificare quali siano i fattori che predicano lo stato di fragilità e successivamente quello di valutare il ruolo della fragilità (e delle condizioni che la supportano) nel predire le malattie cardio-cerebrovascolari (eventi coronarici e cerebrovascolari, fatali e non fatali) e la mortalità totale.

Sarà valutata la distribuzione dei fattori di rischio alla linea base, il punteggio medio e la distribuzione delle scale utilizzate per la valutazione delle capacità cognitive, il numero di eventi, il numero di persi al follow-up.

Trasferibilità dei risultati

La valutazione dei fattori che predicano lo stato di fragilità nelle persone adulte, e come tale stato di fragilità (e delle condizioni che la supportano) possa predire le malattie cardiovascolari e la mortalità totale, fornisce ai professionisti della salute ed 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.

Ricerca dell'esposizione acuta e cronica a sostanze d'abuso, fumo, alcol e agenti dopanti in una popolazione di coppie infertili

Studio sugli stili di vita adottati dalle coppie infertili per rilevare l'esposizione a sostanze potenzialmente dannose per la sfera riproduttiva, per accertare quale possa essere la correlazione fra un'eventuale esposizione attuale o passata e la difficoltà per le coppie ad avere un bambino. La rilevazione dello stile di vita avverrà attraverso informazioni fornite dalle coppie con la compilazione di un questionario costruito *ad hoc* e attraverso il prelievo di campioni biologici (capelli e urine).

Risultati attesi nel triennio

Valutazione dell'incidenza del consumo e dell'esposizione a fumo, alcol, droga e agenti dopanti in una popolazione infertile che si rivolge ai centri di procreazione medicalmente assistita, eseguendo un confronto con una popolazione controllo sovrapponibile per variabili (età, livello di istruzione, tempo ricerca figlio, infertilità idiopatica, assenza di patologie meccaniche-ostruttive).

Trasferibilità dei risultati

I risultati saranno utili per approfondire, attraverso nuovi progetti, la correlazione tra gli stili di vita e la fertilità.

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 uno studio nel quale vengono coinvolti gemelli (monozigoti e dizigoti) e persone non gemelle.

Risultati attesi nel triennio

È stato messo a punto un questionario che esplora le generazioni precedenti, contemporanee e successive, in relazione alla fascia di età dei gemelli e dei loro controlli. In particolare, per i gemelli di età superiore ai 65 anni, vengono raccolte informazioni (numero, sesso e condizione di gemello) per i nonni, i genitori, i fratelli e i loro figli, i propri figli e i nipoti. Per reclutare i controlli viene chiesto ad ogni gemello di far compilare un questionario analogo ad un proprio amico o conoscente (non parente), non gemello e coetaneo.

Nell'ambito dello stesso studio, su suggerimento del Prof. Luca Luigi Cavalli Sforza, si è deciso di testare anche l'ipotesi che i gemelli abbiano una minore attitudine alla nuzialità e una ridotta fecondità come fenomeno compensatorio dell'ereditabilità delle nascite gemellari. A tal scopo, ai gemelli di età superiore a 65 anni, vengono anche chieste informazioni su: matrimonio/convivenza, anno del matrimonio/convivenza ed età alla nascita del primo figlio.

Trasferibilità dei risultati

Le informazioni derivate da questo studio permetteranno di ipotizzare un modello di trasmissione per le nascite gemellari dizigotiche.

Ruolo della componente genetica e ambientale nell'insorgenza dell'Ipotiroidismo Congenito

Negli ultimi vent'anni in tutti i Paesi industrializzati si è registrato un notevole incremento di parti gemellari. In Italia si è registrato un aumento intorno al 50% tra il 1981 e il 2003. I dati raccolti dal Registro Nazionale Ipotiroidei Congeniti (RNIC) rispecchiano pienamente la situazione a livello nazionale. I dati dell'RNIC relativi al periodo 1989-2003 mostrano che, su un totale di 2.341 bambini, 111 casi di IC permanente sono nati da parto gemellare (4,3% di parti gemellari).

Uno studio caso-controllo condotto utilizzando le informazioni del Registro aveva messo in evidenza una elevata frequenza di gemelli tra gli ipotiroidei congeniti e conseguentemente un rischio molto elevato e statisticamente significativo di IC nelle gravidanze gemellari rispetto a quelle singole.

L'RNIC in collaborazione con il Registro Nazionale Gemelli dell'ISS intende avviare uno studio per la stima dell'ereditabilità dell'IC permanente. La sua determinazione consentirà di definire il contributo relativo delle componenti genetiche e non-genetiche alla variabilità totale del fenotipo IC. Parallelamente, l'individuazione e la caratterizzazione dei gemelli monozigoti consentirà di avviare nuove ricerche sulle modificazioni post-zigotiche o epigenetiche del DNA in coppie monozigoti discordanti per IC.

Risultati attesi nel triennio

Sulla base delle informazioni contenute nell'RNIC verranno individuati tutti gli ipotiroidei congeniti permanenti nati da parto gemellare tra il 1981 e il 2004. I gemelli così identificati verranno contattati dai Centri e gli verrà chiesto di compilare un questionario per la raccolta dei dati socio demografici, l'aggiornamento delle informazioni cliniche e la stima della zigosità. Dove possibile si prevede la raccolta di materiale biologico e la sua conservazione per ulteriori studi.

Trasferibilità dei risultati

L'analisi dei dati raccolti a livello nazionale dall'RNIC consentirà di continuare ad investigare le differenze tra gli IC nati da parto gemellare e singolo e consolidare le conoscenze già acquisite. La caratterizzazione per eziologia dei bambini IC nati da parto gemellare e parallelamente lo studio delle coppie concordanti e discordanti per patologia, potranno dare un sostanziale contributo alla comprensione dei fattori zigotici e postzigotici coinvolti nell'eziologia dell'ipotiroidismo congenito.

SET-DEP (Screening and Enhanced Treatment of DEpression in Primary care)

Studio controllato randomizzato di valutazione dell'efficacia nella pratica di un programma di screening e intervento integrato condotto in medicina generale, denominato con l'acronimo inglese "SET-DEP".

La partecipazione, previo consenso informato, è proposta a tutti gli assistiti di età 18-65 consecutivamente afferenti in un periodo di 12 mesi agli ambulatori di 11 medici di medicina generale della ASL Roma A.

I partecipanti risultati positivi allo screening sono assegnati mediante randomizzazione a due gruppi: un gruppo sperimentale (intervento immediato di screening e gestione della depressione) e un gruppo di controllo (intervento differito dopo tre mesi).

I pazienti il cui profilo di risposte suggerisca la presenza di una depressione molto grave sono esclusi dallo studio e ricevono l'intervento immediato.

L'intervento (valutazione diagnostica approfondita e, se indicato, trattamento farmacologico antidepressivo) è effettuato presso un ambulatorio psichiatrico dedicato, situato nella medesima ASL. Previo consenso specifico, vengono raccolti campioni di saliva per costituire una banca

biologica per uno studio dei marcatori dei fenotipi intermedi della depressione e dei correlati genetici della refrattarietà al trattamento.

Al follow-up a tre mesi, i due gruppi sono confrontati relativamente a: sintomatologia depressiva e ansiosa, funzionamento sociale, qualità della vita, costi diretti e indiretti, rapporti costo-efficacia e costo/utilità.

Risultati attesi nel triennio

Creazione di una rete collaborativa tra un gruppo di operatori della medicina generale e gli operatori di salute mentale coinvolti nel progetto.

Attivazione di un programma di screening e gestione della depressione in medicina generale.

Messa a punto di una metodologia per la valutazione del rapporto costo/efficacia della procedura.

Valutazione dell'efficacia nella pratica della procedura.

Valutazione dei rapporti costo-efficacia e costo/utilità della procedura.

Costituzione di una banca dati biologica per lo studio dei correlati genetici della depressione e della refrattarietà al trattamento.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto permetterà di valutare in una grande ASL urbana la fattibilità, l'accettabilità, l'efficacia nella pratica e il rapporto costo/efficacia di una procedura di screening della depressione in medicina generale che si presta bene ad essere implementata presso altre ASL, in quanto richiede soltanto la collaborazione e il collegamento tra risorse normalmente presenti, ovvero gli MMG e gli ambulatori dei servizi psichiatrici territoriali. L'approccio perciò è facilmente trasferibile laddove gli MMG e i responsabili dei servizi psichiatrici siano disponibili a promuovere gli opportuni piccoli cambiamenti organizzativi.

Mediante future analisi dei campioni inclusi nella banca biologica, il progetto potrà inoltre contribuire a delineare possibili marcatori genetici della scarsa responsività al trattamento farmacologico antidepressivo, con possibilità di indirizzare i pazienti scarsamente responsivi a trattamenti alternativi con risparmio di sofferenza del paziente, tempo e risorse.

Sindrome di Sjögren

La sindrome di Sjögren (SS) è una malattia infiammatoria cronica di natura autoimmune che colpisce centinaia di migliaia di persone nel mondo. La forma primitiva ha una prevalenza dello 0,3-2,7%, l'80-90% di casi è di sesso femminile. Nella sindrome di Sjögren il sistema immunitario non riconoscendo le proprie cellule, tessuti ed organi, attacca soprattutto le ghiandole esocrine (salivari, lacrimali) distruggendole. Come altre malattie autoimmuni, la SS può danneggiare organi vitali e presentare una sintomatologia tipica caratterizzata da livelli di intensità variabile. Da uno studio multicentrico condotto in collaborazione con l'Unità di Reumatologia del Policlinico Umberto I di Roma, è emersa l'associazione tra numero di gravidanze e insorgenza di questa patologia. Ci proponiamo di condurre nuovi studi mirati all'identificazione di fattori coinvolti nell'eziologia della SS.

Risultati attesi nel triennio

Attraverso la realizzazione di uno studio caso controllo, che prevede il coinvolgimento del Centro di Roma e di Genova, sarà possibile analizzare il ruolo della storia riproduttiva, dell'allattamento e dell'uso di contraccettivi orali nell'insorgenza della SS. Particolare attenzione verrà posta nell'identificazione di altre patologie autoimmuni diagnosticate nei soggetti reclutati e nei parenti di primo grado. Si prevede la raccolta di materiale biologico e la sua conservazione per ulteriori studi.

Parallelamente verrà progettato e avviato uno studio sui gemelli affetti dalla SS per la stima dell'ereditabilità e quindi la definizione del contributo della componente genetica, ambientale condivisa e non condivisa alla variabilità totale.

Trasferibilità dei risultati

Le conoscenze acquisite con questi studi daranno un contributo all'identificazione dei fattori di rischio per la SS e potranno fornire informazioni utilissime per definire il ruolo dei determinanti ambientali responsabili dell'induzione del processo autoimmune.

Sistema di indagini sui rischi comportamentali in età 6-17 anni

Alla fine del 2007 il Ministero del Lavoro/CCM ha affidato all'ISS-CNESPS il coordinamento del progetto. Il progetto è strutturato in due fasi.

La prima, denominata OKkio alla SALUTE, consiste di una raccolta di informazioni, biennale, su abitudini alimentari e attività fisica negli alunni delle scuole primarie e sull'attività della scuola; la seconda prevede una raccolta dati su alimentazione, attività fisica, fumo e alcol negli adolescenti, con l'uso degli strumenti predisposti dai due studi internazionali HBSC e GYTS.

La prima raccolta di OKkio alla SALUTE è stata effettuata nel 2008 e sarà ripetuta nel 2010; la raccolta dei dati sugli adolescenti inizierà nel 2009.

Nel 2009 si effettuerà anche uno studio di approfondimento di tipo KAP sull'alimentazione, sull'attività fisica e sui servizi sanitari dei bambini di 8-9 anni e i loro genitori, in collaborazione con l'INRAN.

Risultati attesi nel triennio

La ripetizione della raccolta dati con la metodologia di OKkio alla SALUTE permetterà di iniziare un sistema di sorveglianza nutrizionale nei bambini in Italia e di disporre di dati sul sovrappeso e obesità nei bambini di 8-9 anni da confrontare con quella di altri Paesi. Inoltre sarà possibile disporre di informazioni su alcuni possibili fattori di rischio per l'obesità: cattive abitudini alimentari, scarsa attività fisica, sedentarietà. La prima raccolta dati relativa a 45.590 alunni (tasso di rifiuto 3%), 46.469 genitori e 2.100 scuole ha evidenziato livelli preoccupanti di eccesso ponderale: il 23,6% dei bambini misurati è risultato in sovrappeso e il 12,3% in condizioni di obesità, con un'ampia variabilità regionale. Inoltre, è emerso che l'11% dei bambini non fa la prima colazione, l'82% una merenda troppo abbondante e il 23% non consuma quotidianamente frutta e verdura.

Anche i dati raccolti sull'attività fisica sono poco confortanti e la metà circa dei bambini guarda la TV per tre o più ore al giorno. Infine i genitori non sempre sembrano consapevoli dello stato ponderale dei propri figli. I dati che si raccoglieranno con lo studio di approfondimento del 2009 permetteranno di avere maggiori informazioni su questi aspetti.

Lo studio sugli adolescenti che si condurrà nell'anno scolastico 2009-2010 (ragazzi della I e III secondaria di I grado e II di II grado) fornirà dati su: stato ponderale, abitudini alimentari, attività fisica, sedentarietà, fumo e alcol.

Trasferibilità dei risultati

I due sistemi di raccolta dati possono rappresentare dei modelli per la raccolta di informazioni sulle tematiche in studio (alimentazione, attività fisica, fumo e alcol) espertabili a livello regionale e locale per seguire l'evoluzione dei fenomeni e iniziare attività di prevenzione. Inoltre i dati raccolti permetteranno all'Italia di partecipare a tre studi internazionali.

Sistema di sorveglianza di popolazione PASSI: assistenza per la messa a regime nelle ASL/Regioni

Promuovere nelle Regioni/PA la messa a regime 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 previste.

Obiettivo principale del progetto è la sorveglianza delle attività di prevenzione attuate dalle ASL, dato che il progetto si avvale anche della collaborazione degli operatori sanitari delle stesse Aziende. Ciò costituisce un importante valore aggiunto perché, a livello locale, 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 a livello locale.

Tutti i temi di indagine scelti sono priorità del Piano Nazionale della Prevenzione: Salute e qualità di vita percepita; Attività fisica; Fumo; Alimentazione; Alcol; Sicurezza stradale; Fattori di rischio cardiovascolare; Screening oncologici; Vaccinazioni dell'adulto; Salute mentale; Incidenti domestici; Aspetti socio-demografici. Passi dedica una particolare attenzione alle percezioni e alle conoscenze delle persone su stili di vita e attività preventive, nonché alle informazioni e ai 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, Guadagnare Salute), il progetto 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 di prevenzione e comunicazione sulle malattie croniche. Si mira a pianificare la messa a regime locale della sorveglianza, supportandone il consolidamento nelle Regioni/PA tramite assistenza continua, e a monitorare e valutare l'operatività locale. Nonostante la sperimentazione si trovi in una fase avanzata, il sistema deve essere consolidato in tutte le unità per gli aspetti metodologici, operativi, gestionali e si devono superare le variabilità -tra Regioni e all'interno delle Regioni nei requisiti strutturali e nelle performance. Ai fini del 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

A continuazione del triennio precedente si continuerà a realizzare una produzione scientifica *evidence-based* sulle tematiche 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: divulgativi, di conoscenza e di indirizzo e supporto per la programmazione in ambito di prevenzione. La comunicazione dei risultati sarà veicolata tramite diversi prodotti a popolazione nazionale generica, operatori di sanità pubblica, decisori e programmatori degli interventi preventivi. Ai fini programmatici 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.

Sistema di sorveglianza nazionale dell'interruzione volontaria di gravidanza (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 sentinella su isolamenti microbici e antibioticoresistenza: MICRONET e ARISS

In Italia, la sorveglianza delle malattie infettive è basata soprattutto sul Sistema di notifica obbligatorio, che prevede la segnalazione da parte dei medici dei casi clinici di malattia. Per alcune malattie, tuttavia, il quadro clinico non è sufficiente a garantire la specificità della diagnosi, che deve essere affiancata dalla conferma di laboratorio. La necessità di avere informazioni sull'eziologia di alcuni quadri clinici ha condotto negli anni passati all'attivazione in Italia di sistemi di sorveglianza ad hoc, ma essi richiedono la segnalazione dell'identificazione di singoli agenti, che, seppure altamente specifica, pone problemi di efficienza, perché può richiedere un'attività ulteriore ai microbiologi clinici con modalità differenziate per ogni specifica sorveglianza. Micronet sta creando un sistema di sorveglianza basato su laboratori di microbiologia che inviano a cadenze stabilite informazioni sulle infezioni confermate in laboratorio in maniera automatica e la antibiotico resistenza dei patogeni isolati. Esso mira a diventare un sistema di interscambio di dati microbiologici all'interno dell'SSN e a fondersi con le attività del progetto ARISS che fino al 2009 rappresenta il sistema per la produzione italiana di dati di antibiotico resistenza per il progetto europeo EARSS.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto sta realizzando un sistema di rilevazione e trasmissione automatica dei risultati di accertamento eziologico infettivo e resistenza agli antibiotici, in un campione di laboratori ospedalieri di microbiologia.

E in particolare:

- una rete sentinella di laboratori ospedalieri di microbiologia;
- una selezione di indicatori e uno standard di interscambio dati tra i laboratori finalizzati ad una sorveglianza a carattere nazionale;
- un collegamento tra la rete dei laboratori e i Centri epidemiologici regionali per l'analisi dei dati, la lettura dei risultati e l'integrazione con i dati di sorveglianza provenienti da fonti di informazioni cliniche;
- il monitoraggio della frequenza di identificazione di alcuni patogeni circolanti e della loro antibioticoresistenza;
- identificazione del possibile utilizzo dei dati provenienti dai laboratori nell'ambito di un sistema di allerta rapido nazionale.

Trasferibilità dei risultati

Micronet è un progetto di ricerca, non solo un problema tecnologico di interscambio dati esistenti. Esso necessita anche dello sviluppo di uno schema che permetta di confrontare e aggregare i risultati di diverso tipo provenienti da realtà diverse. Esso si pone come punto di incontro tra dati già esistenti e la loro diffusione all'interno dell'SSN, "generalizzando" dei risultati locali come parte di un quadro nazionale molto più complesso.

Al fine di garantire la massima trasferibilità, è prioritaria nel progetto la inclusione dei risultati provenienti da simili esperienze regionali esistenti. Micronet mira ad essere una piattaforma di interscambio e di raccolta dati non a imporre una tecnologia.

I dati raccolti potranno essere utilizzati a livello nazionale ed europeo per monitorare l'isolamento dei patogeni non soggetti a notifica e il monitoraggio delle antibioticoresistenza anche di patogeni non comuni.

Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta – SEIEVA

Lo scopo principale del SEIEVA è di promuovere a livello locale e nazionale l'indagine e il controllo sull'Epatite Virale Acuta (EVA). Attraverso l'integrazione di questionari epidemiologici con i risultati di laboratorio, i dati provenienti dalla sorveglianza possono essere utilizzati per la stima del contributo relativo dei diversi fattori di rischio. Ciò permette anche la definizione di misure preventive alle quali dare priorità ed il monitoraggio degli effetti dei diversi programmi di prevenzione.

- Obiettivi specifici:
 - Epidemiologia descrittiva dell'epatite virale acuta tipo specifico.
 - Precoce individuazione di focolai epidemici.
 - Valutare la proporzione dei casi di ciascun tipo di epatite acuta esposti a fattori di rischio noti.
 - Per ciascun tipo di epatite virale, studiare nel tempo le variazioni dei rischi relativo e attribuibile associati a particolari esposizioni.
 - Definire appropriate strategie di controllo basate sull'importanza relativa, a livello locale, dei diversi fattori di rischio.
- Metodo generale:
 - Intervista dei casi usando un questionario standardizzato di raccolta dei dati (Scheda SEIEVA) contenente informazioni demografiche e sui fattori di rischio; l'intervista ha luogo prima che sia noto il tipo di epatite.

- Registrazione dei *marker* sierologici disponibili.
- Ove necessario, soprattutto in caso di epidemie, verranno condotti studi analitici per valutare il ruolo dei diversi fattori di rischio.

Risultati attesi nel triennio

Valutazione del rischio di contrarre epatite B o C a seguito di una manovra invasiva diagnostica o terapeutica; confronto con rischi analoghi stimati con riferimento al periodo 1994-1999.

Aggiornamento sull'epidemiologia dell'epatite C; in particolare verrà valutato l'andamento dei tassi di incidenza e i fattori di rischio che attualmente sono responsabili della diffusione dell'epatite C, in Italia.

Studio dei casi di epatite B insorti in soggetti a rischio, per i quali è raccomandata e offerta gratuitamente la vaccinazione. Verranno studiati i casi di epatite B in: tossicodipendenti che frequentano i Ser.T., personale sanitario, emodializzati, conviventi di soggetti portatori cronici di HBsAg. Verranno inoltre studiati i casi insorti in soggetti che avrebbero dovuto essere vaccinati in base alla legge n. 165 del 1991.

Sorveglianza dei casi di epatite acuta B in soggetti vaccinati per epatite B. L'obiettivo principale è quello di procedere alla caratterizzazione virologica dei casi di epatite acuta B in soggetti che abbiano ricevuto in precedenza dosi di vaccino anti-epatite B, al fine di definire il ruolo svolto, nell'insorgenza di tali infezioni, dai mutanti virali dell'antigene di superficie. Si prevede che tale studio possa contribuire a definire meglio il ruolo esercitato dalla pressione immunologica nell'insorgenza di mutanti virali e fornire importanti addizionali informazioni sulla validità e quindi il controllo delle campagne vaccinali anti-epatite B.

Trasferibilità dei risultati

Attraverso un approfondito studio epidemiologico, che permetta di valutare l'incidenza e i fattori di rischio dei diversi tipi di epatite è possibile contribuire alla realizzazione di efficaci strategie di prevenzione.

Sistema Nazionale Linee Guida (SNLG): produzione di linee guida e strategie di implementazione

Il progetto si inserisce nell'ambito del Sistema Nazionale di Verifica e controllo dell'assistenza sanitaria (SiVeAS DM 17 giugno 2006) che prevede per l'SSN l'utilizzo delle risorse secondo criteri di efficienza ed 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. La convenzione, della durata di due anni, rinnovata e successivamente integrata, scadrà ad aprile 2010.

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 dell'SSN.

Collaborano infatti al programma il Settore Documentazione dell'ISS, la ASL 6 di Livorno, il Centro per la Valutazione dell'efficacia dell'assistenza sanitaria della ASL di Modena, la ASL Sa1 Nocera Inferiore Salerno, l'agenzia di giornalismo scientifico Zadig. Una collaborazione si è inoltre avviata per l'elaborazione di linee guida con il CNMR dell'ISS, la Società Italiana di Pediatria, e a livello internazionale la partecipazione al progetto europeo *Coordination on Cancer Clinical Practice Guidelines*.

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 per del percorso metodologico adottato: linee guida, *consensus conference*, e documenti rapidi.

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) che ospita: i documenti prodotti in full text, (comprese le versioni divulgative dei documenti), le web *community* dei membri dei gruppi di esperti multidisciplinari e la newsletter per l'aggiornamento delle iniziative dell'SNLG. Ulteriore impegno è la realizzazione della banca dati comparativa di linee guida, prodotta da agenzie nazionali e internazionali.

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 oggetti 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 non ancora chiaramente decodificato, 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. L'impegno del progetto è anche su questo fronte: sviluppare un documento strumento fruibile da un punto di vista dei contenuti e della forma con il coinvolgimento e il consenso anche delle società scientifiche.

Sopravvivenza per tumori in Europa (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.

- Rendere la banca dati disponibile online 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 nordamericani.

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 delle reazioni avverse da prodotti della medicina naturale

Un grande numero di persone è esposto a prodotti a base di erbe: bambini, anziani e donne in gravidanza usano la fitoterapia in quanto la ritengono più sicura. L'uso non è sempre basato su evidenze di efficacia, o limitato a sintomi e condizioni adatte ad automedicazione. Inoltre, i prodotti a base di erbe sono disponibili su internet o nelle erboristerie, e sono spesso acquistate senza alcun consiglio di personale sanitario adeguatamente informato.

Sono, inoltre, note e in continuo aumento sulle letteratura nazionale e internazionale segnalazioni di reazioni avverse a questi prodotti, a fronte di scarsi dati sulla loro efficacia.

Da aprile 2002 è iniziata la raccolta delle segnalazioni spontanee delle reazioni avverse da prodotti a base di piante officinali. La scheda, molto simile a quella in uso per la segnalazione spontanea di reazioni avverse a farmaci, può essere scaricata dal sito www.epicentro.iss.it e da vari altri siti web. Le schede compilate sono quindi inviate via fax al CNESPS dell'ISS, dove vengono inserite in un data base e analizzate periodicamente da un gruppo di esperti di varie discipline: epidemiologia, farmacovigilanza, farmacologia, tossicologia, fitoterapia, medicine tradizionali e omeopatia. Le segnalazioni di eventi gravi o di particolare interesse vengono comunicate tempestivamente all'Ufficio Farmacovigilanza per eventuali provvedimenti regolatori.

Risultati attesi nel triennio

Migliorare la conoscenza sulle reazioni avverse a prodotti della medicina naturale.

Sensibilizzare gli operatori sanitari sull'utilizzo di erbe medicinali da parte dei loro pazienti, includendo nell'anamnesi domande relative all'uso di erbe o prodotti "naturali" e gli utilizzatori a un corretto utilizzo delle erbe medicinali.

Organizzare e promuovere una campagna informativa sulla sicurezza delle medicine non convenzionali.

Promuovere l'integrazione con il sistema nazionale di farmacovigilanza.

Trasferibilità dei risultati

Attraverso i segnali di rischio raccolti si ritiene di fondamentale importanza produrre informazione di ritorno al personale sanitario e ai pazienti per aumentare la consapevolezza dell'uso di prodotti a base di sostanze naturali:

- organizzando seminari e convegni;
- fornendo lezioni a corsi e relazioni a convegni;
- pubblicando *case-report*, articoli su riviste a larga diffusione tra gli operatori sanitari come il Bollettino di Informazione sui Farmaci e Farmacovigilanza News;
- inserendo interventi su siti web;
- pubblicando su riviste internazionali;
- producendo materiale informativo.

Sorveglianza epidemiologica delle malattie prevenibili da vaccinazioni e rinforzo del Piano di eliminazione del morbillo e della rosolia congenita

Le vaccinazioni sono uno dei più importanti interventi di sanità pubblica ed è fondamentale disporre di fonti di informative adeguate che forniscano i dati necessari per mettere a punto le strategie di vaccinazione e valutarne l'efficacia sul campo.

I Livelli Essenziali di Assistenza prevedono le vaccinazioni contro nove malattie (DTP, poliomielite, epatite B, infezioni invasive da Hib, morbillo, rosolia e parotite), mentre il Piano Nazionale di eliminazione del morbillo e della rosolia congenita (PNEM), prevede che vengano attuate delle azioni straordinarie di vaccinazione rivolte ai bambini e ragazzi più grandi non adeguatamente vaccinati. Inoltre, la disponibilità sul mercato di nuovi vaccini contro il meningococco C, lo pneumococco e la varicella rende necessario valutare l'impatto di programmi mirati di vaccinazione.

I principali indicatori dei programmi vaccinali includono la sorveglianza delle malattie prevenibili ed il monitoraggio delle coperture vaccinali. In Italia, le malattie infettive prevenibili con le vaccinazioni sono soggette a notifica obbligatoria, mentre la valutazione della copertura vaccinale nei nuovi nati è basata su un flusso annuale di dati dalle ASL, alle Regioni al Ministero della Salute.

Negli anni, tuttavia, questi sistemi routinari sono stati affiancati da fonti informative *ad hoc* che hanno permesso di identificare le aree prioritarie di intervento e migliorare le coperture vaccinali, e hanno fornito informazioni per mettere a punto sia il Piano Nazionale Vaccini che il PNEM. Tuttavia, è necessario consolidare le attività esistenti ed integrarle con ulteriori dati epidemiologici che consentano di valutare le strategie vaccinali correnti, e programmare quelle future.

Gli obiettivi del progetto sono quindi:

- stimare attraverso sistemi sentinella i tassi di incidenza di pertosse, morbillo, rosolia, parotite epidemica e varicella in età pediatrica (0-14 anni di età), per fascia di età e area geografica (SPES)
- ottenere dati di copertura vaccinale regionali nei bambini nel secondo anno di vita e negli adolescenti di 16 anni di età (indagine ICONA).

Risultati attesi nel triennio

Con il presente progetto, si vogliono proseguire le attività avviate negli anni scorsi, in modo da ottenere i dati epidemiologici necessari per verificare l'impatto delle politiche vaccinali, sia per quanto riguarda i vaccini previsti di routine per tutti i nuovi nati, che per le attività di eliminazione di morbillo e rosolia. In particolare, oltre a proseguire la sorveglianza sentinella delle malattie prevenibili da vaccino, verranno analizzati i dati ottenuti con un'indagine campionaria di copertura vaccinale rivolta ai bambini di età compresa tra i 12 e i 24 mesi e ai ragazzi di 16 anni, in modo da stimare le coperture vaccinali in queste due fasce di età e modificare, se necessario, le attuali strategie vaccinali.

Trasferibilità dei risultati

I dati ottenuti dal progetto verranno utilizzati per identificare le aree prioritarie di intervento, valutare le strategie vaccinali correnti, e programmare quelle future. Verranno pubblicati rapporti e articoli scientifici, preparati in collaborazione con le Istituzioni sanitarie regionali e le società scientifiche per dare la maggior diffusione possibile ai risultati.

Sorveglianza epidemiologica integrata in salute mentale (SEME)

- Obiettivo generale

Sperimentare un sistema di sorveglianza che consenta di rilevare i nuovi casi di specifici disturbi mentali che giungono all'osservazione dei Centri di Salute Mentale (CSM), e di descrivere la variazione della loro frequenza in termini di tempo, spazio e persona.

- Obiettivi specifici:
 - Realizzare un'attività di sorveglianza di specifici disturbi mentali di particolare rilevanza basata su una rete di centri clinici sentinella;
 - Misurare la frequenza dei nuovi casi dei disturbi oggetto di sorveglianza e descrivere le caratteristiche delle persone che ne sono affette;
 - Valutare la frequenza dei disturbi in rapporto alle caratteristiche del servizio e alle caratteristiche socio-economiche del bacino di provenienza;
 - Descrivere le variazioni delle frequenze dei disturbi nel tempo e nello spazio in funzione delle caratteristiche demografiche;
 - Conoscere alcuni dati riguardanti il percorso del paziente, la gestione dei servizi, e gli esiti intermedi o finali.
- Programma di attività e Metodi:

Si intende sperimentare una rete di centri clinici sentinella che adottino tutti la stessa metodologia diagnostica e che segnalino tempestivamente i nuovi casi che giungono alla loro osservazione.

La sorveglianza è basata sulla raccolta delle segnalazioni delle nuove diagnosi effettuate presso i centri clinici sentinella individuati sulla base di elevati standard operativi e in modo che siano rappresentate sia aree urbane che aree rurali. La rete è costituita da 26 CSM dell'SSN. In ognuno dei centri partecipanti al programma, è stato attivato un sistema che rileva sistematicamente informazioni sui casi. Il sistema è basato su definizioni di caso dei singoli quadri clinici così come definiti in base ai criteri diagnostici internazionali (DSM-IV). Viene utilizzata l'intervista diagnostica standardizzata *Structured Clinical Interview for DSM-IV Disorders – Axis I*, che costituisce lo standard di riferimento universalmente accettato per la diagnosi dei disturbi mentali in base ai criteri diagnostici internazionali. I disturbi sottoposti a sorveglianza sono: la schizofrenia, il disturbo schizofreniforme, il disturbo schizoaffettivo, il disturbo bipolare I, l'anoressia mentale, l'episodio depressivo maggiore con sintomi psicotici o con recente anamnesi di tentato suicidio. Sono inoltre inclusi nella sorveglianza i suicidi portati a termine che riguardino pazienti noti ai CSM. Presso ogni CSM, gli psichiatri sono stati formati all'impiego dell'intervista diagnostica standardizzata. Essi saranno responsabili della qualità delle rilevazioni e si occuperanno di formare i propri colleghi, inoltre revisioneranno tutte le valutazioni diagnostiche effettuate presso il proprio centro. La trasmissione dei dati dai centri partecipanti al Programma viene effettuata mediante un sistema di segnalazione via web. Il sistema di sorveglianza si basa sull'inserimento da parte dei centri clinici delle segnalazioni di caso e dei relativi dati in un portale "dedicato". I dati relativi alle segnalazioni che affluiranno tramite Internet aggiorneranno automaticamente l'archivio generale del sistema e consentiranno di prevedere in automatico la redazione di tabelle di dati aggregati e una rappresentazione grafica per la valutazione istantanea degli andamenti. Il Sistema consentirà la conversione periodica dell'archivio completo in un formato compatibile con i moderni programmi di elaborazione statistica avanzata al fine di consentire elaborazioni sofisticate finalizzate alla redazione di articoli scientifici o di rapporti tecnici approfonditi.

Risultati attesi nel triennio

Disponibilità in tempo reale di dati sulla frequenza assoluta e gli andamenti semestrali e annuali dei disturbi.

Disponibilità periodica di dati riguardanti il percorso del paziente, la gestione da parte dei servizi e gli esiti intermedi o finali.

Disponibilità di informazioni riguardanti la relazione dei disturbi con le caratteristiche socio-economiche della zona.

I suddetti dati saranno pubblicati semestralmente su sito web dedicato e saranno oggetto oltre che di relazioni al committente anche di pubblicazioni scientifiche.

Trasferibilità dei risultati

Costituzione di una rete nazionale di centri clinici sentinella in grado di rilevare e segnalare con elevato grado di affidabilità diagnostica e puntualità i nuovi casi di disturbo mentale.

Disponibilità di metodi e tecniche per avviare un sistema di sorveglianza dei disturbi mentali.

Disponibilità e diffusione dei risultati scientifici.

Disponibilità di elementi conoscitivi utili alla pianificazione e valutazione di attività di promozione della salute mentale nei servizi.

Sorveglianza Epidemiologica Rapida della Mortalità nelle 21 città capoluogo di Regione/Provincia autonoma

Ai fini della *preparedness* rispetto ad eventi “acuti” che possono avere un forte impatto sulla mortalità (quali le ondate di calore o gravi epidemie – o addirittura pandemie – influenzali) l’Ufficio di Statistica conduce dal 2005 la sorveglianza epidemiologica rapida sulla mortalità nelle 21 città capoluogo di Regione/Provincia autonoma; essa è realizzata attraverso la raccolta attiva presso le Anagrafi comunali dei record individuali anonimi delle persone decedute durante ciascun mese dell’anno. Per garantire la *privacy*, le informazioni fornite vengono trattate in forma aggregata, per scopi statistico-scientifici, secondo quanto stabilito dalle norme vigenti in tema di tutela della *privacy*.

Risultati attesi nel triennio

I decessi osservati tra le persone residenti nelle città oggetto dell’indagine in ciascun mese, vengono posti a confronto con quelli attesi sulla base di quanto si è verificato nello stesso mese del triennio precedente, calcolando un *Rate Ratio* o “Rapporto di Mortalità” e il relativo intervallo di confidenza al 95%.

Trasferibilità dei risultati

I risultati della sorveglianza vengono messi a disposizione del Ministero della Salute e della comunità scientifica, degli operatori di sanità pubblica e della cittadinanza attraverso la pubblicazione dei risultati (sotto forma di tabelle) nella Sezione Mortalità del sito www.epicentro.iss.it.

Sorveglianza outcome neonatali nei nati pretermine

La necessità di approfondire le modalità con cui sono erogate le cure neonatali è dimostrata dalla variabilità, ancora molto ampia, di una serie di indicatori, che vanno da alcuni *outcome* maggiori, quali mortalità, malattia polmonare cronica, infezioni, e *outcome* neurologico, all’utilizzo di terapie e procedure quali la ventilazione meccanica, il surfattante profilattico, fino alle modalità di allattamento dei neonati alla dimissione.

Per promuovere la sorveglianza degli *outcome* neonatali dei nati pretermine attraverso l’analisi e l’interpretazione dei dati di attività e di struttura dei centri di Terapia intensiva neonatale italiani si propone una collaborazione tra il CNESPS dell’ISS, il Network Neonatale Italiano (NNI), la Società Italiana di Neonatologia (SIN) e il suo Gruppo di Studio sulla Qualità delle Cure.

Risultati attesi nel triennio

- Analisi epidemiologica approfondita dei dati di mortalità e morbilità dei nati pretermine in Italia disponibili attraverso l’NNI;

- creazione di un *report* annuale dettagliato per tutti i neonati di peso <1500 grammi assistiti nei centri di Terapia intensiva neonatale, nel quale si prendano in considerazione le differenze tra centri, tra Regioni e tra aree geografiche del Paese;
- miglioramento della qualità e della sicurezza delle cure rivolte ai nati pretermine di peso <1500 gr in Italia.

Trasferibilità dei risultati

La collaborazione con l'ISS permetterà di effettuare un'analisi epidemiologica approfondita dei dati di mortalità e morbilità dei nati pretermine in Italia arruolati nel network italiano e, grazie al ritorno e alla diffusione dell'informazione alle TIN partecipanti, faciliterà la predisposizione di raccomandazioni cliniche e programmi di aggiornamento professionale al fine di migliorare la qualità assistenziale.

Stress, personalità e funzionalità immunitaria e neuroendocrina

Lo studio, condotto su una popolazione di operatori sanitari, ha un disegno longitudinale (una valutazione iniziale e tre valutazioni di follow-up) e indaga le reciproche relazioni tra alcune caratteristiche di personalità rilevanti per la salute (capacità di regolazione emozionale, sicurezza nelle relazioni interpersonali strette) e le variazioni nel tempo del livello di stress sia oggettivo (eventi di vita potenzialmente stressanti) che soggettivo (stress percepito), del sostegno sociale, della morbilità generale, e della funzionalità dei sistemi immunitario e neuroendocrino.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio consentirà di acquisire dati di tipo longitudinale, rari in letteratura, sui rapporti tra lo stress, la morbilità, e la funzionalità neuroimmunoendocrina. Consentirà inoltre di indagare il possibile ruolo protettivo del sostegno sociale e l'influenza sul rischio per la salute correlato allo stress esercitata da alcuni specifici aspetti della personalità.

Trasferibilità dei risultati

I risultati dello studio saranno utili per delineare strategie di prevenzione basate sulla definizione di gruppi a rischio per gli effetti dello stress sulla salute fisica e mentale. Consentiranno inoltre di identificare aspetti della personalità che possano essere oggetto di interventi psicosociali intesi a ridurre lo stress e a incrementare il sostegno sociale.

Studi di prevalenza dei disturbi psichiatrici nella popolazione generale, di prevalenza dei disturbi psichiatrici nella popolazione lavorativa in rapporto a fattori socio-economici, di incidenza della anoressia mentale in Italia

È proseguito il lavoro di analisi e disseminazione dei principali risultati degli studi ESEMeD ed EPREMED sulla prevalenza dei più comuni disturbi mentali nella popolazione generale e l'uso dei servizi sanitari ad essi collegato. Le analisi sono state oggetto di un articolo scientifico e di un capitolo del libro di Kessler, RC & Ustun, TB Eds. *The WHO World Mental Health Surveys: Global Perspectives on the Epidemiology of Mental Disorders*, Cambridge University Press, 2008.

È stato organizzato e condotto un *focus* nazionale di esperti sui risultati dello studio ESEMeD. Al *focus* hanno partecipato rappresentanti delle associazioni dei familiari e dei pazienti, del Ministero della Salute, dei medici di medicina generale, della psichiatria accademica, del governo e dei media. Obiettivi del *focus* erano presentare i risultati dello studio e discutere sulle modalità più efficaci di divulgazione degli stessi anche per sostenere decisioni in tema di politica sanitaria.

È stato fatto uno studio che ha indagato la relazione tra diversi fattori psicosociali in ambiente lavorativo e morbilità psichiatrica. Lo studio, condotto in una popolazione del settore sanitario, ha mostrato un'unica associazione tra giustizia (sostegno e ascolto che si riceve dai superiori in caso di difficoltà sul lavoro; equità e giustizia nei riconoscimenti e negli avanzamenti di carriera; ricevere informazioni sufficienti e non contraddittorie dai superiori; chiarezza dei compiti e delle responsabilità) e morbilità psichiatrica.

Si è svolto in collaborazione, nell'ambito del sistema di sorveglianza PASSI, uno studio sulla prevalenza delle persone positive allo screening per la depressione in un campione di oltre 20.000 adulti italiani di 18-69 anni. La prevalenza è risultata essere del 9%.

Si è condotto uno studio sulle ospedalizzazioni in Italia per anoressia mentale in persone di età 10-19 anni utilizzando le schede di dimissione ospedaliera.

Risultati attesi nel triennio

Dati sulla prevalenza, incidenza e sui fattori di rischio dei disturbi mentali nella popolazione generale, sul carico assistenziale e sui costi diretti e indiretti nel nostro Paese, in confronto al carico e ai costi di altri Paesi europei.

Dati sulla relazione tra disturbi mentali e situazioni di disagio psichico, che di per sé non consentono di fare una diagnosi di disturbo mentale.

Disponibilità di elementi conoscitivi utili alle attività di pianificazione dei servizi.

Disponibilità, per ricercatori e clinici del settore, di linee guida per l'applicazione di "buone pratiche per la ricerca sulla frequenza e monitoraggio dei disturbi mentali".

Trasferibilità dei risultati

I dati verranno comunicati, oltre che alla comunità scientifica, ai media, alle associazioni di pazienti e di familiari, e ai cittadini tutti, mediante eventi congressuali e campagne informative.

Possibile trasferibilità della metodologia di ricerca adottata a studi successivi di monitoraggio dei disturbi mentali.

Possibile trasferibilità di parte degli strumenti di indagine adottati, a studi di valutazione del malessere e benessere psichici e di individuazione dei fattori di rischio.

Studi epidemiologici sui militari italiani impegnati in missioni in Bosnia e Kosovo

Il Ministero della Salute ha incaricato l'ISS della realizzazione di ricerche finalizzate a valutare l'impatto sulla salute della permanenza del personale militare italiano nei territori della Bosnia-Herzegovina e del Kosovo, dove sono state utilizzate munizioni ad uranio impoverito ("Progetto di sorveglianza epidemiologica dei tumori nella popolazione militare impegnata in Bosnia-Herzegovina e nel Kosovo", incluso nel programma nazionale della ricerca sanitaria).

Sono previsti due studi epidemiologici retrospettivi di coorte, sulla mortalità e sull'incidenza di tumori tra i membri del contingente impegnato in tali missioni.

L'identificazione dei soggetti eligibili per gli studi viene effettuata con la DG della Sanità Militare e con l'Arma dei Carabinieri, in attuazione di specifici accordi di collaborazione.

Abbiamo potuto stimare in circa 65.000 i soggetti eligibili per la coorte "Balcani". Una coorte di Carabinieri di controllo verrà individuata tra il personale mai inviato in missione, sarà equinumerosa e appaiata alla coorte "Balcani" per sesso, età e periodo di servizio.

Per lo studio di mortalità verranno accertati lo stato in vita e l'eventuale data e luogo di morte di ciascun soggetto incluso nelle due coorti tramite le anagrafi comunali; la causa principale del decesso verrà richiesta ai comuni o alle ASL di residenza al momento del decesso; il codice attribuito alla causa principale di morte verrà individuato mediante *record-linkage* con la base-dati anonima di mortalità dell'ISTAT.

Per lo studio d'incidenza tumori, in mancanza di un registro tumori a copertura nazionale in Italia, verrà effettuato un *record-linkage* con il database nazionale delle schede di dimissione

ospedaliera (SDO) allo scopo di individuare i ricoveri con una neoplasia come diagnosi di dimissione; verranno quindi recuperate le cartelle cliniche relative a tali ricoveri per validare la diagnosi di dimissione e identificare la data di diagnosi.

Risultati attesi nel triennio

Verranno stimati i rischi di particolari cause di morte e di specifiche neoplasie in relazione all'aver effettuato missioni nei Balcani. A questo scopo, verranno confrontati i tassi di mortalità e di incidenza di tumori osservati nella coorte "Balcani" con quelli espressi dalla coorte di controllo.

Studi epidemiologici sulla sindrome influenzale e la vaccinazione antinfluenzale

L'impatto dell'influenza epidemica sulla popolazione è un argomento riconosciuto come prioritario al livello internazionale. 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 (vaccinazione, uso di antivirali). Tuttavia, documentare l'impatto dell'influenza sulla popolazione non è semplice. In Italia dal 1999 è attivo un Sistema di Sorveglianza della sindrome influenzale grazie al quale è possibile stimare ogni anno l'influenza stagionale colpisce il 5-10% della popolazione, a seconda del sottotipo virale circolante e della corrispondenza con i ceppi contenuti nel vaccino. Purtroppo però, 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. Tuttavia vengono utilizzate delle misure indirette, attraverso dei modelli, che permettono di stimare l'eccesso di mortalità e di ospedalizzazioni attribuibili ad influenza. Inoltre questi dati possono essere molto utili anche per valutare l'efficacia di campo del vaccino antinfluenzale (studi ecologici). La vaccinazione antinfluenzale nei gruppi a rischio è un'attività di prevenzione di provata efficacia: 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

- Il progetto si propone di migliorare le 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.
- Valutare la copertura l'accettabilità e promuovere la vaccinazione antinfluenzale in operatori sanitari attraverso uno studio pilota condotto nella Regione Emilia Romagna.
- Stima dell'efficacia della vaccinazione antinfluenzale.

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, negli ultimi 30 anni, la proporzione di anziani è incrementata notevolmente in Italia, facendo diventare la popolazione la più anziana d'Europa. 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.

Studi epidemiologico-molecolari su epidemie da virus epatitici a trasmissione parenterale negli ospedali

Le infezioni da virus epatitici a trasmissione parenterale, epatte B e C, nonostante la riduzione dell'incidenza dovuta al controllo del sangue, al miglioramento delle condizioni igieniche e alla vaccinazione anti-HBV, continuano a verificarsi in ambiente nosocomiale e talvolta si presentano in forma epidemica.

Attraverso il sistema di sorveglianza SEIEVA, giungono talvolta al nostro Reparto segnalazioni di tali epidemie, che vengono indagate con metodiche di epidemiologia molecolare. Si tratta di indagini in cui l'indagine epidemiologica classica si affianca all'impiego di metodiche virologico molecolari che servono a dimostrare la relazione clonale tra i virus isolati dai vari pazienti o dall'ambiente, cioè la loro identità, segno d'infezione da sorgente comune e spesso di trasmissione da paziente a paziente.

Risultati attesi nel triennio

Tali indagini sono di fondamentale importanza per individuare la sorgente e le modalità di trasmissione dell'epidemie nosocomiali, consentendo pertanto una conoscenza più approfondita dell'epidemiologia delle infezioni da HCV e HBV in ambiente ospedaliero, nonché la messa in atto di misure di controllo e prevenzione mirate.

Trasferibilità dei risultati

L'infezioni e le epidemie da virus epatitici in ospedale costituiscono un importante problema di sanità pubblica, perché oltre ai danni sui pazienti esse sono responsabili di un aggravio notevole di costi per il sistema sanitario nazionale. Attraverso lo studio di queste epidemie è possibile acquisire una migliore conoscenza dell'epidemiologia di questi virus nell'ambiente ospedaliero, così da permettere la formulazione, l'attuazione e l'implementazione di protocolli di controllo e prevenzione delle infezioni realmente efficaci.

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 associare degli 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.

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 monozigoti (MZ) e dizigoti (DZ) estratti dal Registro nazionale gemelli. Per l'analisi dei dati si utilizzeranno appositi modelli di equazioni strutturali: l'ereditabilità di un endofenotipo viene stimata esaminando la sua correlazione nelle coppie MZ e DZ, mentre 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 a fini diagnostico/prognostici e per il monitoraggio della terapia, di marker bioumorali associati allo scompenso cardiaco, in primo luogo BNP e NT-proBNP

Lo scompenso cardiaco (SC) è una condizione grave la cui diagnosi tardiva può ridurre notevolmente la qualità di vita in quanto importante causa di morbosità e invalidità in età avanzata e una delle cause più frequenti di ricovero ospedaliero. Ciononostante, molte persone anziane non sanno di esserne affette e non ricevono cure preventive e trattamenti adeguati.

L'SC riconosce diverse condizioni antecedenti l'insorgenza: più frequente è la cardiopatia coronarica, incluso il vecchio infarto responsabile di circa la metà dei casi, l'ipertensione arteriosa, il diabete, la cardiomiopatia, le aritmie e l'abuso di alcol. La predittività della condizione di SC appare un importante obiettivo di ricerca in considerazione delle potenziali ricadute sulla prevenzione o sulla possibilità di ritardarne l'insorgenza.

Il progetto, utilizzando i dati e i campioni biologici raccolti nell'indagine sul campo dell'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare 2008-2011, si propone di:

- stimare la prevalenza di alcune condizioni a rischio per lo scompenso cardiaco (ipertensione arteriosa, diabete mellito, pazienti affetti da cardiopatia ischemica, sopravvissuti ad evento acuto di infarto del miocardio) in un campione rappresentativo della popolazione italiana di età 55-79 anni estratto in ogni regione, pari a circa 2.000 uomini e donne;
- raccogliere e conservare in azoto liquido campioni biologici per determinare marcatori bioumorali associati allo scompenso cardiaco come il peptide natriuretico (BNP) nel plasma;
- costituire la linea-base per il futuro follow-up di persone anziane per valutare il valore predittivo di alcune condizioni a rischio e di marcatori bioumorali dello scompenso cardiaco.

Risultati attesi nel triennio

Stima della prevalenza delle condizioni a rischio nella popolazione generale di età 55-79 anni per l'SC quali malattia ischemica del cuore (diagnosticata attraverso ECG letto secondo il codice Minnesota, e i questionari di angina e infarto della *London School of Hygiene and Tropical Medicine*), aritmie, diabete e ipertensione.

Determinazione del peptide natriuretico BNP nella popolazione esaminata e studio della associazione con le altre condizioni di rischio per l'SC.

Stimare se l'ECG e la determinazione del BNP possono essere sufficienti come mezzo di screening per valutare la probabilità di andare incontro a SC.

Trasferibilità dei risultati

Disponibilità dei dati di prevalenza dell'SC e delle condizioni di rischio di SC per l'Italia e per macroaree geografiche raccolti con metodologie standardizzate in un campione rappresentativo della popolazione generale di età 55-79 anni. Tali dati possono identificare aree e pazienti a maggior rischio e aiutare a pianificare interventi mirati alla prevenzione.

Valutata la predittività dell'ECG e del BNP nei confronti dell'SC, preparare raccomandazioni per l'identificazione dei pazienti che non sanno di essere candidati all'SC.

Studio caso controllo sull'effetto dell'assunzione di acido folico sulle gravidanze gemellari

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. Inoltre, come ulteriore obiettivo, 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 si propone di arruolare 500 mamme di gemelli con non più di cinque anni. Ad ogni mamma arruolata viene chiesto di far partecipare allo studio altre due mamme di bambini non gemelli che hanno più o meno la stessa età dei gemelli.

A tutte viene chiesto di compilare un questionario riguardante l'eventuale assunzione di acido folico e le abitudini alimentari nel periodo precedente e durante la gravidanza. Inoltre, al fine di realizzare il secondo obiettivo, chiediamo alle mamme di donare un campione di saliva da cui verrà estratto e analizzato il DNA per quanto concerne i geni candidati per il metabolismo dell'acido folico. Il campione di DNA verrà poi conservato nella banca biologica del Registro nazionale gemelli.

Risultati attesi nel triennio

Risultati principali:

- Stima dell'*odds ratio* (OR) di avere una gravidanza gemellare dato (o no) l'assunzione di acido folico:
 - solo prima del concepimento ;
 - solo dopo il concepimento;
 - prima e dopo il concepimento;
- Stima dell'*odds ratio* (OR) di avere una gravidanza gemellare dato (o no) l'assunzione di acido folico come nei punti precedenti per le gravidanze da procreazione medicalmente assistita e da gravidanze spontanee.
- 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.

Studio clinico sulla crioconservazione di ovociti e follow-up dei nati a seguito dell'applicazione di tali tecniche

Si crioconserveranno gli ovociti soprannumerari delle pazienti consenzienti, che si sono sottoposte a stimolazione ovarica e prelievo ovocitario.

Si procederà al congelamento qualora venisse recuperato un numero di ovociti maturi e morfologicamente normali superiore a quelli necessari alla procedura *in vitro*.

Risultati attesi nel triennio

Ci si aspetta di ottenere una percentuale di gravidanze paragonabili a quelle ottenute con ciclo a fresco. Si confronteranno i protocolli di crioconservazione: i risultati di *slow freezing* con quelli della vitrificazione.

Trasferibilità dei risultati

I risultati potranno fornire indicazioni sull'efficacia dei due protocolli di crioconservazione applicati agli ovociti soprannumerari.

Studio comparativo 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 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.

Il disegno dello studio è un trial clinico randomizzato, multicentrico, della durata di tre anni.

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 DAI: complicanze macroangiopatiche nei pazienti diabetici di tipo 2 afferenti ai servizi di diabetologia italiani

Il diabete è una patologia particolarmente rilevante soprattutto per le numerose complicanze micro e macrovascolari cui i pazienti vanno incontro. Lo studio DAI, è uno studio multicentrico di coorte che si è posto come obiettivo principale lo studio delle complicanze macrovascolari nei pazienti con diabete di tipo 2 afferenti ai servizi di diabetologia italiani. Obiettivi specifici

dello studio sono: stima della prevalenza e incidenza dell'infarto, della cardiopatia ischemica, delle tromboembolie cerebrali, delle amputazioni e degli interventi di angioplastica e di bypass aorto-coronarico; analisi dei fattori di rischio delle complicanze macrovascolari; analisi della variabilità delle abitudini terapeutiche e delle prestazioni offerte dai servizi; valutazione dei modelli terapeutici utilizzati per il controllo della glicemia.

In una prima fase hanno partecipato allo studio 201 servizi di diabetologia sui circa 650 attivi in Italia. Successivamente, 157 centri per un totale di 14.432 pazienti hanno accettato di seguire i pazienti con follow-up annuali fino al 31/12/2003 per lo studio di incidenza.

Raccolta dei dati

Lo studio è stato condotto su un campione casuale rappresentativo di tutti i pazienti visitati presso i servizi partecipanti nel periodo settembre-dicembre 1998, o nel periodo marzo-giugno 1999.

Risultati attesi nel triennio

- Valutazione dell'incidenza delle complicanze macrovascolari in relazione a fattori di rischio quali dislipidemia, ipertensione e accumulo di grasso viscerale.
- Valutazione dei fattori di rischio per l'incidenza di recidive.
- Definizione di modelli previsionali di rischio cardiovascolare.

Trasferibilità dei risultati

- Pubblicazione di *report* periodici sull'andamento dello studio.
- Organizzazione di seminari di aggiornamento e di convegni annuali sulle complicanze macroangiopatiche nei pazienti diabetici.
- Relazioni a convegni e pubblicazioni scientifiche.

Studio del trend in discesa della mortalità coronarica e cerebrovascolare: applicazione del modello IMPACT

In Italia i tassi di mortalità per cardiopatia coronarica hanno avuto un andamento in discesa a partire dalla metà degli anni '70, mantenendosi a livelli molto più bassi rispetto ai Paesi del nord Europa e agli Stati Uniti. 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 Stati Uniti, 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%).

Lo studio è stato inserito nel programma di formazione "European Union Marie Curie Conferences and Training Courses EURO-CVD model".

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 delle cause di mortalità e morbidità materna e messa a punto di modelli di sorveglianza della mortalità materna

La sottostima del rapporto di mortalità materna attraverso il flusso informativo corrente in Italia sommata al potenziale aumento del fenomeno a seguito dell'aumento dell'età media al parto, dell'incremento delle donne straniere in età riproduttiva e dell'aumento dei parti mediante taglio cesareo, giustifica l'obiettivo di questo progetto che consiste nel correggere la sottostima del rapporto di mortalità materna in Italia e rilevare le principali cause di morbidità e mortalità materna attraverso studi di *record linkage* in diverse Regioni del Paese e nella messa a punto di modelli di sorveglianza della mortalità materna. Il progetto coordinato dall'ISS vedrà la collaborazione della WHO e la partecipazione di alcune Regioni italiane e del supporto tecnico e metodologico del CeVEAS (Centro per la valutazione dell'efficacia dell'assistenza sanitaria).

Risultati attesi nel triennio

- Definizione del rapporto di mortalità materna
- Definizione delle principali cause di mortalità materna
- Definizione delle principali cause di morbidità materna
- Disegno di uno o più modelli operativi di sistema di sorveglianza della mortalità materna che possano essere implementati in Italia e in altri Paesi comunitari in collaborazione con la WHO.
- Produzione di un *report* che possa essere utilizzato dagli operatori del settore.

Trasferibilità dei risultati

La metodologia messa a punto dal progetto sia per gli studi di *record linkage* sia nel disegno di modelli operativi di sistemi di sorveglianza della mortalità materna potrà trovare applicazione a livello nazionale e in altri Paesi comunitari con particolare riferimento all'Est europeo in collaborazione con la WHO.

Studio di coorte di neonati gemelli

Il progetto è uno studio pilota condotto insieme al Policlinico Umberto I di Roma e l'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Pisa. Obiettivo dello studio è la stima dell'ereditabilità

(proporzione di varianza genetica sulla varianza fenotipica totale) 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. In particolare, per quanto riguarda i fattori genetici, saranno analizzate alcune varianti del DNA (dei neonati e dei genitori) naturalmente presenti nella popolazione umana, che regolano il peso, l'appetito, l'assorbimento, il metabolismo e il consumo energetico, e tutti quei fattori che concorrono all'accrescimento di un individuo. 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, personalmente o per telefono, 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.

Studio di gemelli per la determinazione della componente ereditabile del Morbo di Crohn e della Colite Ulcerosa (*Inflammatory Bowel Disease, IBD*)

L'obiettivo è uno studio, su base di popolazione, della concordanza nei gemelli dell'IBD per valutare il ruolo attribuibile alla componente genetica. Gli obiettivi specifici sono:

- il confronto delle concordanze per zigosità e genere (MZ e DZ stesso sesso e sesso opposto);
- il tempo di discordanza nell'insorgenza di malattia tra il gemello probando e il suo cogramello;
- il tasso di progressione verso la malattia distinto per zigosità;
- il confronto delle concordanze tra aree/regioni con incidenza diversa;
- il confronto delle concordanze tra le diverse coorti di nascita;
- la stima delle concordanze stratificate per genotipi di rischio nei *loci* di suscettibilità noti;
- la stima dell'ereditabilità e dei fattori ambientali condivisi e individuali.

I casi saranno identificati dai centri afferenti al gruppo IG-IBD (*Italian Group for IBD*) distribuiti su tutto il territorio nazionale. I gemelli fra i casi saranno identificati dal Reparto di Epidemiologia genetica attraverso un *record-linkage* dei casi di IBD con il Registro Nazionale dei Gemelli. I gastroenterologi di riferimento eseguiranno la verifica della condizione di gemello, la validazione della diagnosi di IBD nel probando, la raccolta dei dati clinico e anamnestici, e l'esame clinico del cogramello. Un campione biologico verrà raccolto da entrambi

i gemelli di ogni coppia per l'attribuzione della zigosità e per la genotipizzazione delle varianti di suscettibilità alla malattia.

Risultati attesi nel triennio

Su una popolazione di 15.000 pazienti affetti da IBD sono stati identificati circa 100 coppie di gemelli. Si sta procedendo con la verifica dei restanti pazienti. A tutti viene somministrato un questionario sulla patologia, compilato dal medico, e richiesto un campione di saliva per l'estrazione di DNA.

Trasferibilità dei risultati

La ricaduta immediata dello studio attiene all'ambito clinico: le stime emerse saranno utili al gastroenterologo per la consulenza sul rischio di ricorrenza della malattia in ambito gemellare e familiare.

Studio gemellare sui correlati biologici del benessere psicologico

In questo progetto, che è stato proposto nell'ambito del Bando per Giovani Ricercatori, sarà condotto uno studio gemellare 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 neuroendocrino (cortisolo, adrenalina, noradrenalina, NGF, BDNF), immunitario (chemochine, recettori delle chemochine, citochine pro- e anti-infiammatorie) e cardiovascolare (indice di massa corporea, profilo glicemico e lipidico). Il progetto, di durata triennale, prevede una collaborazione tra il Reparto di Epidemiologia genetica dell'ISS con i Reparti di Salute mentale, Neuroendocrinologia e Neuroscienze comportamentali dell'ISS, e la Facoltà di Psicologia 2 dell'Università Sapienza. Almeno 2.000 coppie di gemelli, residenti a Roma e di età superiore ai 18 anni, saranno reclutate nello studio tramite il Registro Nazionale Gemelli. Il primo anno sarà dedicato al reclutamento dei gemelli e alla somministrazione, per via postale, di questionari riguardanti varie misure di benessere psicologico. Nella fase di reclutamento, ai gemelli sarà anche chiesto il consenso a donare un campione di sangue o di saliva. Nel secondo anno, sarà completata la raccolta dei dati psicologici, e almeno 300 coppie di gemelli tra quelle che avranno acconsentito alla donazione dei campioni biologici saranno invitate in ISS per la raccolta dei campioni, che saranno conservati nella banca biologica del CNESPS dell'ISS. In questa fase, i questionari sul benessere psicologico saranno nuovamente somministrati da psicologi per ottenere misure più affidabili sul benessere psicologico. 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. Ciò significa che, oltre a testare l'associazione tra salute mentale e *outcome* di tipo biologico (neuroendocrino, 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 ed 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 ed 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

Questo progetto sarà il primo in Italia a stimare le componenti genetica e ambientale del benessere psicologico, ma soprattutto sarà il primo al mondo ad esplorare, da un punto di vista epidemiologico-genetico, l'associazione tra il benessere psicologico e una serie di parametri biologici rilevanti per la salute, fornendo evidenze sul ruolo di mediazione di geni e ambiente in tale associazione.

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 stima della componente genetica del benessere psicologico costituirà la base per la ricerca delle varianti geniche rilevanti. La valutazione di interazioni di tipo geni-ambiente sarà di aiuto nell'identificare fattori ambientali in grado di modificare (amplificare o attenuare) l'espressione della predisposizione genetica individuale al benessere psicologico. Sulla base di questi fattori, sarà possibile una migliore pianificazione degli interventi ambientali ed anche l'identificazione di sottogruppi della popolazione nei quali le strategie di individuazione delle varianti geniche rilevanti potrebbe essere più efficace.

La quantificazione della base genetica e ambientale della relazione tra benessere psicologico e funzionalità biologica fornirà evidenze su nuovi meccanismi rilevanti per la salute. La conoscenza di questi meccanismi psico-biologici sarà fondamentale per la pianificazione e l'implementazione di strategie di intervento intese a promuovere contemporaneamente la salute mentale e fisica, due aree che sono state spesso investigate in modo separato nel passato. Ciò permetterà di ridurre il carico di sofferenza in entrambe le aree, portando in ultima analisi ad una riduzione dei costi per la comunità.

Studio multicentrico sulla sicurezza dei farmaci in pediatria

Lo studio è iniziato nel 1999 e coinvolge attualmente quattro ospedali pediatrici: L'Azienda ospedaliera Santobono-Pausilipon di Napoli; il Dipartimento di Pediatria dell'Università di Padova; l'Istituto Giannina Gaslini di Genova; l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma.

Lo studio è coordinato dal CNESPS dell'ISS. Vengono arruolati tutti i bambini, ricoverati tramite pronto soccorso, per le seguenti quattro patologie: piastrinopenie; lesioni esofago-gastroduodenali; disturbi del sistema nervoso centrale e neuropatie periferiche; malattie mucocutanee non infettive e vasculiti.

L'esposizione a farmaci di bambini arruolati nello studio è stata ricavata tramite intervista a un genitore su un questionario standardizzato, durante il ricovero del bambino, ed è relativa all'assunzione del farmaco (e/o del vaccino) da parte del bambino nelle tre settimane (sei settimane nel caso dei vaccini) precedenti l'inizio dei sintomi che hanno portato al ricovero. Per la stima di eventuali associazioni tra farmaci ed eventi avversi viene utilizzato un disegno di studio di tipo caso-controllo. L'esposizione ad un farmaco dei bambini ricoverati per una delle quattro patologie (casi) viene confrontata con l'esposizione dei bambini nelle tre patologie rimanenti (controlli).

Risultati attesi nel triennio

Approfondire il ruolo causale dei farmaci e dei vaccini nell'insorgenza di alcune patologie gravi nei bambini.

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

I principali risultati hanno riguardato problemi neurologici associati a metoclopramide e nafazolina; insorgenza di malattie muco-cutanee e uso di acido niflumico. La metoclopramide, indicata per nausea e vomito, è risultata associata a sintomi extrapiramidali. La nafazolina, indicata come decongestionante sia nasale che oculare e nel trattamento dei sintomi dell'otite, è risultata associata a depressione del sistema nervoso centrale. È stato inoltre stimato un elevato rischio di ricovero per malattie muco-cutanee associato all'uso di acido niflumico, un'antiinfiammatorio non steroideo molto utilizzato in pediatria. 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. E' stata fatta una rivalutazione del profilo beneficio/rischio di tutti i decongestionanti nasali che hanno portato alla controindicazione dell'uso in età pediatrica.

Lo studio ha permesso di verificare numerosi segnali di rischio richiesti dall'Ufficio di Farmacovigilanza: sovradosaggio di antistaminici, allergenicità di alcuni antibiotici, ecc.

Studio qualità dei gameti

Analisi dello stato cromosomico di gameti maschili e femminili attraverso tecniche messe a punto per valutare la competenza cromosomica.

Documentazione del processo cinetico di metilazione globale e specifico della cromatina materna (*imprinting* genomico) durante la fase di accrescimento della cellula uovo.

Risultati attesi nel triennio

Identificazione di nuove metodiche sensibili e non invasive per la valutazione della qualità dei gameti umani nel processo di PMA.

Trasferibilità dei risultati

L'impatto scientifico dei risultati darà un importante contributo alla conoscenza dei fenomeni che sono alla base delle prime fasi di sviluppo embrionale nella popolazione infertile che si sottopone a PMA. Inoltre una valutazione dell'assetto epigenetico delle cellule uovo e il loro sviluppo embrionale da può rappresentare uno strumento per comprendere e rimuovere le cause che determinano disordini dell'*imprinting* genomico.

Studio su ospedalizzazioni e mortalità per Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA)

Lo studio si propone di descrivere la mortalità e la morbosità per SLA in Italia a partire da fonti di dati "correnti" a copertura nazionale: i dati di mortalità di fonte ISTAT e i dati relativi alle schede di dimissione ospedaliera (SDO) raccolti dal Ministero della Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali.

In particolare, verranno analizzati i dati relativi a record individuali anonimi che provengono da tre distinte fonti: i) la base dati di Mortalità ; ii) la base dati delle Cause multiple di Morte; iii) il database delle Schede di Dimissione Ospedaliera.

Lo studio è condotto nell'ambito del *work package* "Describing the epidemiology of ALS in Italy using multiple national data sources" del progetto "Proposal for an integrated approach to rare diseases: a study between basic laboratory models and clinical epidemiology in amyotrophic lateral sclerosis" (coordinato presso il CNMR dell'ISS) e del progetto "Osservatorio Epidemiologico SLA" inserito Programma Statistico Nazionale 2008-2010-aggiornamenti 2010 (cod. ISS00031).

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi sono:

- descrizione aggiornata della mortalità per SLA, per genere ed età, nelle Regioni e Province italiane e studio del trend temporale;
- studio dei “percorsi di ospedalizzazione” dei pazienti SLA con particolare attenzione alle procedure cliniche e chirurgiche alle quali vengono sottoposti i pazienti in caso di ricovero e alle comorbidità;
- stima del numero di “prime ospedalizzazioni” e valutazione della fattibilità di stime di prevalenza mediante integrazione delle fonti.

Trasferibilità dei risultati

I risultati prodotti potranno contribuire alla stima a livello regionale dei bisogni sanitari e socio-assistenziali dei pazienti affetti da SLA.

Studio sui cicli singoli di trattamento da tecniche di PMA e sui nati da tali tecniche

Lo studio ha come obiettivo principale quello di raccogliere dati relativi alle tecniche di riproduzione assistita a livello di cicli singoli, per poter così valutare le complicanze delle terapie sulla donna e degli esiti neonatali e di analizzare i risultati ottenuti dalle varie tecniche di PMA correlandoli alle diverse caratteristiche socio-demografiche della donna.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si prefigge di ottenere dati dettagliati e di buona qualità. L’accuratezza delle informazioni raccolte permetterà di validare ulteriormente il programma di raccolta utilizzato, ideato e fornito ai centri di PMA iscritti al Registro Nazionale di PMA dell’ISS.

Trasferibilità dei risultati

Lo studio multicentrico coinvolgerà strutture sia pubbliche che private che si occupano di PMA in Italia. Permetterà di valutare l’efficacia e la sicurezza, per ogni singolo ciclo, delle differenti tecniche su embrioni non congelati, congelati e ottenuti da ovociti crioconservati.

Studio sul fenomeno suicidario

La linea di ricerca intende fornire un quadro epidemiologico aggiornato del fenomeno a livello nazionale, regionale e sub-regionale con particolare attenzione alla variabilità del fenomeno tra gli adolescenti e ai metodi utilizzati per attuare il gesto suicidario. Le analisi verranno condotte a partire da due fonti esaustive di dati “correnti”: i dati di mortalità di fonte ISTAT e la base dati delle Schede di Dimissione Ospedaliera (SDO) del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali. Lo studio è svolto in collaborazione tra L’Ufficio di Statistica dell’ISS, il Reparto di Farmacoepidemiologia del CNESPS e il Dipartimento di Psichiatria dell’Ospedale Sant’Andrea.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi sono così sintetizzabili: i) 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; ii) stima del fenomeno dei *masked suicide*; iii) stima delle differenze per genere e stato civile; iv) valutazione della possibilità di ottenere stime affidabili dei tentativi di suicidio a partire dai dati SDO.

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 e alla programmazione degli interventi volti alla promozione della salute mentale.

Studio sull'incidenza delle coppie italiane che si rivolgono a centri esteri per l'applicazione di tecniche di PMA

Valutazione dell'incidenza e dell'affluenza delle coppie italiane che si rivolgono all'estero per le tecniche di PMA e studio delle complicanze materne dovute ad applicazione di protocolli di iperstimolazione ovarica adottati nelle tecniche di riproduzione assistita eseguite sia in Italia che all'estero. Indagine multicentrica retrospettiva e prospettica con tutti i rappresentanti dei registri europei e in particolare dei Paesi nei quali è ormai attivo un flusso di pazienti italiani (Spagna, Svizzera, Belgio, Austria, Olanda). Una successiva fase dello studio verrà svolta in Italia con la realizzazione di un'indagine multicentrica in collaborazione con alcune Regioni pilota e ASL distretti sanitari, per valutare l'incidenza dei ricoveri in ambito ospedaliero/universitario per complicanze materne dovute ad applicazione di protocolli terapeutici adottati nelle tecniche di riproduzione assistita eseguite sia in Italia che all'estero

Risultati attesi nel triennio

Valutazione degli impedimenti delle strutture italiane a garantire le scelte di salute riproduttiva più appropriate; valutazione dell'eventuale aumento dei rischi e delle complicanze nell'applicazione di tali tecniche in alcuni Paesi.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti saranno utili per avere un quadro completo del fenomeno delle coppie infertili che si rivolgono all'estero per eseguire tecniche di PMA, questo permetterà di creare nuovi studi che andranno ad indagare altri aspetti di questo complesso fenomeno.

Studio sull'uso nella pratica clinica degli Interferoni Peghilati per la terapia dell'epatite cronica C, in Italia

I dati di efficacia disponibili sulla terapia di combinazione con Interferone Peghilato e Ribavirina dell'epatite cronica C sono derivati, in massima parte, da ampi studi di registrazione. Questi studi hanno arruolato pazienti selezionati 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.

Obiettivo: 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.

Studio osservazionale retrospettivo-prospettico condotto su un campione randomizzato di centri di riferimento primario e terziario. Popolazione in studio: 7.000 pazienti consecutivi 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.

Risultati attesi nel triennio

- 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

La valutazione dell’efficacia di una terapia deve seguire tre passi: efficacia valutata attraverso *trial* clinici; efficacia sul campo; analisi costi/benefici. Perciò, una volta entrato in commercio un nuovo farmaco è necessario continuare a monitorarlo attraverso studi di post-marketing.

Lo studio consentirà di dare risposta agli ultimi due punti; per quanto riguarda il secondo punto la numerosità di 7.000 soggetti arruolati consentirà di dare una stima affidabile dell’efficacia. A proposito del rapporto costi/benefici, va precisato che gli interferoni peghilati attualmente in commercio in Italia sono due e hanno costi diversi: questo studio consentirà anche di confrontare l’efficacia relativa ed il rapporto costi/benefici dei due farmaci.

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 ed 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 practice* nel campo dell’epidemiologia applicata e di condividerle. Il sito ospiterà una piattaforma di *e-learning* che offrirà assistenza a distanza agli operatori regionali e aziendali che saranno coinvolti nel progetto. L’aggiornamento settimanale permetterà al sito di essere tempestivo nel fornire le informazioni e gli approfondimenti operativi strategici per gli operatori sanitari. Le principali linee sono sullo sviluppo dell’informazione su aree di prevenzione, basate su raccomandazioni e linee guida nazionali, provenienti dall’MS e dal CCM con i dati epidemiologici e descrizioni puntuali dei problemi di salute come emergenze e allarmi, malattie infettive o malattie croniche (obesità, diabete, malattie cardiovascolari, tumori). 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 6.000 accessi giornalieri, che incrementerà attraverso uno studio della distribuzione degli accessi e una promozione adeguata nei contesti del servizio sanitario delle Regioni che lo utilizzano meno. Il sito metterà a disposizione uno strumento per portare in tempi rapidi (come quelli dettati da una epidemia) l’informazione di prevenzione e cura dall’autorità sanitaria all’operatore e al cittadino, creerà una fonte online di *best practice* da cui prendere spunto per proporre azioni efficaci attraverso la raccolta e la documentazione delle strategie, delle campagne e delle azioni di prevenzione portate avanti in diversi contesti internazionali o italiani. 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, che accompagna il diritto dei cittadini ad usufruire dei servizi dell'SSN in tutto il territorio nazionali impone azioni di valutazione e di controllo degli esiti degli interventi per assicurare equità dei cittadini nell'accesso alle cure e nella loro efficacia.

Il SIVeAS (Sistema nazionale di VERifica e controllo sull'Assistenza Sanitaria) è un sistema realizzato presso il Ministero della Salute ai sensi dell'art. 1, c. 288, della L 23/12/2005 n. 266, al fine di verificare che i finanziamenti siano effettivamente tradotti in servizi per i cittadini, secondo criteri di efficienza ed appropriatezza.

Il programma "Sviluppo e produzione degli indicatori di esito per SIVeAS" ha quale obiettivo principale quello di promuovere *accountability* (essere responsabili e doverne rispondere) 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 per 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.
- Conduzione di quattro nuove sperimentazioni di integrazione di fonti di informazioni cliniche e amministrative riguardanti il diabete, il registro delle MCV, il sistema delle emergenze e i registri RENCAM;
- 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 compiere scelte più consapevoli nell'ambito delle cure fornite dal Sistema Sanitario Nazionale.

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.

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.

Telefoni cellulari e tumori cranici

Il progetto consiste nel contributo italiano allo studio internazionale INTERPHONE, coordinato dallo IARC e finalizzato a valutare la relazione tra uso del cellulare e incidenza di tumori cranici.

Allo studio hanno partecipato 13 Paesi (Australia, Canada, Danimarca, Finlandia, Francia, Germania, Israele, Italia, Giappone, Nuova Zelanda, Norvegia, Svezia e Regno Unito) che, nell'insieme, hanno reclutato 2.600 casi di glioma, 2.300 casi di meningioma, 1.100 casi di neurinomi del nervo acustico, 400 tumori della parotide e 7.600 soggetti di controllo. Si tratta dello studio più grande su questi tumori attualmente realizzato.

La raccolta dati è terminata nel giugno 2005. Nel triennio 2006-08, è stato creato il database unificato, è stato effettuato il controllo di qualità dei dati, sono state realizzate alcune analisi statiche e sono stati pubblicati alcuni risultati. Nel triennio 2009-11 continueranno le attività di analisi e di stesura di articoli scientifici.

Risultati attesi nel triennio

Nelle analisi dei risultati, è stata data priorità alla descrizione dei metodi (Cardis, *et al.* 2007) e alle analisi degli studi collaterali, per la loro rilevanza nell'interpretazione dei risultati delle analisi di rischio.

Nello studio Interphone, infatti, la valutazione dell'esposizione a radiofrequenze da telefoni mobili si basa sulle storie d'uso del cellulare riportate dai soggetti all'intervista. Per valutare l'entità e l'impatto atteso di errori di misura, le risposte all'intervista sono state confrontate con i dati di traffico registrati dagli operatori di rete su campioni di soggetti non partecipanti ad Interphone (Vrijheid, *et al.* 2006) e su campioni di casi e controlli inclusi nello studio (Vrijheid, *et al.* 2008).

È stata anche stimata la possibilità di distorsioni da partecipazione differenziale allo studio, utilizzando informazioni raccolte su un campione di casi e controlli che avevano rifiutato di partecipare (Vrijheid, *et al.* 2009).

Poiché l'esposizione alle radiofrequenze emesse dai cellulari è localizzata, un'eventuale rischio sarà probabilmente maggiore per i tumori situati nelle zone a più alto assorbimento di energia. Per valutare la distribuzione spaziale dell'assorbimento di energia a livello del cranio e dell'encefalo, è stato realizzato uno studio dosimetrico basato su misure effettuate su più di 100 cellulari in diversi Paesi (Cardis, *et al.* 2008).

Nel triennio 2009-11 sono previste analisi e pubblicazioni in riferimento ai seguenti temi:

- Determinanti della potenza emessa dai telefoni cellulari ed implicazioni per la valutazione dell'esposizione.
- Rischio di tumori cerebrali (gliomi e meningiomi) in relazione all'uso del cellulare e in relazione all'intensità stimata di esposizione a radiofrequenze da cellulari.
- Rischio di tumori cerebrali (gliomi e meningiomi) in relazione alle abitudini al fumo.
- Rischio di neurinomi del nervo acustico in relazione all'uso del cellulare e in relazione all'intensità stimata di esposizione a radiofrequenze da cellulari.
- Rischio di tumori maligni della parotide in relazione all'uso del cellulare e in relazione all'intensità stimata di esposizione a radiofrequenze da cellulari.

Un approccio epidemiologico ai disturbi dello spettro autistico;

UO 3: stima della ereditabilità

L'autismo è una sindrome comportamentale (DSA) causata da un grave e pervasivo disturbo dello sviluppo, con esordio nei primi tre anni di vita. Le aree prevalentemente interessate sono quelle relative all'interazione sociale reciproca, all'abilità di comunicare idee e sentimenti e alla capacità di stabilire relazioni con gli altri. Alcuni studi recenti hanno adottato un approccio

dimensionale allo studio dei tratti autistici, e hanno suggerito che i DSA rappresentino l'estremo superiore di una costellazione di tratti (endofenotipi) che hanno una distribuzione continua nella popolazione generale. Studi precedenti hanno mostrato una certa aggregazione familiare per alcuni degli endofenotipi, che tendono ad assumere valori elevati in parenti consanguinei di pazienti autistici. Scarse evidenze, invece, sono state prodotte sui possibili meccanismi all'origine di tale aggregazione familiare e su eventuali interazioni gene-ambiente, ovvero su fattori ambientali in grado di modificare la suscettibilità genetica individuale alle alterazioni comportamentali caratteristiche dello spettro autistico. Il progetto si propone di stimare la componente genetica e ambientale di endofenotipi dell'autismo e di identificare fattori ambientali in grado di modificare la suscettibilità genetica individuale utilizzando il metodo gemellare. Per il campionamento dei gemelli da includere nello studio verrà utilizzato il database del Registro Nazionale Gemelli (RNG). La rilevazione dei dati sugli endofenotipi dell'autismo sarà effettuata mediante questionari di auto-valutazione ampiamente validati (es. *Autism Spectrum Quotient*).

I parametri di interesse saranno stimati tramite modelli di equazioni strutturali appositamente sviluppati per l'analisi di dati su gemelli.

Risultati attesi nel triennio

- Verifica della aggregazione familiare per endofenotipi dell'autismo;
- quantificazione del peso relativo dei fattori genetici (ereditabilità) e ambientali nel determinare l'aggregazione familiare;
- stima dell'associazione a livello individuale tra endofenotipi afferenti a diverse aree di alterazione comportamentale (tale associazione è alla base della co-morbidità tra differenti disturbi del comportamento, che è necessaria per la diagnosi di autismo);
- stabilire se l'associazione individuale è il risultato di fattori genetici o ambientali comuni alle diverse aree (ovvero stimare la correlazione genetica e ambientale tra endofenotipi nelle diverse aree).

Stimando il carico di ereditabilità in sottogruppi caratterizzati da una diversa esposizione a specifici determinanti ambientali, potrebbe essere anche possibile saggiare eventuali interazioni di tipo gene-ambiente, ovvero identificare fattori ambientali in grado di amplificare o attenuare la suscettibilità genetica individuale.

I risultati del progetto verranno pubblicati su riviste internazionali e nazionali, e comunicati a congressi del settore, oltre che divulgati mediante workshop tematici e siti web. Infine verranno organizzati corsi e seminari informativi.

Trasferibilità dei risultati

Le conoscenze scaturite da questo studio potrebbero contribuire a chiarire i meccanismi che regolano il processo patogenetico, ad aprire la strada a successive indagini di tipo genico-molecolare, a delineare nuove strategie di screening e diagnosi precoce basate su precisi criteri per definire gruppi di popolazione a maggiore rischio di malattia, e a formulare strategie di prevenzione di esposizioni ambientali che risultino in grado di amplificare la suscettibilità genetica individuale.

La stima della componente genetica ed ambientale di endofenotipi dello spettro autistico fornirà informazioni utili ad individuare varianti geniche e a identificare eventuali fattori ambientali in grado di modificare la suscettibilità genetica individuale consentirebbe di delineare nuove strategie di screening e diagnosi precoce basate su precisi criteri per definire gruppi di popolazione a maggiore rischio di malattia, e di formulare strategie di prevenzione di esposizioni ambientali dannose.

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 (S. 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 monozigoti (MZ) e dizigoti (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 ed 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.

La linea guida costituirà un documento di riferimento, accessibile sia agli operatori dell'SSN coinvolti nel trattamento dei DSA sia in versione divulgativa ai cittadini interessati, che potrà contribuire al miglioramento della qualità dell'assistenza e dell'efficacia degli interventi.

I risultati dello studio epidemiologico genetico saranno utili per pianificare future indagini di genetica molecolare, delineare nuove strategie di screening e diagnosi precoce su gruppi a maggior rischio, e formulare strategie di prevenzione di esposizioni ambientali amplificanti la suscettibilità genetica.

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'Unione Europea 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 saranno invitati a partecipare.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto è diviso in cinque *workpackage* (WP), ognuno focalizzato su una diversa tematica.

All'Italia è affidato il coordinamento delle attività del progetto nonché i WP 1 (sviluppo della piattaforma web) e 5 (organizzazione di un archivio di documenti di buona pratica vaccinale).

La durata del progetto è di due anni, rinnovabile per altri due.

I risultati attesi per i primi due anni (2009-2010) sono:

- creare un 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;
- incoraggiare un approccio razionale ai processi decisionali riguardanti le politiche vaccinali, fornendo strumenti standardizzati;
- rendere disponibili *report* sui risultati del progetto, documenti sulle metodologie utilizzate nei vari Stati e altri studi in materia di vaccinazione.

Di seguito i risultati attesi per i primi dieci mesi del progetto (gennaio-ottobre 2009):

- sviluppo della piattaforma web;
- *survey* sulla vaccinazione per l'encefalite da zecche;
- *survey* sui processi decisionali per l'introduzione della vaccinazione HPV;
- *survey* sulla copertura per la vaccinazione antinfluenzale;
- archivio di documenti di buona pratica vaccinale.

Altri obiettivi potranno essere definiti e proposti dall'ECDC nel corso del 2009 e 2010.

Trasferibilità dei risultati

Lo sviluppo del sito web di VENICE II rappresenta il principale strumento di lavoro e scambio di informazioni del network di esperti. La piattaforma web permette la raccolta, condivisione e diffusione delle informazioni riguardanti le politiche vaccinali negli Stati membri. È divisa in un'area privata, che rappresenta l'area di lavoro per gli esperti, e un'area pubblica accessibile a chiunque, dove verranno pubblicati i risultati delle *survey* e altri documenti prodotti. La trasferibilità del progetto per la salute pubblica italiana è la disponibilità di informazioni sulle strategie vaccinali e i metodi usati da tutti i Paesi europei che forniranno utili informazioni per il miglioramento delle strategie vaccinali italiane ed europee.

Valutazione degli effetti delle radiazioni ionizzanti sulla spermatogenesi umana

Il progetto prevede la valutazione della spermatogenesi mediante l'esame del liquido seminale e la valutazione dell'integrità cromatinica mediante l'SCSA.

L'esame del liquido seminale prevede una valutazione macroscopica e microscopica. La valutazione macroscopica definisce le caratteristiche reologiche quali volume, pH, aspetto, fluidificazione e viscosità. Lo studio dell'integrità cromatinica è basato sull'utilizzo del fluorocromo metacromatico Arancio di Acridina (AO) che è in grado di dare differenti tipi di fluorescenza a seconda che si leghi a DNA nativo (verde) o denaturato (rosso). L'identificazione verrà effettuata mediante un citofluorimetro.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si propone di identificare, tramite lo studio di pazienti che si sottopongono a radioterapia antineoplastica, l'entità del danno indotto dalle radiazioni ionizzanti sul processo spermatogenetico sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo. Inoltre di valutare la capacità del testicolo di riparazione del danno. La numerosità del campione che ci proponiamo di studiare ci permetterà di ottenere una idonea robustezza dei dati ottenuti sia dal punto di vista citologico che molecolare.

Trasferibilità dei risultati

I dati derivanti dal nostro studio potranno consentire la messa a punto di programmi di prevenzione dell'infertilità maschile indotta dalle radiazioni ionizzanti sia in soggetti esposti professionalmente che in individui accidentalmente a contatto con fonti di radiazioni. Inoltre questi dati consentiranno di sensibilizzare i medici sulla necessità di informarsi in sede anamnestica della eventuale esposizione a fonti di radiazioni e di sensibilizzare l'opinione pubblica in relazione alla pericolosità dell'esposizione stessa per la capacità riproduttiva dell'individuo.

Valutazione degli esiti per promuovere il miglioramento dell'efficacia nell'erogazione delle prestazioni ricomprese nei LEA

La valutazione comparativa degli esiti tra strutture assume particolare rilievo in relazione alla potenziale eterogeneità dei servizi sanitari regionali, che accompagna il diritto dei cittadini ad usufruire dei servizi dell'SSN in tutto il territorio nazionale, nei limiti dei LEA.

Lo sviluppo di appropriati metodi di valutazione comparativa degli esiti è necessario per fornire informazioni importanti per il governo dell'SSN e dei singoli SSR, sia dal punto di vista della funzione di tutela/committenza che da quello della produzione.

L'articolazione, e la potenziale forte eterogeneità degli SSR, impone azioni di valutazione e di controllo degli esiti degli interventi per assicurare equità dei cittadini non solo nell'accesso alle cure ma soprattutto nella loro efficacia.

Lo studio "Valutazione degli esiti per promuovere il miglioramento dell'efficacia nell'erogazione delle prestazioni ricomprese nei LEA" ha i seguenti obiettivi specifici:

- Definizione degli strumenti per l'identificazione e selezione di indicatori di esito
- Definizione dei criteri per l'uso dei data-base amministrativi nella valutazione di esito
- Elaborazione di indicatori di esito
- Disegno di programmi di valutazioni di impatto della diffusione delle informazioni
- Elaborazione e diffusione di un Rapporto in 1.000 copie, tramite web e meeting *ad hoc*.

Risultati attesi nel triennio

È stato acquisito l'archivio integrato su base individuale anonima delle SDO nazionali 2001-04.

È stata condotta e pubblicata un'analisi ad interim dei dati disponibili degli studi IN-ACS Outcome, BYPASS, OSCAR, RISC.

È stato prodotto un documento con l'individuazione di un set di indicatori di esito tra quelli proposti nel rapporto finale del Progetto Mattoni.

In questo triennio si prevede di portare a compimento le seguenti attività:

- Produzione di indicatori di esito individuati tra quelli proposti dal rapporto finale del Progetto Mattoni, utilizzando gli archivi SDO 2001-04.
- Validazione delle metodologie di *risk adjustment* utilizzando i dati degli studi InACS-Outcome, BPAC2, RISC, OSCAR.
- Definizione di nuovi indicatori di esito basati su SI diversi da SDO, utilizzando basi di dati regionali disponibili.
- Proposta di modalità di presentazione dei risultati a diversi destinatari istituzionali e di popolazione.

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 ed 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 compiere scelte più consapevoli nell'ambito delle cure fornite dal Sistema Sanitario Nazionale.

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 cinque 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 lungosopravvissenti presso tutte le strutture oncologiche dell'SSN.

Valutazione di impatto di interventi rivolti ai cittadini e agli operatori sanitari per l'uso appropriato di farmaci: il caso della terapia ormonale sostitutiva (TOS) alla luce della recente Conferenza di Consenso

Alla luce della rilevanza del problema relativo alla scarsa e scadente qualità della informazione che le donne ricevono su menopausa e TOS, il presente progetto propone un intervento multimodale di disseminazione attiva delle raccomandazioni conclusive della Conferenza di Consenso su menopausa e TOS celebrata a Torino nel maggio 2008 e di valutazione di impatto delle stesse. Le principali attività del progetto sono:

- indagini su base campionaria su conoscenza, attitudine e comportamenti sulla menopausa e sulla TOS rivolte alle donne e agli operatori sanitari
- analisi dei contenuti della stampa medico-divulgativa e della stampa rivolta al pubblico successiva alla celebrazione della Conferenza di consenso
- messa a punto di materiale informativo e formativo *ad hoc* per la diffusione delle informazioni
- messa a punto e implementazione di attività formative *ad hoc* residenziali e online per l'aggiornamento degli operatori socio-sanitari dell'SSN coinvolti nelle attività di promozione della salute sulla menopausa e la TOS
- messa a punto di una offerta attiva delle raccomandazioni sulla informazione sulla TOS rivolta alle donne
- valutazione dell'impatto delle attività sulle prescrizioni.

Risultati attesi nel triennio

- Conoscenze, opinioni/atteggiamenti e comportamenti delle donne target partecipanti all'indagine dopo (post-test) la diffusione delle raccomandazioni della Conferenza di consenso nelle ASL di intervento rispetto alle ASL di controllo
- conoscenze, opinioni/atteggiamenti e comportamenti di alcune categorie di operatori sanitari (ginecologi, medici di famiglia, farmacisti ed ostetriche) dopo la diffusione delle raccomandazioni della Conferenza di consenso nelle ASL di intervento rispetto alle ASL di controllo
- analisi dei contenuti della stampa medico-divulgativa e della stampa rivolta al pubblico in generale a seguito della disseminazione delle raccomandazioni della Conferenza di consenso
- produzione di materiali informativi sulla menopausa e la TOS per gli operatori sanitari e per i cittadini
- addestramento del personale coinvolto nelle attività di promozione della salute sulla menopausa e la TOS
- confronto dati di consumo dei farmaci TOS: i) prima e dopo la diffusione delle raccomandazioni della Conferenza di consenso, ii) nelle ASL-intervento rispetto alle ASL-controllo.

Trasferibilità dei risultati

Il presente progetto fornirà un modello prototipale testato di strategia di disseminazione di informazione a livello territoriale che potrà essere di riferimento per future iniziative di sanità pubblica legate all'uso di farmaci e vaccini.

Valutazione di polimorfismi genetici correlati con la risposta alla stimolazione ovarica controllata

L'obiettivo del progetto è quello di individuare il miglior trattamento terapeutico nei cicli di stimolazione assistita, evitando sia l'*over treatment* che la cancellazione dei cicli per mancata

risposta. Il razionale del progetto è quello di effettuare uno studio retrospettivo in pazienti già afferenti a Centri di PMA sottoposti a protocolli di stimolazione ormonale mediante gonadotropine per induzione della crescita follicolare multipla.

Il campione di popolazione che si ipotizza di prendere in esame è di 1.000 persone.

Risultati attesi nel triennio

Il test genetico, basato sullo studio di varianti polimorfiche, permetterà di individuare pazienti con particolari caratteristiche di risposta ai protocolli di stimolazione. Successivamente le varianti polimorfiche saranno utilizzate per predire come una paziente risponderà alla terapia con gonadotropine, al fine di migliorare le indicazioni terapeutiche e la quantificazione delle unità da somministrare. Le informazioni ottenute dal test inoltre saranno utilizzate per informare le pazienti sulla propria possibile risposta nel corso del trattamento di fecondazione assistita e quindi saranno anche di supporto nel consenso informato, indispensabile per poter procedere al trattamento stesso.

Trasferibilità dei risultati

I benefici saranno riconducibili alla tutela della salute della donna e ad un risparmio nella spesa farmacologica, a carico dell'SSN grazie alle seguenti valutazioni in termini di:

- Riduzione di cicli cancellati per risposta inadeguata alla stimolazione ormonale;
- ridotta incidenza di reazioni avverse, quali la sindrome da iperstimolazione ovarica (OHSS);
- migliori esiti clinici;
- personalizzazione della terapia.

Valutazione di strumenti di prevenzione cardiovascolare attraverso il sito www.cuore.iss.it

Gli studi degli ultimi 30 anni hanno dimostrato che le malattie cardio-cerebrovascolari sono prevenibili e controllabili. Circa l'80% di esse può essere prevenuta intervenendo sugli stili di vita: fumo, alimentazione, attività fisica e alcol. I costi diretti e indiretti per il trattamento di queste patologie e delle loro complicazioni potrebbero essere notevolmente ridotti realizzando la prevenzione a livello individuale e di comunità. La prevenzione individuale mira a migliorare gli interventi che un operatore sanitario, primo fra tutti il medico di medicina generale (MMG), può effettuare con i propri assistiti. In quest'area, il Piano Nazionale di Prevenzione degli anni 2005-2007 ha avuto come obiettivo la diffusione della carta e del punteggio individuale per la stima del rischio cardiovascolare (Progetto CUORE-ISS). A seguito del piano nazionale di formazione e grazie alla diffusione gratuita agli operatori del manuale sull'uso e applicazione della carta del rischio, molti MMG hanno richiesto, attraverso il sito web www.cuore.iss.it, strumenti per l'educazione sanitaria dei propri assistiti sugli stili di vita.

Obiettivo dello studio è quello di implementare schede su alimentazione, attività fisica, fumo, consumo di sale e alcol, realizzare manifesti e brevi video da proiettare nelle sale di attesa degli ambulatori degli MMG facilmente scaricabili e stampabili dal sito web www.cuore.iss.it. La valutazione dell'impatto di tali strumenti verrà realizzata attraverso l'invio dei dati sui fattori e sul rischio cardiovascolare da parte degli MMG all'Osservatorio del Rischio Cardiovascolare; inoltre un indicatore dell'utilizzo verrà fornito dalle registrazioni degli MMG che richiedono tramite il sito le schede di educazione sanitaria, i manifesti e i video.

Risultati attesi nel triennio

Schede per l'educazione sanitaria degli assistiti su alimentazione, attività fisica, fumo, consumo di sale e alcool saranno scaricabili gratuitamente dal sito www.cuore.iss.it. L'Osservatorio del Rischio Cardiovascolare continuerà la raccolta dei dati in modo da divenire uno strumento solido di sorveglianza del rischio cardiovascolare e dei fattori di rischio, indicatore della frequenza delle azioni sugli stili di vita e dell'appropriatezza delle terapie

farmacologiche in prevenzione primaria, nonché un strumento valido per valutare l'efficacia della diffusione della carta del rischio e del punteggio individuale.

Trasferibilità dei risultati

I dati all'Osservatorio del Rischio Cardiovascolare forniranno al Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, 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 livelli dei fattori di rischio e del rischio cardiovascolare dei loro assistiti con i livelli regionali e nazionali. L'Osservatorio del Rischio Cardiovascolare assocerà ai risultati anche una reportistica sul controllo di qualità dei dati inviati dagli MMG. Saranno disponibili schede di educazione sanitaria da distribuire agli assistiti attraverso gli ambulatori della medicina generale, i distretti e le farmacie facilmente scaricabili dal sito.

Virus epatitici, micro-RNA e malattie linfoproliferative. UO del progetto "Identificazione di profili di rischio nella popolazione per lo sviluppo di interventi di prevenzione"

Nell'ambito del progetto "Identificazione di profili di rischio nella popolazione per lo sviluppo di interventi di prevenzione" il contributo dell'unità operativa "Virus epatitici, micro-RNA e malattie linfoproliferative" consiste in quattro distinte attività di studio:

- il ruolo delle infezioni occulte da HBV nell'insorgenza dei linfomi non-Hodgkin (NHL). Uno studio recente ha dimostrato un'associazione tra infezione "palese" da HBV e NHL. Lo scopo del presente studio è quello di valutare l'associazione complessiva tra infezione da HBV (oculta e palese) e NHL.
- Valutazione dell'effetto della terapia antivirale in soggetti HBV positivi affetti da leucemia linfatica cronica a cellule B e da altre malattie linfoproliferative.
- Analisi clinica dei pazienti con NHL e HCV positivi o negativi, con lo scopo di una maggior conoscenza del decorso clinico, degli effetti tossici della chemioterapia e della prognosi nei soggetti con linfomi aggressivi e concomitante infezione da HCV.
- Caratterizzazione del profilo di espressione dei micro-RNA nelle cellule mononucleate periferiche del sangue in soggetti con leucemia e linfoma e con infezione da HCV o HBV.

Lo studio si avvale della collaborazione di vari centri clinici di ematologia e del Reparto di Virologia del Dipartimento di MIPI dell'ISS.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi dallo studio comprendono: la definizione del ruolo patogenetico delle infezioni da HBV nell'insorgenza degli NHL; la definizione del beneficio della terapia antivirale nell'ambito della terapia generale per i linfomi e la malattie linfoproliferative; definizione del decorso e della prognosi delle malattie linfoproliferative associate ad infezioni da virus epatitici; identificazione di possibili associazioni tra specifici profili di espressione di miRNA e infezione da HBV o HCV.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questo studio possono avere importanti ricadute per la gestione dei protocolli diagnostici, prognostici e terapeutici dei pazienti affetti da disordini linfoproliferativi associati ad infezioni da virus epatitici. I profili di espressione dei miRNA sono promettenti per possibili applicazioni a scopo diagnostico e prognostico.

Centro Nazionale
Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute

Attività di controllo, valutazione, parere

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 study*), sono studi che hanno vantaggi sia degli studi di coorte sia degli 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. Ovviamente 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°C e a -80°C , in cui sono conservati campioni di siero, 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.

Attualmente nella banca sono conservati campioni appartenenti a circa 15.000 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.

I quattro 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 a bombole di CO_2 , che entrano automaticamente in funzione se c'è interruzione di corrente elettrica. 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.

Piano triennale

La banca verrà ampliata con l'acquisto di un nuovo contenitore di azoto liquido e di unità di freezer a -80°C . Dal punto di vista tecnico verranno mantenute le condizioni migliori per il buon funzionamento.

Verrà ampliata la banca di campioni biologici attraverso lo stoccaggio e conservazione dei campioni raccolti durante l'indagine dell'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare: per il 2009-2011 è previsto l'arruolamento di circa 10.000 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 -30°C verranno conservati tre campioni per ogni persona di urine la cui raccolta è avvenuta nelle 24 ore. Delle urine una parte verrà conservata, una parte verrà inviata al Centro di Ricerca Giovanni Paolo II e formazione ad Alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche dell'Università Cattolica di Campobasso e una parte verrà inviata all'Università Federico II di Napoli per la determinazione di sodio, potassio e creatinina urinaria.

Dei campioni biologici di sangue intero recentemente trasferiti dall'Università di Pavia appartenenti all'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare 1998-2002, in collaborazione con l'Università Cattolica di Campobasso, Laboratorio di Alte Tecnologie verrà estratto il DNA dal sangue intero nei campioni raccolti durante l'esame del 1998-2002, in modo da rendere disponibile il materiale genetico per studi di genetica delle malattie cardio-cerebrovascolari.

Dal punto di vista dell'archiviazione dei campioni biologici verrà valutata la sperimentazione tramite il software applicativo ATIM (*Advanced Tissue Management*) del *Canadian Tumor Repository network* (CTRNET). La banca fa parte del network *Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure* dell'Unione Europea (BBMRI).

Consulta Nazionale Alcol (Legge 125/2001)

L'articolo 4 della L 125/2001 ha istituito la Consulta nazionale sull'alcol e sui problemi alcol correlati definendone le funzioni e le prerogative. L'ISS è membro ufficiale della Consulta. Secondo quanto definito dall'art. 1, gli ambiti oggetto di pareri e di proposte da parte della Consulta sono quelli recanti indicazioni finalizzate alla prevenzione, la cura e il reinserimento sociale degli alcolicodipendenti. La Consulta collabora nella predisposizione della relazione che il Ministro della Salute trasmette al Parlamento esaminando, a tale fine, i dati relativi allo stato di attuazione della legge 125/2001 e quelli risultanti dal monitoraggio dei dati relativi all'abuso di alcol e ai problemi alcolcorrelati da realizzare secondo modalità che garantiscano l'elaborazione e la diffusione a livello regionale e nazionale. La Consulta formula proposte ai Ministri competenti, alle Regioni e alle Province autonome di Trento e di Bolzano per il perseguimento delle finalità e degli obiettivi definiti dalla legge 125/2001, collabora con enti e organizzazioni internazionali che si occupano di alcol e di problemi alcolcorrelati, con particolare riferimento alla WHO, secondo gli indirizzi definiti dal Ministro della Salute. La consulta, infine, fornisce ai Ministri competenti, alle Regioni e alle Province autonome di Trento e di Bolzano pareri in ogni altro ambito attinente all'alcol e ai problemi alcolcorrelati in riferimento alle finalità della presente legge.

Piano triennale

L'Osservatorio Nazionale Alcol e il Centro Collaboratore della WHO collaboreranno formalmente alle attività della Consulta Nazionale Alcol contribuendo alla formulazione dei pareri e delle proposte che la Consulta inoltra ai Ministri competenti ai sensi dell'art. 4 della L 125/2001; provvedono, inoltre, a fornire informazioni e dati utili alla redazione annuale della Relazione al Parlamento del Ministro della Salute (<http://www.epicentro.iss.it/temi/alcol/pdf/relazione06-07.pdf>) riguardo l'implementazione della 125/2001. Proseguiranno le attività di predisposizione dei contributi dell'Osservatorio alla Relazione al Parlamento (<http://www.iss.it/binary/pres/cont/RELAZIONE%20PARLAMENTO%20ALCOL%202008.1233588317.pdf>) in merito alla parte internazionale e alla sintesi delle attività della Consulta Nazionale Alcol. Nell'ambito della Consulta verranno garantite le attività di consulenza tecnico-scientifica al Ministero della Salute, alle Regioni, alle ASL anche attraverso la presentazione delle attività della Consulta nell'ambito dell'*Alcohol Prevention Day* (<http://www.epicentro.iss.it/temi/alcol/adp08.asp>).

L'Osservatorio Nazionale Alcol in collaborazione con la Società Italiana di Alcologia (SIA) continuerà verosimilmente a svolgere su mandato del Ministero e della Consulta Nazionale Alcol il ruolo di Segreteria Scientifica della Conferenze che seguiranno alla Prima Conferenza Nazionale Alcol svolta a Roma il 20 e 21 ottobre (<http://www.ministerosalute.it/dettaglio/phPrimoPianoNew.jsp?id=192>). Tutte le attività si interfaceranno con quelle promosse dalla Presidenza del Consiglio per la quale l'Osservatorio Nazionale Alcol CNESPS quale organismo esperto nella Consulta Nazionale Tossicodipendenze (DPR 309/90, art. 132) previa nomina formale del Sottosegretario di Stato e della Direzione del Dipartimento Antidroga attivo presso

la Presidenza del Consiglio. L'Osservatorio Nazionale Alcol è stato invitato a partecipare alla IV Conferenza Nazionale sulle Droghe programmata per marzo 2009 a Trieste.

Contributi tecnico-scientifici

Il REMI/CNESPS fornisce regolarmente contributi tecnico-scientifici nell'ambito della epidemiologia delle malattie infettive. In particolare:

- contributi per la preparazione e revisione di testi sulle malattie infettive per la redazione del sito web Epicentro (www.epicentro.iss.it);
- contributi alla stesura del piano sanitario nazionale, circolari, linee guida, piani strategici e campagne di comunicazione sulle malattie infettive per il Ministero della Salute;
- contributi alla stesura e revisione di linee guida, documenti strategici e rapporti sulle malattie infettive per il Centro Europeo per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie (ECDC) e per agenzie delle Nazioni Unite;
- contributi su argomenti inerenti la prevenzione e il controllo delle malattie infettive per le Regioni e le Autorità sanitarie locali;
- contributi per la revisione e valutazione di articoli e progetti in ambito nazionale e internazionale.

Piano triennale

Il REMI/CNESPS prevede di proseguire tale attività nel prossimo triennio.

Controllo di stato riguardo alla potenza di vaccini batterici e virali

Su richiesta del CRIVIB dell'ISS partecipa al controllo di stato del vaccino antipolio orale per quanto attiene alla valutazione statistica pertinente al saggio di neurovirulenza da partite madri e relative referenze di vaccini antipolio orale.

Piano triennale

Per il periodo 2009-2011 si continuerà a collaborare con il CRIVIB per la valutazione statistica pertinente al saggio di neurovirulenza sulle partite madri di vaccino antipolio orale. Mediamente in un anno vengono eseguiti circa dieci controlli.

Formazione di operatori di sanità pubblica

Il CNESPS esercita attività di formazione, perfezionamento e aggiornamento sulla salute pubblica e l'organizzazione sanitaria, rivolte al personale dell'SSN e agli organi ed enti di promozione e tutela della salute con l'intento di fornire le basi scientifiche e le indicazioni per la realizzazione degli obiettivi del Piano Sanitario Nazionale; diffondere i risultati di *trial* preventivi; formare gli operatori dei Dipartimenti di Epidemiologia e Prevenzione al fine di implementare azioni di prevenzione nella popolazione.

Il CNESPS conduce un'attività di formazione articolata su temi dell'epidemiologia di base e avanzata (indagini epidemiologiche, comunicazione, programmazione di interventi, linee guida ed *Evidence Based Prevention*, uso di software) e temi specialistici di epidemiologia.

Il Centro realizza inoltre un Master di secondo livello in Epidemiologia Applicata (PROFEA), in collaborazione con l'Università di Roma Tor Vergata, della durata di due anni, per complessivi 13 corsi frontali e nove attività di tirocinio pratico fra cui la realizzazione di un'indagine multicentrica (inter-regionale) o nazionale. I corsi come il Master 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 (nel 2005 sono state effettuate in totale circa 500 ore di lezioni esterne dal personale del CNESPS) 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.

Piano triennale

Negli ultimi anni, le Regioni hanno acquisito ed 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 quindi 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.

In particolare, ai professionisti di salute sono richieste competenze nella raccolta, elaborazione e interpretazione di dati di sorveglianza e di indagini rapide *ad hoc*, nella realizzazione di indagini in caso di epidemia, e nella programmazione per obiettivi adottando interventi di efficacia nota e valutandone i risultati e l'impatto. Queste competenze, che costituiscono l'obiettivo della formazione nel campo dell'epidemiologia applicata del CNESPS che negli ultimi anni realizza in media 40 formazioni residenziali per anno e alcune altre decine su progetti, in particolare il PROFEA (master universitario in Epidemiologia Applicata), la formazione su PASSI, sul progetto IGEA, sul progetto CUORE e su iniziative di ricerca nazionale come OKkio alla Salute, PASSI e PASSI d'argento. All'interno di questi progetti sono in formazione e verranno formati, direttamente o a cascata, migliaia di operatori. È anche da considerare la formazione che verrà sollecitata al CNESPS sul prossimo Piano di Prevenzione Nazionale, che permetterà al CNESPS di dare una risposta precisa ai bisogni di formazione delle Regioni. 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.

I risultati attesi sono che le Regioni, i DP e gli OER:

- avranno a disposizione un *pool* di persone in grado di identificare le priorità di salute, strutturare e valutare interventi adeguati e comunicare con l'utenza e i decisori
- avranno maggiori capacità di identificare problemi emergenti attraverso lo sviluppo o il miglioramento di sistemi di sorveglianza
- baseranno scelte programmatiche su dati e elementi epidemiologicamente validi basati sulle prove di efficacia
- realizzeranno delle ricerche locali o in network (multiregionali) finalizzate al miglioramento del sistema sanitario locale e alla formulazione di raccomandazioni e linee guida.

Inoltre verrà a crearsi una rete di epidemiologi regionali e professionisti della salute in grado di intervenire, in maniera coordinata e con metodologia unitaria, per lo studio e per l'intervento su problemi emergenti o urgenti di salute pubblica.

Health Examination Survey (HES)

L'obiettivo dell'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare (OEC) è stato quello di descrivere 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, e altre condizioni 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 cardiovascolari su campioni statistici, rappresentativi della popolazione generale di età 35-79 anni. Questa indagine è stata in questi anni il punto di riferimento italiano per le malattie cardiovascolari e per altre patologie cronico-degenerative, grazie all'adozione di metodologie e procedure standard nelle misurazioni e nella raccolta dei dati.

Recentemente si è sentita l'esigenza di allargare l'interesse verso altri determinanti e indicatori di patologia cronico-degenerativa e alla possibilità di realizzare una *Health Examination Survey* (HES), partecipando con i dati italiani all'indagine europea, e contribuendo allo sviluppo di un sistema di sorveglianza europeo (FEHES, *Feasibility of a European HES*). Le HES si basano su campioni di popolazione generale estratti in modo casuale, 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.

Con questo obiettivo, alle determinazioni sui fattori di rischio cardiovascolari (misurazione della pressione arteriosa, assetto lipidico, indice di massa corporea) sono stati aggiunti una serie di esami quali la spirometria per valutare la capacità vitale, la VEMS e l'indice di Tiffeneau, la densitometria ossea per valutare la capacità del calcio di legarsi alle ossa, quali indice di Stiffness, z test e t test, 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. Tutte queste determinazioni seguono un protocollo internazionale, devono essere realizzate con procedure e metodologie standardizzate e sono soggette a controllo di qualità.

Piano triennale

Nel 2008 si è svolta la fase pilota con l'arruolamento di 220 persone di età 35-79 anni nella Regione Friuli Venezia Giulia e nella Regione Molise e sono state valutate le procedure e le metodologie per la realizzazione dello screening. Verranno arruolati campioni rappresentativi in ogni Regione, che saranno esaminati nel corso del 2009-2011, sui quali verranno misurati alcuni indicatori dello stato di salute (pressione arteriosa, assetto lipidico, indice di massa corporea, capacità vitale, VEMS, indice di Tiffeneau, frequenza cardiaca, indice di Stiffness, z test, t test) e valutate le condizioni a rischio (dislipidemia, ipertensione arteriosa, diabete, insufficienza renale, obesità e sovrappeso) la frequenza delle malattie, i relativi trattamenti e la frequenza di stili di vita con corretti attraverso questionari specifici su attività fisica, abitudini alimentari e abitudine al fumo, eccessivo consumo di sale e di alcol. Gli esami ematochimici verranno effettuati nel Centro Giovanni Paolo II di Ricerca e Formazione ad Alta Tecnologia nelle

Scienze Biomediche dell'Università Cattolica di Campobasso e in parte verranno conservati nella banca di campioni biologici del CNESPS.

Al termine dell'esame sarà possibile avere un quadro obiettivo della distribuzione e frequenza delle condizioni a rischio nella popolazione adulta italiana. I dati grezzi, non appena raccolti saranno disponibili per Regione; al completamento delle Regioni che costituiscono la macroarea, saranno standardizzati (in modo da permettere il confronto) e disponibili per macroaree e infine al termine dello screening saranno disponibili standardizzati per l'Italia nel suo complesso. Saranno utilizzati per valutare lo stato di salute della popolazione italiana e integrati con quelli derivati dallo studio PASSI (Progressi delle Aziende Sanitarie per la Salute in Italia) sulla percezione dello stato di salute.

Con questo studio si contribuirà alla *Joint Action* per 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 REMI/CNESPS svolge regolarmente indagini di campo di eventi epidemici, recenti esempi in tal senso sono stati le indagini su casi di morbillo, meningiti batteriche, legionellosi, tossinfezioni alimentari, Chikungunya e TBC.

Piano triennale

Il REMI/CNESPS prevede di proseguire l'attività di 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 europei e internazionali.

Osservatorio del Rischio Cardiovascolare

I recenti progressi in salute pubblica hanno aiutato le persone di molte parti del mondo a vivere più a lungo e in salute. Gli studi degli ultimi anni hanno inequivocabilmente dimostrato che queste malattie sono prevenibili e controllabili. Circa l'80% di esse può essere prevenuta intervenendo sugli stili di vita: fumo, alimentazione scorretta, inattività fisica e abuso di alcol. I costi diretti e indiretti per il trattamento di queste patologie e delle loro complicazioni potrebbero essere notevolmente ridotti. L'obiettivo della prevenzione è pertanto quello di ridurre la frequenza delle malattie cardiovascolari, ritardarne l'epoca di comparsa, ridurre la gravità e le conseguenze invalidanti, a rimuovere i fattori di rischio (inizianti, promuoventi o scatenanti) tanto a livello individuale quanto di comunità.

La prevenzione individuale mira a migliorare l'insieme degli interventi che un operatore sanitario, primo fra tutti il medico di medicina generale (MMG), può effettuare nell'ambito del rapporto con i propri assistiti. In quest'area, il piano operativo del Piano Nazionale di Prevenzione negli anni 2005-2007 ha avuto come obiettivo la diffusione della carta del rischio cardiovascolare e del punteggio individuale, strumenti per la stima del rischio cardiovascolare globale assoluto (Progetto CUORE – ISS). È questa una tecnologia medica che consente di misurare nella popolazione sana di età compresa tra i 35 e i 69 anni la probabilità di andare incontro nei successivi dieci anni ad un evento cardio-cerebrovascolare maggiore (infarto del miocardio o ictus cerebrale), conoscendo il livello di alcuni fattori di rischio (età, sesso, pressione arteriosa sistolica e terapia antipertensiva, colesterolemia totale e HDL, abitudine al

fumo di sigaretta, presenza di diabete). La valutazione del rischio tramite questi strumenti permette di identificare soggetti a basso rischio, a rischio moderato da tenere sotto controllo con un adeguato stile di vita e persone ad elevato rischio e attivare azioni finalizzate alla riduzione dei fattori di rischio modificabili e di monitoraggio del rischio nel tempo.

L'introduzione di questa misura è tesa a migliorare l'accuratezza diagnostica, nelle persone che non hanno una malattia cardiovascolare clinicamente manifesta, ma possono essere affette da condizioni quali ipertensione, ipercolesterolemia, abitudine al fumo, obesità che aumentano il rischio cardiovascolare. Per questo è necessario sensibilizzare i medici, in primo luogo gli MMG riguardo l'importanza della prevenzione cardiovascolare, formarli e aggiornarli riguardo alla stima del rischio globale assoluto ed al trattamento, farmacologico e non farmacologico, dei fattori di rischio.

Il Ministero della Salute in collaborazione con l'ISS e l'AIFA ha lanciato (tuttora in corso in diverse Regioni) il piano di formazione nazionale degli MMG sull'uso e applicazione del punteggio individuale e della carta per la valutazione del rischio cardio-cerebrovascolare. Per il percorso formativo sono stati realizzati due manuali (uno per formatori e uno per partecipanti), pubblicati e distribuiti in due edizioni successive. Il percorso formativo prevede anche la raccolta di dati nella pratica clinica 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, punteggio individuale.

Piano triennale

Verrà implementato l'invio dei dati all'Osservatorio del Rischio Cardiovascolare, 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 il rischio cardiovascolare dei loro assistiti con le medie regionali e nazionali. L'Osservatorio del Rischio Cardiovascolare assocerà ai risultati anche una reportistica sul controllo di qualità dei dati inviati dagli MMG.

Dati incoraggianti sulla variazione dei fattori di rischio sono stati riportati per quei medici che, dopo aver aderito al programma di formazione, hanno volontariamente accettato di inviare i dati sui loro assistiti (nel rispetto della legge sulla *privacy*) raccolti durante il programma nazionale di formazione all'Osservatorio del Rischio Cardiovascolare (<http://cuore-iss.cineca.it/>).

A dicembre 2008, erano state effettuate e inviate all'Osservatorio del Rischio Cardiovascolare da parte di 729 MMG 76.901 valutazioni sul rischio cardiovascolare globale assoluto, che avevano dati completi sui fattori di rischio utilizzati per la valutazione (32.932 uomini e 39.122 donne).

Il programma di formazione nazionale pertanto proseguirà nelle Regioni che ne faranno richiesta, come pure nelle associazioni della medicina generale. Verrà inserito il programma per la valutazione del rischio nel software della medicina generale in modo che diventi uno strumento routinario da applicare nella pratica clinica e nella medicina di opportunità.

Vista la dimostrazione della sua fattibilità, come già adottato in alcune Regioni, l'Osservatorio del Rischio Cardiovascolare continuerà la raccolta dei dati in modo da divenire uno strumento solido di sorveglianza del rischio cardiovascolare, dei fattori di rischio, indicatore della frequenza delle azioni sugli stili di vita, della appropriatezza delle terapie

farmacologiche in prevenzione primaria, nonché un buono strumento per valutare l'efficacia della diffusione della carta del rischio e del punteggio individuale.

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, ogni dieci anni 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, e altre condizioni 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.

Questa indagine è stata in questi anni il punto di riferimento italiano per le malattie cardiovascolari e per altre patologie cronico-degenerative, grazie all'adozione di metodologie e procedure standard nelle misurazioni e nella raccolta dei dati. I dati del 1998-2002 sono pubblicati e disponibili nel sito web del progetto CUORE per le singole regioni, per macro-aree e per l'Italia nel suo complesso (www.cuore.iss.it).

La numerosità richiesta per la realizzazione degli obiettivi previsti è quella di arruolare un nuovo campione di 10.000 individui di età compresa fra 35 e 79 anni. 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, ogni Regione deve avere almeno un campione, anche se la popolazione è di numerosità inferiore); ciò permette di ottenere una numerosità sufficiente per valutare l'andamento nel tempo e identificare eventuali cambiamenti nella distribuzione dei fattori di rischio, delle condizioni a rischio.

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, 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.

Il progetto è stato approvato dal Comitato Etico dell'ISS in data 11 marzo 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.

Piano triennale

Per valutare le attività rivolte a contrastare le malattie cardiovascolari è necessario periodicamente condurre delle indagini di popolazione e valutare i livelli medi dei fattori di rischio cardiovascolare, la prevalenza di condizioni a rischio e gli indicatori di trattamento.

Nel 2008 si è svolta la fase pilota con l'arruolamento di 220 persone di età 35-79 anni nella Regione Friuli Venezia Giulia e nella Regione Molise e sono state valutate le procedure e le metodologie per la realizzazione dello screening. Verranno arruolati campioni rappresentativi in

ogni Regione, esaminati nel corso del 2009-2011, 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 nel Centro Giovanni Paolo II di Ricerca e Formazione ad Alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche dell'Università Cattolica di Campobasso.

Al termine dell'esame sarà possibile avere un quadro obiettivo della distribuzione e frequenza delle condizioni a rischio 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. I dati grezzi, non appena raccolti saranno disponibili per Regione; al completamento delle Regioni che costituiscono la macroarea, saranno standardizzati (in modo da permettere il confronto) e disponibili per macroaree e infine al termine dello screening saranno disponibili standardizzati per l'Italia nel suo complesso.

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, ad esempio i benefici derivati dall'introduzione della legge di abolizione del fumo nei locali pubblici, se questa è accompagnata da un aumento di obesità o se la riduzione della quantità di sale nel pane è accompagnata ad una riduzione della prevalenza degli ipertesi. Gli stessi dati potranno essere utilizzati per implementare azioni specifiche in differenti regioni o per programmare interventi di prevenzione secondaria, per migliorare i servizi e porre maggiore attenzione verso i trattamenti.

La raccolta di campioni biologici permetterà in futuro di programmare studi di coorte seguendo un follow-up adeguato di questa popolazione non pianificati all'inizio dello studio attraverso la realizzazione di *nested case-control study*.

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 (IC) dei vaccini sono state uniformate per tutta l'EU, e la normativa attuale prevede che i nuovi prodotti siano autorizzati con procedura centralizzata. Presso l'Agenzia Europea EMEA 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'EMEA 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 IC (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 (ad es. Hbvaxpro, Varilrix, Rabipur, Gardasil, Cervarix) mentre su

mandato dell'AIFA sono state svolte valutazioni di prodotti autorizzati in cui l'Italia è *peer review* (ad es. Synflorix, Pandemrix e Prepandemrix).

Piano triennale

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 2009-2011, limitatamente alle risorse umane disponibili. Per le procedure di IC, 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. Verrà sostenuta la formazione di nuovi *assessor* sia nazionali che internazionali con la collaborazione dell'Università di Tor Vergata.

Segretariato del *Working Party* del *Public Health Programme* dedicato agli *Health Indicator* e valutazione di implementabilità nei 25 Stati della Unione Europea a partire dall'anno 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. In stretta collaborazione e attivo coordinamento con ISTAT, Ministero della Salute, Eurostat, WHO, OCSE e Commissione Europea i contributi forniti da tali 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 Institute* attua la valutazione di implementabilità nei 25 Stati dell'Unione Europea a partire dall'anno 2005 (tutti i dettagli operativi sono pubblicati sul sito http://europa.eu.int/comm/health/ph_projects/2004/action1/action1_2004_02_en.htm) e www.healthindicators.org.

Piano triennale

Proseguiranno per l'intero triennio le attività del nuovo Progetto "ECHIM II" *European Community Health Indicators and Monitoring – Public Health Programme* che provvederà all'implementazione delle attività ECHIM delineate dal meeting europeo ECHIM ospitato presso il CNESPS (<http://www.echim.org/docs/ECHIM4/echim4min.pdf>) e dal contributo metodologico all'attuazione della *survey* europea prodotta dal Reparto Salute della popolazione (<http://www.echim.org/docs/ECHIM4/pres3.pdf>). Verrà applicata agli Stati membri la metodologia già preventivamente attuata in una *survey* europea con le controparti governative di 32 Stati membri (http://www.echim.org/docs/echim_contact.pdf) attraverso un questionario e incontri bilaterali svolti in Lussemburgo (<http://www.echim.org/docs/WP5/pres4.pdf>) per la validazione e applicazione nel periodo 2009-2010. Attraverso la costituzione di un gruppo di lavoro coordinato dal Reparto Salute della popolazione attraverso una modalità già sperimentata nel corso del Progetto SINDIS e l'attivo coinvolgimento di ISTAT, Ministero della Salute, CCM, Università, Agenzia per i Servizi Sanitari Regionali i dati nazionali prodotti nei singoli Stati membri confluiranno sul Portale europeo *Knowledge and Information System* secondo modalità concordate di *reporting* periodico dello stato di salute della popolazione che consentano, a regime, la piena comparabilità delle informazioni) come previsto dal *report* finale dell'intero progetto pubblicato nel corso del 2008 secondo le modalità e le tematiche concordate (http://www.echim.org/docs/echim_finalreport_contents.pdf).

Il gruppo di ricerca ECHIM attivo presso il Reparto Salute della popolazione del CNESPS continuerà a garantire un ruolo di coordinamento nell'ambito di un Network europeo di cinque *public Health Institute* (dettagli sul sito http://europa.eu.int/comm/health/ph_projects/2004/action1/action1_2004_02_en.htm) assicurando alla Commissione Europea la verifica e l'applicabilità del sistema di monitoraggio ECHIM negli Stati del Sud-Europa. Le ricadute per l'ISS sono prevedibili in un ulteriore consolidamento della *leadership* europea nel settore del

monitoraggio della salute per indicatori e del ruolo centrale dell'ISS, su mandato della Commissione Europea, nell'*assessment* e nella valutazione di implementabilità del sistema e degli indicatori per tutti e 25 gli Stati membri e nel ruolo di primo piano nella definizione delle finalità, delle funzioni e delle procedure relative all'*Health Monitoring*, ispirata al CDC ma dedicato agli aspetti di più ampio respiro di salute pubblica. A tale riguardo goveranno anche le attività nazionali già programmate.

- Progetto SIVEAS, “Validazione e comparazione Italia/EU degli indicatori LEA-SIVeAS”, anni 2008-2011.
- Progetto SIVEAS, “Strumenti flessibili per determinare le priorità sanitarie”, anni 2008-2011. Costruzione di uno strumento flessibile basato su web, basato su un database di patologie e fattori di rischio, per ciascuno dei quali si ricavano una serie di quantità epidemiologica, che vengono usate per calcolare le priorità.
- Progetto CCM Centro Controllo Malattie “Raccolta e analisi centralizzata di flussi informativi e dati per il monitoraggio dell'impatto dell'uso e abuso di alcol sulla salute in Italia, in supporto alla implementazione delle attività del Piano Nazionale Alcol e Salute”. Anno 2009.

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 sull'attuazione della Legge contenente norme per la tutela sociale della maternità e per l'IVG (L. 194/78) che viene presentata annualmente al Parlamento. Ritorno dell'informazione alle Regioni, anche attraverso incontri annuali.

Piano triennale

L'attuale evoluzione dell'andamento dell'IVG, 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 EWGLI-NET

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.

Piano triennale

Il centro di riferimento per la sorveglianza epidemiologica, attualmente presso il RMI/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. In particolare verrà analizzato l'andamento della legionellosi associata ai viaggi, per verificare l'impatto delle misure di prevenzione e controllo raccomandate dalle linee guida italiane, emanate nel febbraio 2005, e rivolte ai gestori di strutture recettive.

Annualmente verrà pubblicato sul Notiziario dell'ISS un rapporto sull'andamento della malattia in Italia e verranno inviati allo EWGLI i dati in forma aggregata per l'analisi dei *trend* a livello europeo.

Sistema nazionale di sorveglianza della rosolia in gravidanza e rosolia congenita

Il Piano Nazionale di Eliminazione del Morbillo e della Rosolia Congenita si prefigge di ridurre e mantenere l'incidenza della rosolia congenita a valori inferiori a 1 caso ogni 100.000 nati vivi. Per valutare l'impatto delle strategie vaccinali contro la rosolia congenita è indispensabile un sistema di sorveglianza specifico per la rosolia congenita e per l'infezione da virus della rosolia in gravidanza.

La rosolia congenita è stata soggetta a notifica obbligatoria dal 1987 al 1991, perciò dal 1992 non sono disponibili dati nazionali di incidenza; la rosolia in gravidanza, invece, non è mai stata soggetta a notifica.

Per ottenere dati di incidenza, il Decreto del Ministero della Salute 14 ottobre 2004 (GU n. 259 del 04/11/2004) ha quindi introdotto a livello nazionale dal gennaio 2005 la sorveglianza della sindrome/infezione da rosolia congenita e della rosolia in gravidanza, come previsto dal Piano Nazionale di eliminazione del morbillo e della rosolia congenita. Il nuovo decreto include, quindi, rosolia congenita e rosolia in gravidanza tra le malattie infettive comprese nella classe III del vigente DM 15/12/1990, che richiedono sorveglianze speciali, come anche da Circolare Ministeriale esplicativa del 05/08/2005 "Notifica obbligatoria della infezione da rosolia in gravidanza e della sindrome/infezione da rosolia congenita".

Per la notifica dei casi di sindrome/infezione da rosolia congenita o di infezione da rosolia in gravidanza 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. La segnalazione del caso da parte del medico deve essere inviata 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 (REMI/CNESPS); invia inoltre riepiloghi mensili per provincia sesso ed età a Ministero della Salute, ISS e ISTAT.

Il REMI/CNESPS ha quindi 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.

Piano triennale

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).

I dati verranno disseminati periodicamente attraverso il Notiziario dell'ISS 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 dicembre 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 è stata allargata la sorveglianza anche a tutte le altre forme di malattie batteriche invasive (ad esempio sepsi) da *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumonite*, *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 (REMI/CNESPS), la scheda di segnalazione per i casi confermati di meningite batterica. Nel caso di malattie batteriche invasive da *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumonite*, *Haemophilus influenzae* è richiesto anche l'invio del ceppo batterico isolato al MIPI.

Piano triennale

Poiché sono stati introdotti negli ultimi anni i vaccini contro lo pneumococco e il meningococco C, questo sistema fornirà informazioni sulla distribuzione dei casi e, in collaborazione con il Dipartimento di MIPI, anche informazioni sulla tipizzazione dei patogeni responsabili di questi quadri clinici. 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 malattia. La sorveglianza sarà rinforzata con la sostituzione del flusso cartaceo con quello elettronico gestito presso il CNESPS. È previsto in collaborazione con il Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali una modifica del protocollo di sorveglianza per potere trasmettere i dati a Centro Europeo per il Controllo delle Malattie Infettive (ECDC).

Sistema nazionale di sorveglianza sentinella della sindrome influenzale (INFLUNET) e rete europea EISS

L'influenza viene segnalata al Sistema di Notifica delle malattie infettive solo nel caso in cui sia stato effettuato l'isolamento del virus influenzale. Tuttavia, il ricorso alla diagnosi di laboratorio in Italia è poco diffuso, determinando così la difficoltà a descrivere l'epidemiologia dell'influenza basandosi sui dati del sistema routinario di notifica.

In Italia, nella stagione 1999-2000, è stato realizzato per la prima volta un sistema sperimentale di sorveglianza sentinella dell'influenza esteso a tutto il territorio nazionale con l'obiettivo di fornire stime quantitative di incidenza della malattia.

In seguito all'accordo sancito dalla Conferenza Stato-Regioni il 28 settembre 2000 (atti n. 1031), la sorveglianza epidemiologica e virologica dell'influenza viene svolta attraverso la collaborazione delle Regioni, dell'ISS e del Centro Interuniversitario per la Ricerca sull'Influenza (CIRI), degli MMG e dei Pediatri di libera scelta, dei Laboratori universitari di riferimento e viene coordinata dal Ministero della Salute.

Il sistema di sorveglianza sentinella è basato sulla rilevazione del numero di casi di sindrome influenzale da parte di una rete di MMG e pediatri di libera scelta che settimanalmente segnalano il numero aggregato di pazienti con "sindrome influenzale" divisi per fascia di età. Tale dato viene trasmesso al Centro di Coordinamento nazionale, istituito presso il REMI/CNESPS dell'ISS, tramite la compilazione di una scheda online.

Piano triennale

Le attività previste per i prossimi anni riguardano la stima dell'incidenza delle sindromi influenzali nella popolazione, la valutazione di eventuali gradienti geografici di diffusione, da utilizzare in modelli per la previsione di un'eventuale pandemia e la costruzione di una base di dati al fine di valutare l'impatto delle epidemie stagionali di influenza e di identificare gli elementi di preparazione ad una pandemia.

La sorveglianza prevede per ogni anno l'attività di reclutamento dei medici sentinella, l'analisi dei dati per la stima dell'incidenza delle sindromi influenzali e la diffusione dei risultati. Infatti, il numero di medici partecipanti al sistema su base volontaria, necessario per stimare l'incidenza dell'influenza, deve essere complessivamente pari all'1,5% della popolazione nazionale.

Viene quindi realizzato un rapporto settimanale con i risultati della sorveglianza sia a livello nazionale che regionale e un rapporto annuale finale con i risultati della sorveglianza dell'intera stagione influenzale. Tale sistema nazionale è infine collegato alla rete europea EISS.

Sistema nazionale di Sorveglianza Speciale del morbillo

Il morbillo è malattia soggetta a notifica obbligatoria in classe II. Tuttavia, più si progredisce verso l'eliminazione, migliori devono essere la sensibilità e la specificità del sistema di sorveglianza. Per questo, ad aprile 2007 è stato istituito un sistema di Sorveglianza speciale per migliorare il sistema di sorveglianza soprattutto in termini di tempestività, completezza (inclusi i risultati delle indagini di laboratorio) ed esaustività delle notifiche (Circolare ministeriale del 20 aprile 2007 "Piano Nazionale di Eliminazione del Morbillo e della Rosolia Congenita. Istituzione di un Sistema di sorveglianza speciale per morbillo").

Il sistema di sorveglianza speciale del morbillo prevede che tutti i casi sospetti di morbillo (presenza di febbre e *rash*) vengano tempestivamente segnalati e indagati con appropriate indagini di laboratorio. In particolare, con tale sistema è stato stabilito che:

- le aziende sanitarie locali (ASL) indagano tutti i casi sospetti con appropriate indagini di laboratorio (accertamenti sierologici su tutti i casi segnalati per confermare la diagnosi e ricerca virale (isolamento, PCR) su campioni di urine per casi sporadici o per i primi 5-10 casi di un eventuale focolaio epidemico. I campioni di urine vanno prelevati entro sette giorni dalla comparsa dell'esantema, e inviati al laboratorio di riferimento nazionale dell'ISS, il quale comunica i dati sulla tipizzazione alla WHO;
- venga utilizzato un modulo standard per l'indagine epidemiologica e la segnalazione dei casi. Questo modulo individuale va utilizzato anche in caso di focolai epidemici, in modo da raccogliere informazioni dettagliate su ogni singolo caso;

- venga osservato il seguente flusso informativo:
 - il medico segnala entro 12 ore ogni caso sospetto di morbillo alla ASL, per telefono, fax o posta elettronica;
 - la ASL svolge tempestivamente l'indagine epidemiologica del caso, attraverso la raccolta delle informazioni contenute nel modulo standard per l'indagine epidemiologica, la ricerca attiva dei contatti suscettibili, la profilassi post-esposizione, la raccolta dei campioni per la conferma di laboratorio e l'invio dei campioni di urine al laboratorio di riferimento nazionale (presso l'ISS);
 - la ASL trasmette immediatamente il modulo standard alla Regione;
 - la Regione invia immediatamente il modulo al Ministero della Salute e l'ISS (Epidemiologia malattie infettive, CNESPS), per posta elettronica o per fax.

Il Ministero della Salute provvede alla trasmissione dei dati all'ISTAT, all'ECDC e alla WHO.

Piano triennale

I dati rilevati dal sistema speciale di sorveglianza vengono inseriti in un database dedicato presso il REMI/CNESPS dell'ISS e regolarmente elaborati. Questo sistema continuerà, quindi, a fornire informazioni sulla frequenza e distribuzione (geografica, per età) dei casi di morbillo oltre che altre informazioni epidemiologiche quali lo stato vaccinale e le complicanze dei casi. Inoltre, in collaborazione con il Laboratorio di riferimento nazionale presso l'ISS fornirà anche informazioni sulla tipizzazione del virus.

Queste informazioni sono essenziali per verificare l'efficacia degli interventi preventivi implementati e del livello di controllo del morbillo raggiunto anche in vista dell'obiettivo di eliminazione dell'infezione nella regione europea della WHO entro il 2010.

Sorveglianza delle malattie cardiovascolari

Nonostante la frequenza delle malattie cardiovascolari, non esiste nel nostro Paese un sistema nazionale di sorveglianza delle malattie cardio-cerebrovascolari arteriosclerotiche e di valutazione del loro impatto sociale. Il Sistema di sorveglianza delle malattie cardio-cerebrovascolari ha l'obiettivo di stimare indicatori di frequenza di malattia, quali occorrenza (primi eventi e recidive), prevalenza, incidenza (nuovi eventi), letalità e di valutare la frequenza di utilizzo di procedure diagnostiche e terapeutiche in fase acuta e post-acuta. Per realizzare questi obiettivi vengono utilizzate diverse fonti di informazione: i registri di popolazione locali (Friuli, Brianza, Veneto, Firenze, Modena, Napoli, Caltanissetta) che concorrono a stimare i tassi di occorrenza e di letalità degli eventi coronarici e cerebrovascolari; 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 coordinati nell'ambito del progetto CUORE, che forniscono stime di incidenza dell'infarto del miocardio e dell'ictus. È infatti noto che per avere un quadro esaustivo dell'impatto delle malattie cardio-cerebrovascolari 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; pertanto ictus e infarto del miocardio insieme rappresentano meno del 50% dei ricoveri ospedalieri e della mortalità per le malattie del sistema circolatorio.

Le metodologie applicate nella raccolta e validazione degli eventi sono raccomandate a livello internazionale (raccomandazioni EUROCISS, www.cuore.iss.it, MONICA *Monograph and Multimedia Sourcebook*, WHO Geneva 2003). L'appaiamento dei dati di mortalità e delle diagnosi di dimissione ospedaliera permettono l'identificazione degli eventi cardio-cerebrovascolari; 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 non soltanto di valutare la frequenza delle patologie, ma anche di confrontarli con quelli di altri Paesi e di studiarne l'andamento nel tempo. Per quanto riguarda la validazione degli eventi coronarici vengono applicati anche i nuovi criteri dell'ESC/ACC che aggiungono la valutazione della troponina. Tale valutazione degli eventi con i doppi criteri permette una valutazione più precisa e soprattutto permetterà di capire se la variazione nel tempo della morbosità delle malattie cardio-cerebrovascolari è dovuta ad una effettiva variazione oppure ad una modificazione dei criteri diagnostici.

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.

Piano triennale

Con i dati raccolti attraverso il Registro nazionale degli eventi coronarici e cerebrovascolari verranno stimati i tassi di attacco per i primi eventi e le recidive per fasce di età da 35 a 74 anni nei due sessi, per l'Italia e per singole aree geografiche rappresentative del Nord, Centro e Sud e valutate le differenze in termini di eventi fatali e non fatali. Verrà valutata la letalità a 28 giorni, per singole fasce di età e nei due sessi e nelle differenti aree geografiche. Nei dati complessivi provenienti dal Registro nazionale verrà studiata l'associazione fra letalità e procedure diagnostico-terapeutiche, nonché l'associazione fra fattori di rischio e gravità della malattia.

Proseguirà il follow-up e la validazione degli eventi sospetti coronarici e cerebrovascolari fatali e non fatali identificati nella coorte degli studi longitudinali inclusi nel progetto CUORE; tale procedura prevederà l'aggiornamento dello stato in vita della coorte arruolata, la ricerca per i deceduti delle cause di morte e la loro validazione; la ricerca dei ricoveri per l'identificazione degli eventi sospetti coronarici e cerebrovascolari non fatali e la validazione mediante l'applicazione degli stessi criteri diagnostici specifici utilizzati nei registri di popolazione; in questo modo sarà possibile calcolare i tassi di incidenza per eventi coronarici e cerebrovascolari suddivisi per età e sesso e valutare la letalità.

Proseguirà per tutto il 2009-2011 l'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare; nel 2008 è stata realizzata la fase pilota nelle regioni del Friuli e del Molise. A partire dal 2009 verranno esaminati campioni di popolazione in ogni Regione, un campione di 220 persone ogni 1,5 milioni di abitanti nella fascia di età 35-79 anni per un totale complessivo a fine indagine di 9.020 persone, 4.510 uomini e 4.510 donne. Verranno calcolate per l'Italia e per le singole macroaree la prevalenza delle malattie cardio-cerebrovascolari di origine arteriosclerotica come infarto del miocardio, fibrillazione atriale, ipertrofia ventricolare sinistra, TIA, accidenti cerebrovascolari e *claudicatio intermittens*. Per le singole Regioni i dati saranno disponibili man mano che localmente termineranno le operazioni di screening e saranno messi a disposizione nel sito web www.cuore.iss.it.

Gli indicatori elaborati dai 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, e utilizzando il modello IMPACT, verrà valutato l'andamento in discesa della mortalità per cardiopatia coronarica (già realizzato in parte nel 2008) 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.

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 Commissione europea 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 Antiveleni, Dipartimenti di Prevenzione delle ASL e Regioni. Ciascun caso segnalato viene esaminato in applicazione di procedure standard per valutare l'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).

Piano triennale

Nel corso del triennio 2009-2011 verrà mantenuto il sistema di sorveglianza nazionale dedicato agli antiparassitari. In questo periodo, verranno acquisiti i nuovi dati rilevati dai centri che collaborano all'iniziativa (rilevazione già in corso per il 2009), verranno concluse le analisi relative alla casistica osservata negli anni 2007-08 e si procederà all'analisi dei dati relativi al nuovo triennio. Il piano di lavoro prevede la disamina dei dati a livello nazionale e regionale. Inoltre, il database disponibile verrà utilizzato per approfondimento su problematiche specifiche. Una parte delle attività previste verrà dedicata alla valutazione delle ricadute di misure restrittive adottate in sede comunitaria per selezionati principi attivi, anche in considerazione delle segnalazioni effettuate dal sistema di sorveglianza nazionale attivo presso l'ISS. In particolare, verrà seguita l'evoluzione temporale degli incidenti causati da esposizioni ai composti idrogeno cianammide e metomil. Altri approfondimenti verranno dedicati agli incidenti di tipo collettivo causati dalla dispersione nell'ambiente circostante di agenti utilizzati per la geodisinfestazione delle serre.

Sorveglianza speciale Chikungunya e Dengue

L'epidemia da febbre da virus Chikungunya, che si è verificata l'estate del 2007 nelle Province di Ravenna, Forlì-Cesena, Rimini e Bologna, ha dimostrato la possibilità di importazione di malattie trasmesse da vettori, che fino ad ora si erano manifestate solo in zone tropicali, in tutte le zone in cui il vettore (in questo caso la zanzara tigre – *Aedes albopictus*), è presente. Questo nuovo scenario, reso possibile dalla presenza massiccia nel nostro territorio di insetti vettori competenti alla trasmissione di queste malattie, impone l'adozione universale e tempestiva di misure efficaci di controllo della popolazione di questi insetti e di sistemi di sorveglianza sanitaria estremamente sensibili. L'adozione di queste misure non solo viene richiesta dalle autorità sanitarie internazionali, ma è altresì indispensabile per prevenire il ripetersi di fenomeni, come quello verificatosi nell'estate del 2006, che possono produrre problemi di salute e arrecare gravissimi danni all'economia nazionale. *Aedes albopictus* è stabilmente impiantato in Italia da diversi anni ed è ormai evidente che la presenza di questo insetto non rappresenta più solo un problema di fastidio legato alla sua particolare aggressività, ma costituisce un concreto rischio per la salute connesso alla trasmissione di alcune malattie tra cui Chikungunya e Dengue. Occorre quindi mettere in atto un sistema molto sensibile di sorveglianza sanitaria per l'individuazione tempestiva di eventuali casi importati o autoctoni, nonché predisporre misure di gestione idonee a contenere la trasmissione della malattia.

Il DM 15/12/1990 "Sistema informativo delle malattie infettive e diffusive" prevede che le segnalazioni dei casi sospetti di Febbre Chikungunya e Dengue siano notificati in classe V senza particolari criteri diagnostici da rispettare. Nel sistema sono inclusi sia casi probabili che confermati: i singoli casi vengono notificati dall'ASL alla Regione con frequenza mensile, e si prevede una comunicazione annuale al Ministero della Salute riportante il riepilogo dei casi segnalati nel periodo. Non esiste scheda di sorveglianza.

La lettera circolare del Ministero della Salute datata 4 agosto 2006 "Sorveglianza della Chikungunya" ha istituito, in relazione all'epidemia insorta nell'Oceano Indiano, un apposito sistema di sorveglianza per i casi di Chikungunya della durata di un anno. Tale Circolare prevedeva che ogni caso sospetto o confermato sia segnalato, mediante l'apposita scheda, entro 48 ore contemporaneamente al servizio di Igiene Pubblica competente (che provvederà a darne comunicazione alla Regione); al Ministero della Salute (Ufficio V – Malattie Infettive e Profilassi Internazionale); all'ISS (Reparto Epidemiologia malattie infettive – CNESPS). Il sistema di sorveglianza nazionale era dunque impostato per ottenere una registrazione dei soli casi di Chikungunya a fini epidemiologici per un periodo limitato di tempo, ma non era disegnato per consentire la messa in atto di interventi immediati di controllo della diffusione della malattia. Per questo dopo l'epidemia verificatasi nel 2007 in Italia si sta cercando di mettere in atto un sistema di sorveglianza basato su criteri diversi.

Piano triennale

Le attività previste dal REMI/CNESPS, in collaborazione con il Ministero della Salute e le Regioni, per i prossimi anni sono per prima cosa l'attivazione in via sperimentale di un sistema di trasmissione dati online sui casi sospetti di Chikungunya e Dengue. Tale sistema è già stato messo a disposizione della Regione Emilia Romagna e costituisce uno strumento che verrà utilizzato nel corso dell'attività futura. La sperimentazione di tale sistema verrà effettuata in cinque Regioni italiane durante la stagione estiva del 2009 (Emilia Romagna, Lombardia, Marche, Puglia, Veneto) per poi essere esteso all'intero territorio nazionale. 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.

Sorveglianza speciale West Nile Virus

La *West Nile* (WNV) è una malattia infettiva ad eziologia virale trasmessa da un Flavivirus, veicolato dalla puntura di zanzare appartenenti soprattutto al genere *Culex*. Il ciclo naturale del virus prevede il passaggio tra il vettore e un elevato numero di specie di uccelli selvatici, nei quali può provocare anche una significativa mortalità. Il virus può infettare diverse specie di vertebrati (mammiferi, uccelli, rettili) e tra i mammiferi l'uomo e il cavallo possono mostrare sintomatologia clinica.

Il primo focolaio di infezione da WNV in Italia si verificò nel 1998 in Toscana (Padule di Fucecchio) dove causò 14 casi clinici in cavalli, di cui sei mortali. Nel corso dell'epidemia non si verificò alcun caso umano, ma vennero rilevate positività anticorpali in persone che condividevano con i cavalli il rischio delle punture di zanzara. Nel 2008 il territorio della provincia di Ferrara e parte del territorio della provincia di Bologna sono stati interessati da casi confermati di infezione da WNV in 13 cavalli. Successivamente a questo episodio sono stati segnalati due casi umani di WNV: uno in provincia di Bologna e l'altro in provincia di Ferrara. Sono stati inoltre segnalati cavalli affetti in Veneto.

Attualmente in Emilia Romagna e nel Veneto è attiva una sorveglianza umana delle forme neurologiche da *West Nile*, mentre sul territorio nazionale sono attivi sistemi di sorveglianza veterinaria secondo quanto previsto dal Piano di sorveglianza nazionale per l'encefalomielite di tipo *West Nile* negli animali (GU n. 36 del 12/02/2008).

Tuttavia, per quanto riguarda l'ambito della sorveglianza sui casi umani di sindrome neurologica da *West Nile* al livello nazionale non è ancora disponibile un Piano, nonostante la sorveglianza epidemiologica consenta, insieme alla sorveglianza animale, di evidenziare la circolazione del virus in un determinato ambito territoriale e di avere una stima della sua entità attraverso l'individuazione sistematica dei casi clinici emergenti. Pertanto risulta prioritario definire l'ambito di applicazione di una eventuale sorveglianza umana nelle aree a dimostrata circolazione di WNV negli animali e aree limitrofe nel periodo di circolazione della zanzara *Culex*. Tale periodo potrà essere modificato in base alle evidenze epidemiologiche ottenute fino a quel momento sia in ambito umano che animale.

Piano triennale

Le attività previste nel prossimo triennio per il REMI/CNESPS riguardano l'implementazione e la validazione, con conseguente diffusione, di un sistema di segnalazione dei casi probabili e dei relativi risultati del laboratorio di riferimento regionale attraverso un sistema informatizzato di segnalazione via web che non richiede l'invio via fax a Ministero Salute e ISS. Tutto questo per una più veloce condivisione delle informazioni. Le informazioni raccolte attraverso questo sistema permetteranno di monitorare l'andamento delle segnalazioni sul territorio nazionale e di produrre *report* tempestivi sull'andamento delle segnalazioni.

Ufficio di Statistica

L'Ufficio di Statistica dell'ISS, che rappresenta l'ISS nell'ambito del SISTAN (Sistema Statistico Nazionale) deve adempiere a tutti i compiti necessari all'interazione tra ISS e SISTAN.

In primo luogo deve ogni anno "x" dar corso agli adempimenti previsti dal DL.vo 6 settembre 1989, n. 322 e in particolare alla predisposizione:

- degli Atti per la Relazione che il Presidente del Consiglio dei Ministri deve rendere al Parlamento (ai sensi dell'art. 24 del DL.vo 322/1989);
- del Programma Statistico Nazionale (PSN) per il Triennio "da x+1 a x+3".

A tale scopo deve fornire, entro date fissate:

- una relazione dettagliata degli elementi identificativi, risorse ed attività dell'Ufficio di Statistica;
- una relazione dettagliata dell'attività svolta dall'Ufficio di Statistica nell'anno "x";
- lo stato di attuazione del PSN del Triennio "da x-1 a x+1", attraverso una dettagliata descrizione dello stato di realizzazione dei lavori, nonché sulla diffusione dei risultati; in particolare è prevista l'acquisizione degli indirizzi web da inserire, nel sito www.sistan.it, nell'elenco dei siti web nei quali è possibile accedere ai risultati dei progetti previsti nel PSN.

Un compito rilevante dell'Ufficio di Statistica è contribuire a formare il PSN, proponendo l'inserimento e/o la conferma di "Progetti" svolti in Istituto, sotto forma di rilevazioni, se vengono rilevati dati *ad hoc*, di elaborazioni, se vengono utilizzati dati raccolti da altri soggetti, o di studi progettuali, se vengono proposti per la prima volta.

Nel caso in cui nel Progetto vengano trattati dati personali (di cui al DL.vo 196/2003) l'Ufficio di Statistica, insieme al 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": essi sono organismi consultivi, organizzati sotto forma di gruppi di lavoro permanenti e sono 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'Ufficio di Statistica dell'ISS è presente nei Circoli di Qualità relativi agli argomenti sui quali l'ISS è attivo con Progetti presenti nel PSN, e quindi, in primo luogo, nel Circolo di Qualità denominato "Sanità".

Oltre ai suddetti adempimenti che (a meno di stravolgimenti legislativi) 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: ne sono esempi tipici alcune rilevazioni a cura del Ministero dell'Economia, riguardanti vari argomenti di spese e personale.
- Svolgere analisi ed elaborazioni scientifiche – che rispondano a quesiti di sanità pubblica provenienti da 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'Ufficio di Statistica inoltre gestisce la Convenzione-Accordo Quadro di collaborazione Scientifica tra ISS e ISTAT e partecipa alle riunioni del Gruppo Paritetico ISS ISTAT prevista dall'accordo stesso.

Infine, poiché la normativa prevede che gli Uffici di Statistica promuovano la "Diffusione della cultura statistica", ogni anno l'Ufficio di Statistica organizza un Corso "Introduzione all'uso dei *Package* per l'analisi statistica dei dati" per operatori dell'SSN, che riceve un cospicuo numero di "crediti" ECM.

Piano triennale

Nell'ambito degli adempimenti annuali previsti dal DL.vo 06/09/1989, n. 322 verranno elaborati i seguenti documenti:

- una relazione dettagliata degli elementi identificativi, risorse e attività dell'Ufficio di Statistica;
- una relazione dettagliata dell'attività svolta dall'Ufficio di Statistica nell'anno "x" in corso
- lo stato di attuazione del PSN del Triennio "x-1, x+1" attraverso una dettagliata descrizione dello stato di realizzazione dei lavori, nonché sulla diffusione dei risultati.

Personale dell'Ufficio di Statistica parteciperà ai lavori del Circolo di Qualità "Sanità", che lavorerà per contribuire alla predisposizione del PSN "x+1, x+3"; verrà vagliata la riconferma dei progetti già presentati e si valuterà se e quali nuovi progetti inserire, seguendo i criteri stabiliti dal Comitato di Indirizzo e Coordinamento della Informazione Statistica (COMSTAT) secondo i quali la presenza di un lavoro nel PSN deve rivestire interesse per l'intera collettività nazionale o per sue componenti significative. Ne segue che i lavori di interesse locale possono essere accolti nel programma allorché rivestano carattere "prototipale", cosicché altri soggetti possano successivamente ispirarsi ad essi, ovvero si tratti di rilevazioni essenziali alla conoscenza di fenomeni di forte rilievo che si presentino in porzioni del territorio nazionale e per i quali non siano altrimenti reperibili pertinenti informazioni.

Relativamente ai Progetti che verranno accettati nel PSN, verranno preparate, insieme ai responsabili, dettagliate relazioni, comprendenti parti apposite che tengono conto degli aspetti di *privacy* (DL.vo 196/2003) che verranno inviate al SISTAN per via cartacea e telematica.

L'Ufficio di Statistica parteciperà raccogliendo, vagliando e fornendo dati riguardanti varie caratteristiche dell'ISS (attività, personale, finanziamenti) alle varie indagini previste dal Programma Statistico Nazionale, che coinvolgeranno le amministrazioni centrali.

L'Ufficio di Statistica svolgerà nel corso di ciascun anno del triennio 2009-2011 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 da dare in tempi brevissimi.

In ciascun anno del triennio 2009-2011 verrà organizzato presso l'ISS il corso per operatori dell'SSN dal titolo "Introduzione all'uso dei *package* per l'analisi statistica dei dati".

Il Corso verrà sottoposto alla procedura di Accreditamento ECM.

Nell'ambito della Convenzione Accordo Quadro in materia statistica tra ISTAT e ISS verranno tenute riunioni del Gruppo di Lavoro Paritetico ISS-ISTAT per affrontare tematiche e proposte di collaborazione tra le due istituzioni. Nell'ambito dell'alternanza alla presidenza del Gruppo tra Responsabile dell'ISTAT e dell'Ufficio di Statistica dell'ISS a quest'ultimo essa sarà affidata nel 2010.

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 2 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*.

Dalla revisione della letteratura internazionale disponibile su questo argomento, nell'ambito del progetto Mattoni sono stati selezionati 45 indicatori. Di questi, 32 sono stati effettivamente calcolati e pubblicati su sito web del Ministero della Salute. Lo studio dei singoli indicatori, dell'affidabilità e completezza dei dati disponibili ha comunque permesso di esprimere un giudizio in merito alla fattibilità e alla implementabilità per ciascuno degli indicatori selezionati. Il risultato, prodotto nel documento "Raccomandazioni finali del Mattone – Misura dell'Outcome", è stato di individuare, un gruppo di indicatori implementabile su base routinaria.

Inoltre PROGRESSI contiene e integra i risultati di esperienze di ricerca epidemiologica analitica. Quanto prodotto nel Progetto BPAC è servito a lanciare una nuova attività per la valutazione di esiti in cardiocirurgia (Mattone – Outcome BYPASS). Sono state, quindi, avviate altre attività in collaborazione con l'ANMCO, per la valutazione degli esiti relativi al trattamento delle sindromi coronariche acute (IN-ACS Outcome), con il GISE per le procedure di angioplastica (OSCAR) e con l'Università di Milano Bicocca per lo studio comparativo degli esiti di stenting carotideo (RISC).

Questi studi forniranno un importante contributo scientifico all'introduzione della misura sistematica degli esiti nell'SSN che rappresenta una valida e moderna attività di controllo e valutazione che riguarda gli esiti degli interventi sanitari nel nostro Paese.

Piano triennale

Nel corso del triennio 2009-2011 sono previste le seguenti attività:

- Acquisizione della base di dati SDO nazionale per gli anni 2006-2008.
- Produzione sistematica e interpretazione di 20 indicatori di esito per struttura e per ASL di residenza relativamente ai ricoveri ospedalieri dall'anno 2004 all'anno 2008. Questi indicatori riguarderanno diverse aree di patologie e/o trattamenti, e saranno suddivisi nelle seguenti categorie: indicatori di assistenza distrettuale (ricoveri prevenibili), indicatori di assistenza ospedaliera, indicatori di risultato e indicatori di prevenzione primaria.
- Conclusione delle attività relative ai quattro studi di valutazione degli esiti OSCAR, RISC-2, IN-ACS Outcome, BYPASS, inseriti nel programma PROGRESSI; diffusione dei risultati e pubblicazione di documenti scientifici specifici per studio.

Sarà avviato uno studio di fattibilità per la "Valutazione sistematica degli esiti di impianto di valvole cardiache". Tale studio avrà l'obiettivo di valutare il rischio cardiocirurgico valvolare e gli esiti a breve e lungo termine delle due procedure attualmente utilizzate nel trattamento della stenosi aortica: la sostituzione chirurgica della valvola aortica e l'impianto di protesi transcateretere. Questo studio si baserà sulla raccolta online di dati clinici, a carico dei centri di cardiocirurgia e di cardiologia interventistica che aderiranno a questa nuova iniziativa. I risultati saranno utili ai fini di una valutazione comparativa di efficacia delle due procedure e quindi alla produzione di linee guida per l'identificazione delle caratteristiche dei pazienti da indirizzare verso l'una o l'altra procedura secondo criteri oggettivi di costo/efficacia.

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 una 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). 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 trasfusionisti, 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.

Piano triennale

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; le prima e l'ultima caratteristica variano nel tempo, basti pensare all'obesità e al diabete, notevolmente aumentati in questi ultimi anni, 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 per Regione. Inoltre l'aggiornamento e l'aggiunta di nuovi fattori può migliorare la predizione nelle donne in età avanzata, con le conseguenti azioni di prevenzione. La nuova coorte dell'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare, arruolata nel 1998-2002 verrà inserita nel database degli studi longitudinali del progetto CUORE: si tratta di una nuova coorte di 10.000 persone di età compresa fra 35 e 74 anni; questa coorte ha informazioni dettagliate sulla familiarità per eventi cardio-cerebrovascolari in età precoce. È previsto il follow-up delle coorti fino a dicembre 2004 per la valutazione dello stato in vita e la raccolta degli eventi coronarici e cerebrovascolari. Gli eventi verranno raccolti attraverso tutte le possibili informazioni (ricovero ospedaliero, questionario postale ai familiari, telefonata all'MMG, precedente ricovero ospedaliero, informazioni raccolte dal certificato di morte), e la validazione degli eventi sospetti verrà realizzata con le stesse metodologie applicate per gli altri studi longitudinali, seguendo le procedure MONICA. Sarà in questo modo possibile creare nuove funzioni di rischio con le inclusioni di variabili non risultate significative in precedenza, quali la familiarità per eventi cardio-cerebrovascolari in età precoce. Sarà inoltre possibile valutare in maniera più esaustiva anche il ruolo dell'indice di massa corporea che nella precedente funzione non risultò significativo; infatti è noto dalla letteratura che tale indicatore assume un peso eziologico solo nella predizione a lungo termine.

In questo modo sarà possibile inserire nel punteggio individuale due nuove variabili, familiarità per evento precoce e indice di massa corporea dando una valutazione più aggiornata e 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:

- La conduzione di studi descrittivi sull'uso dei farmaci;
- Lo sviluppo di modelli previsionali sull'andamento dei consumi e della spesa farmaceutica;
- La conduzione di studi epidemiologici osservazionali e sperimentali;
- La 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 della applicazione di modelli innovativi di strategie assistenziali.

Piano triennale

- Realizzazione di un *Datawarehouse*
Alla base delle attività precedentemente descritte vi è l'esigenza di disporre di fonti di dati routinarie che siano certificate e sistematicamente aggiornate attraverso il controllo di qualità e la certificazione dei database (OsMed, Sistemi di monitoraggio regionale, dati amministrativi, ecc.) e l'identificazione e l'integrazione di nuovi flussi informativi (es. SDO, MMG, ecc.).
Questi flussi informativi saranno ricondotti e armonizzati in un unico ambiente informatico di gestione (*Datawarehouse*) in modo da costituire un patrimonio informativo che sia certificato e facilmente accessibile (anche con moderne tecnologie informatiche) a coloro che sono accreditati (organismi ufficiali, operatori sanitari, ricercatori, ecc.).
- Realizzazione di *Report* annuali finalizzati a:
 - descrivere l'insieme del consumo dei farmaci in ambito ospedaliero, in distribuzione diretta, e in convenzionata territoriale;
 - stimare l'impatto, sui livelli di prescrizione e sull'appropriatezza, delle variazioni nelle modalità organizzative di erogazione dell'assistenza farmaceutica (es. modifiche nella distribuzione diretta);
 - valutare l'effetto sul consumo regionale dei farmaci dell'introduzione di nuove molecole rimborsabili dall'SSN e degli interventi nazionali sulla prescrivibilità (per es. "note" limitative, farmaci generici, compartecipazioni alla spesa);
 - descrivere l'uso dei farmaci in alcune specifiche sottopopolazioni (per es. bambini, anziani, pazienti con diabete, ecc.);
 - analizzare l'appropriatezza della prescrizione per specifiche categorie terapeutiche di maggiore interesse nella popolazione definendo opportuni indicatori.
- La conduzione di studi epidemiologici eziologici

Nel triennio di attuazione del programma, potranno essere attivate altre attività di ricerca attraverso la conduzione di studi epidemiologici (come già in diverse occasioni negli anni passati) a seguito di specifiche esigenze e/o problemi emergenti di sanità pubblica nel campo dei farmaci, identificati congiuntamente dall' AIFA e dall'ISS.

Working Group Alcohol and Health – DG SANCO

È il gruppo di lavoro formale che svolge attività di consulenza alla DG SANCO. Dal 1999, su nomina del governo italiano, partecipa ai lavori di definizione delle strategie di prevenzione europee. Su mandato del Ministero della Salute, l'ISS garantisce dal 1999, tramite il rappresentante nominato, la partecipazione dell'Italia alle attività della Commissione Europea dedicate alla valutazione periodica prevista dalla Raccomandazione del Consiglio "Consumo di bevande alcoliche da parte di bambini e adolescenti" e dalla Conclusione del Consiglio per l'adozione di una strategia comunitaria tesa a ridurre l'impatto sociale e sanitario dell'alcol nell'ambito della popolazione generale. Partecipa alla predisposizione, nell'ambito delle Relazioni sulla sanità pubblica identificate come prioritarie dalla Commissione, delle relazioni sottese alla produzione di Raccomandazioni o Conclusioni del Consiglio e delle Comunicazioni della Commissione al Parlamento UE. Le attività svolte sono alla pagina http://europa.eu.int/comm/health/ph_determinants/life_style/alcohol_en.htm.

Piano triennale

Il *Working Group* ha acquisito un ruolo ancora più finalizzato a seguito del lancio della Strategia Comunitaria sull'Alcol che ha determinato la nascita di nuovi gruppi formale. A tale riguardo, su mandato e sui nomina diretta del Ministero l'ISS attraverso l'Osservatorio Nazionale Alcol del CNESPS è membro permanente dei principali organismi identificati a livello europeo per il monitoraggio delle politiche sull'alcol agendo:

- come rappresentante unico governativo italiano nello "*Standing Committee on Alcohol Policies and Action*" della Commissione Europea (Direzione Generale V. Luxembourg) (http://ec.europa.eu/health/ph_determinants/life_style/alcohol/documents/ev_20071105_en.pdf).
- come rappresentante unico governativo italiano nell'"*European Alcohol and Health Forum*" della Commissione Europea (Direzione Generale V. Bruxelles.)

Le attività previste sono dettagliate nella Relazione al Parlamento da parte del Ministro ai sensi della Legge 125/2001 a cui si rimanda. Altre fonti di informazione periodica basata sulle attività specifiche sono quelle reperibili sui siti della Commissione Europea come ad esempio i *report* predisposti dall'Osservatorio Nazionale Alcol in merito al livello di implementazione della *Council Recommendation (05/06/2001) on the drinking of alcohol by young people, in particular children and adolescents* reperibile alla pagina http://ec.europa.eu/health/ph_determinants/life_style/alcohol/documents/alcohol_com_625_a3_en.pdf o il *report* richiesto e formalmente prodotto dall'Osservatorio 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).

Nel prossimo triennio l'Osservatorio Nazionale Alcol del CNESPS continuerà a partecipare alla predisposizione, nell'ambito delle Relazioni sulla sanità pubblica identificate come prioritarie dalla Commissione, delle relazioni sottese alla produzione di Raccomandazioni o Conclusioni del Consiglio e delle Comunicazioni della Commissione al Parlamento UE. Le attività svolte saranno oggetto di regolare pubblicazione alla pagina http://europa.eu.int/comm/health/ph_determinants/life_style/alcohol_en.htm e si avvarranno della collaborazione formale con il Centro Alcológico Regionale della Toscana, CAR e della Società Italiana di Alcologia, SIA.

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, nell'agosto 2001, l'ISS, 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 Copenhagen 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); 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>).

La WHO CC ha la sua articolazione nazionale nell'Osservatorio Nazionale Alcol – CNESPS. Il Centro collabora con la Consulta Nazionale Alcol ai sensi della Legge 125/2001.

Piano triennale

Il Centro Collaborativo della WHO per la Ricerca e la Promozione della Salute su Alcol e Problematiche Alcolcorrelate (<http://www.iss.it/chis/coms/cont.php?id=115&lang=1&tipo=19>) il ruolo *focal point* di raccordo, rispettivamente nazionale e internazionale-europeo, riguardo alle tematiche alcolcorrelate, epidemiologiche e di salute pubblica, da privilegiare attraverso la ricerca, la programmazione, l'implementazione e la valutazione dei programmi, dei progetti, delle ricerche e delle iniziative che il piano di lavoro formale identifica in attività:

- di comunicazione, informazione e sensibilizzazione
- di formazione
- di prevenzione
- di promozione della salute.

che possono contribuire a ridurre il carico di malattia, disabilità e di mortalità evitabile derivante dall'uso inadeguato e dall'abuso di alcol. Tali attività sono e saranno svolte attraverso il personale e le risorse dell'Osservatorio Nazionale Alcol e del Reparto Salute della popolazione del CNESPS e in stretta collaborazione con la Società Italiana di Alcolologia e il Centro Alcolologico Regionale della Toscana, CAR.

Facendo seguito a quanto approvato nel 2006 dal Comitato Scientifico permanente del CCM – Ministero della Salute e a quanto previsto dal piano programmatico delle attività previste per il triennio 2006-2009 il WHO CC e l'Osservatorio Nazionale Alcol – Reparto Salute della popolazione e suoi determinanti hanno formalmente svolto il ruolo di assistenza tecnica attribuitogli dal CCM per favorire la realizzazione delle attività del Piano Nazionale Alcol e Salute e, tramite uno specifico accordo di collaborazione, ha avviato le attività per la produzione di analisi dedicate e *report* annuali (2007 e 2008) basati sul Progetto "Raccolta e analisi centralizzata di flussi informativi e dati relativi all'impatto dell'uso e abuso di alcol sulla salute in Italia, in supporto alla implementazione delle attività del Piano nazionale Alcol e Salute" finalizzato alla produzione dei dati utili per la Relazione al Parlamento in ottemperanza alla Legge 125/2001.

Si rafforzeranno nel triennio le attività già svolte nel 2008 e in particolare quelle connesse alle nomine formali in qualità di:

- organismo esperto designato dalla WHO per la “*WHO Technical Consultation on assessment of prevention and treatment systems for substance use disorders*”, 18-20 dicembre 2006, *WHO Headquarter*, Ginevra (http://www.who.int/substance_abuse/activities/saims/en/index.html)
- *technical consultant* su designazione della WHO nel *Working Group “Assessment of prevention and treatment systems for substance use disorders” WHO Headquarter*, Geneva, 2006-2007 (*report* prodotto alla pagina http://www.who.int/entity/substance_abuse/activities/saims_report_2006.pdf)
- rappresentante unico italiano ed esperto su designazione della WHO e del Direttore del CNESPS per la redazione della *Position Paper Italiana* e per l’*“Open Consultation between WHO secretariat and selected stakeholders on health problems related to alcohol consumption” WHO Headquarter*, Geneva, 09/10/2006 (http://www.who.int/substance_abuse/activities/stakeholders_participants.pdf)
- rappresentante governativo e *National Counterpart* nel Network per l’implementazione della “*Framework on Alcohol policies in the European Region*” (<http://www.euro.who.int/alcoholdrugs/CtryInfo/CtryInfoRes?Country=ITA>)
- rappresentante governativo ed esperto nazionale sulla tematica “*Alcohol Policy*” nelle sedi di Copenhagen e Ginevra.

Saranno disseminate attraverso la Commissione Europea le relazioni prodotte dal WHO CC e dall’Osservatorio Nazionale Alcol per le programmate Conferenze europee sull’alcol già programmate e che produrranno materiali ed evidenze come quelle già disseminate in occasione della *European Conference on Alcohol* di Helsinki (oggi disponibili al sito http://btg.health.fi/?i=111384&s=5&v=11&name=Alcohol_health_policies_italian_Scafato_em_anuele-ppt.pdf.) e della Conferenza Europea sull’Alcol del 3-5 aprile 2008 di Barcellona (http://www.dss3a.com/btg/pdf/Parallels/Fri_mor/emanuele_scafato_fri_mor_strand8.pdf).

**Centro Nazionale
Sostanze Chimiche**

Attività di ricerca

Applicazione del Regolamento 1907/2006 CE (REACH)

L'attività comprenderà la valutazione del rischio delle sostanze chimiche prioritarie inserite nel *rolling plan* triennale dell'Agenzia Europea delle Sostanze Chimiche (ECHA).

Tale attività comprenderà inoltre la partecipazione ai Comitati Tecnici dell'ECHA per le attività di supporto all'Autorità Competente italiana per il Comitato degli Stati membri, per il Forum e per il Comitato di Valutazione del Rischio. Nell'ambito del progetto è prevista una procedura di vigilanza a livello nazionale (Stato-Regioni) e internazionale (confronto e partecipazione a ispezioni con altri Stati membri UE) e di formazione a livello nazionale.

Risultati attesi nel triennio

Individuazione di sostanze chimiche prioritarie da inserire nel *rolling plan* predisposto dall'ECHA.

Valutazione di sostanze prioritarie assegnate all'Italia ed eventuali proposte di restrizione.

Individuazione di sostanze particolarmente pericolose (PBT, vPvB, sregolatori endocrini, CMR) per l'inclusione nella procedura di autorizzazione prevista dal Regolamento REACH.

Formazione di ispettori per l'implementazione del Regolamento REACH a livello nazionale.

Applicazione del Regolamento 1907/2006 CE (REACH) e del Regolamento n. 1272/2008 (CLP). Supporto al Ministero della Salute per l'attività di vigilanza sul territorio nazionale degli articoli con sostanze chimiche presenti sul mercato che possono creare pericolo e rischio legato all'utilizzo per i consumatori

L'attività comprenderà la valutazione del rischio delle sostanze chimiche prioritarie inserite nel *rolling plan* triennale dell'Agenzia Europea delle Sostanze Chimiche (ECHA).

Tale attività comprenderà inoltre la partecipazione ai Comitati Tecnici dell'ECHA per le attività di supporto all'Autorità Competente italiana per il Forum e del *Security Network Officer*. Nell'ambito del progetto è prevista una procedura di vigilanza a livello nazionale (Stato-Regioni) e internazionale (confronto e partecipazione a ispezioni con altri Stati membri UE) e di formazione a livello nazionale.

Risultati attesi nel triennio

Individuazione di sostanze chimiche prioritarie da inserire nel *rolling plan* predisposto dall'ECHA.

Valutazione di sostanze prioritarie assegnate all'Italia ed eventuali proposte di restrizione.

Gestione dell'*Help desk* CLP di supporto alle aziende per l'attuazione del Regolamento CLP.

Formazione di ispettori per l'implementazione del Regolamento REACH a livello nazionale.

Attività di formazione nel settore biocidi e dei cosmetici

La prima fase del piano di formazione riguarderà la selezione del personale qualificato che parteciperà al progetto, con l'obiettivo di acquisire la qualifica di ispettore nel settore dei biocidi e cosmetici. La formazione verrà svolta mediante lezioni in aula e mediante esercitazioni pratiche. Con l'accordo delle Associazioni professionali e di ditte specializzate nel settore biocidi e dei cosmetici, si valuterà la possibilità di effettuare visite ispettive in loco a scopo didattico.

Risultati attesi nel triennio

Formare del personale che possa esercitare l'attività di vigilanza in maniera adeguata, conformemente a quanto previsto dalla direttiva 98/8/CE e dalla legge n. 713 dell'11/10/1998.

Trasferibilità dei risultati

Gli ispettori trasmetteranno ad altri quanto appreso diffondendo la formazione, l'Istituto diventerà l'organo tecnico che formerà gruppi mirati alla legge sopradescritta.

Attività di supporto e collaborazione per Regolamento REACH

È stata istituita una *task force* (in una precedente convenzione) con esperti del Ministero e dell'ISS che, con il supporto di personale a contratto, gestirà la transizione dall'attuale sistema normativo sulle sostanze chimiche al sistema Reach.

Risultati attesi nel triennio

Costituzione di un nucleo di esperti in grado di far fronte ai compiti affidati alle autorità nazionali dal Regolamento Reach.

Banca Dati Biocidi e Osservatorio Cosmetovigilanza

Istituire un Osservatorio Nazionale di Cosmetovigilanza e costruzione di un prototipo di banca dati sui biocidi. Sarà selezionata una ditta informatica che, insieme alle risorse professionali dell'Istituto, svilupperanno una banca dati dei principi e dei prodotti biocidi all'interno del sistema operativo del Ministero. Si provvederà in seguito alla manutenzione e aggiornamento periodico della banca dati con l'inserimento dei nuovi principi attivi e delle nuove autorizzazioni/registrazioni. La banca dati verrà messa a disposizione del pubblico sul sito web del Ministero in una versione priva di tutte le informazioni confidenziali.

Risultati attesi nel triennio

Sviluppo e implementazione di una banca dati dei principi e prodotti biocidi all'interno del sistema operativo del Ministero. Il Ministero rende disponibili all'ISS le informazioni e il livello di accesso all'impianto informativo eventualmente necessari per l'espletamento delle attività di aggiornamento della banca.

Trasferibilità dei risultati

La creazione di un sito osservazionale relativo agli eventi avversi segnalati per dispositivi e cosmetici consentirà all'ISS di rafforzare il suo ruolo centrale nel sistema sanitario nazionale consentendogli di valutare con maggiore efficacia la sicurezza di tali prodotti.

Banca Dati Bonifiche (BDB)

La Banca Dati Bonifiche (BDB) è predisposta e aggiornata dal Reparto Suolo del Dipartimento AMPP e dal CSC dell'ISS, con il supporto del Settore I – Informatica del SIDBAE. La BDB fornisce informazioni non riservate, validate, aggiornate e complete su sostanze di interesse nelle procedure di bonifica di siti contaminati (sia presenti nella normativa che non). La BDB include:

- sia sostanze per le quali è disponibile una concentrazione limite nel suolo, nel sottosuolo e/o nelle acque sotterranee, incluse nel DL.vo 152/2006
- sia sostanze per le quali non è definita una concentrazione limite nel citato DL.vo 152/2006 ma che sono state rilevate in siti di bonifica e per le quali è stato chiesto all'ISS di proporre una concentrazione di riferimento.

La BDB 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 BDB è consultabile all'indirizzo web: <http://www.iss.it/site/BancaDatiBonifiche/>.

Risultati attesi nel triennio

Accesso alla Banca Dati sul sito web dell'ISS e disponibilità delle informazioni presenti nella Banca Dati stessa per gli organismi nazionali deputati alla bonifica dei siti contaminati.

Trasferibilità dei risultati

Informazione per quanti si occupano della bonifica dei siti contaminati nell'ambito dell'SSN.

Banca Dati Sensibilizzanti (BDS)

La Banca Dati su sostanze chimiche potenzialmente sensibilizzanti (BDS) è predisposta e aggiornata dal CRIVIB e dal CSC dell'ISS, con il supporto del Settore I – Informatica del SIDBAE e di esperti. La BDS non propone classificazioni di sostanze sensibilizzanti o potenzialmente tali ma presenta in forma sintetica informazioni non riservate relative a questo *endpoint*. La BDS include sostanze classificate come sensibilizzanti dalla UE nell'ambito della Direttiva 67/548/CEE, sostanze classificate come tali da enti con competenza di valutazione del rischio per l'ambiente di lavoro (es. ACGIH e DFG) o anche in generale sostanze esaminate da istituzioni sia governative (US NTP) che di settore (ETAD, 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

Accesso alla Banca Dati sul sito web dell'ISS e disponibilità delle informazioni presenti nella Banca Dati stessa sia per la comunità scientifica che per le imprese.

Trasferibilità dei risultati

Informazione per quanti si occupano di identificazione e valutazione sia in ambito centrale sia periferico nel sistema sanitario nazionale. Informazione per gli esposti in ambito lavorativo. Informazione per le imprese.

La Banca Dati Cancerogeni (BDC)

La Banca Dati Cancerogeni (BDC) è predisposta e aggiornata dal CSC dell'ISS, con il supporto del Settore I – Informatica del SIDBAE e di esperti interni ed esterni all'ISS. La BDC non classifica i cancerogeni ma presenta, in forma sintetica e integrata, le classificazioni e valutazioni di cancerogenicità ufficiali formulate da enti competenti a livello internazionale e nazionale (IARC, UE, US EPA, NTP, CCTN). La BDC è una banca dati relazionale, ed è inoltre una banca fattuale, satellite dell'Inventario Nazionale delle Sostanze Chimiche dal quale deriva e si alimenta. I dati contenuti nella BDC sono utilizzabili immediatamente e presentati in forma sintetica. Le informazioni, corredate da riferimenti bibliografici, pur essendo esaustive in sé consentono di risalire alla fonte originale e in alcuni casi di collegarsi direttamente ad essa mediante la rete. La BDC è consultabile all'indirizzo web: <http://www.iss.it/site/BancaDatiCancerogeni/>.

Risultati attesi nel triennio

Accesso alla Banca Dati sul sito web dell'ISS e disponibilità delle informazioni presenti nella Banca Dati stessa sia per la comunità scientifica che per le imprese.

Trasferibilità dei risultati

Informazione per quanti si occupano di identificazione e valutazione sia in ambito centrale sia periferico nel sistema sanitario nazionale. Informazione per gli esposti in ambito lavorativo. Informazione per le imprese.

Raccolta di informazioni e definizione del pericolo per la salute umana e l'ambiente correlato all'uso delle sostanze chimiche

- Inventario Nazionale delle Sostanze chimiche:
 - Raccolta, catalogazione e valutazione delle informazioni reperibili per le sostanze chimiche
 - Caratteristiche chimico-fisiche, tossicologiche ed eco tossicologiche
 - Gestione delle banche dati Cancerogeni, Sensibilizzanti e Bonifiche per gli aggiornamenti tecnico-scientifici.
- Valutazione del pericolo delle sostanze chimiche
 - Partecipazione alle attività dei comitati tecnici dell'Agenzia Europea sulle sostanze chimiche (ECHA), in particolare ai fini della valutazione del rischio
 - Definizione di proposte per l'informazione del pubblico sui rischi chimici
 - Definizione delle caratteristiche di costruzione dell'*help desk* nazionale per l'applicazione del regolamento per la classificazione e etichettatura delle sostanze e delle miscele (CLP)
 - Funzionamento dell'*help desk* e individuazione delle problematiche di maggiore interesse da sottoporre a revisione.
- Buona Pratica di Laboratorio
 - Individuazione delle problematiche comuni alla applicazione dei Regolamenti 1907/2006 REACH e 1272/2008 CLP.

Risultati attesi nel triennio

- Formulazione di proposte di inserimento di sostanze chimiche prioritarie da inserire nel piano di azione e rotazione predisposto dall'ECHA.
- Rapporti di valutazione del pericolo per la salute umana delle sostanze assegnate all'Italia e definizione di proposte di restrizione.
- Gestione dell'*Help desk* CLP di supporto alle aziende per l'attuazione del Regolamento CLP
- Formazione di ispettori per l'implementazione del Regolamento REACH a livello nazionale e degli ispettori di Buona Pratica di Laboratorio.

Trasferibilità dei risultati

Aggiornamento normative nazionali, comunitarie, OCSE, ONU sulle sostanze chimiche.

Sostanze chimiche e loro impatto sulla salute umana con particolare riferimento alle esposizioni professionali

Il rischio chimico in ambito professionale è stato considerato dalla normativa vigente in materia di igiene e sicurezza sul lavoro da molti anni. Le sostanze chimiche quindi, devono essere oggetto di valutazione quando presenti a qualunque titolo sul posto di lavoro, sia quando siano coinvolte nel processo produttivo. La valutazione ha come conseguenza l'identificazione dei requisiti minimi che devono essere garantiti per la tutela della salute e della sicurezza dei lavoratori, nei confronti di possibili effetti dannosi da imputare ad attività lavorativa con esposizione professionale a sostanze chimiche.

I rischi per la salute sono causati da eventi che esprimono il loro effetto in modo diluito nel tempo, anche attraverso fenomeni di accumulo, e possono provocare l'insorgenza di malattie professionali. Per alcuni prodotti, in particolare quelli riconosciuti più pericolosi, sono stati stabiliti, da parte di alcuni organismi internazionali, dei valori limite di esposizione, detti TLV, in base a questi criteri, che sono delle indicazioni prudenziali suggerite da organizzazioni internazionali, viene stabilito quali siano le condizioni di lavoro che possono essere considerate sicure per la maggioranza dei lavoratori. Particolare attenzione viene oggi rivolta alle sostanze

chimiche con proprietà sensibilizzanti, infatti da una stima della WHO emerge che l'UE spende ogni anno 600 milioni di euro derivanti da malattie professionali della pelle.

Risultati attesi nel triennio

Nell'ambito della attività sopradescritta si descrivono i risultati che si vanno a perseguire:

- Individuazione delle malattie derivanti da esposizione professionale alle sostanze cancerogene (classificate dall'UE) riportanti le frasi di rischio R45 e R49, con particolare attenzione agli usi industriali e le malattie che sono sottoposte ad obbligo di denuncia così come previsto dalla normativa vigente
- individuazione delle sostanze sensibilizzanti classificate e loro ricaduta sulla salute in termini di malattie professionali
- supporto per l'individuazione dei livelli massimi di esposizione per alcune sostanze pericolose
- predisposizione di supporti informativi su malattie professionali e sensibilizzanti.

Trasferibilità dei risultati

Aggiornamento della normativa sulle malattie professionali.

Aggiornamento della normativa sui valori limite di esposizione negli ambienti di lavoro.

Studio degli effetti da esposizione ad alcol da solo e in combinazione con sostanze chimiche, nella donna e nel bambino. Aspetti clinici e sperimentali

I danni alcol correlati e l'esposizione a sostanze chimiche sono ormai divenuti problemi emergenti in ambito nazionale e internazionale. Il Piano propone quindi studi dedicati a questi aspetti con particolare attenzione alla salute della donna e del bambino, soggetti biologicamente più vulnerabili al danno organico.

Attualmente, ricercatori dell'ISS lavorano al Progetto collaborativo ISS/NIH: *Woman, health, alcohol. Risks and damages from alcohol in different woman ages: the role of abuse markers* per lo studio degli effetti clinici da esposizione ad alcol nella donna e nel bambino. Le ricerche svolte nell'ambito del Progetto ISS/NIH a partire dal 2004 in area clinica, biochimica, tossicologica, neurobiologica, hanno già fornito risultati significativi. Sulla base dei risultati ottenuti e delle sperimentazioni in corso, il piano 2009-2011 prevede lo sviluppo di studi clinici e sperimentali in ambito alcologico con particolare riguardo alle differenze di genere e agli effetti neurotossici nel bambino esposto ad alcol durante la gravidanza. Inoltre saranno sviluppati gli studi clinici e sperimentali relativi agli effetti dovuti all'esposizione a sostanze chimiche da sole e in concomitanza con alcol (es. esposizione a metanolo in abusatori di alcol) per la valutazione del pericolo e del rischio per la salute umana. Parte integrante del Piano è lo studio, messa a punto e valutazione diagnostica di bioindicatori di esposizione.

Risultati attesi nel triennio

Il Piano si basa sull'esistente nucleo di collaborazione scientifica a struttura multidisciplinare che da alcuni anni è attivo nelle ricerche sul problema alcol. Da tale struttura ad approccio scientifico complesso, si attendono i seguenti risultati nel triennio 2009-2011:

- miglioramento delle conoscenze in ambito alcologico con studi ad elevata specializzazione su popolazioni selezionate di pazienti
- miglioramento delle conoscenze degli effetti di esposizione a sostanze chimiche da sole e in concomitanza con etanolo
- individuazione di indicatori biochimici per la valutazione dei pericoli e per la caratterizzazione del rischio per la salute nei soggetti esposti
- utilizzo dei dati sperimentali a sostegno di programmi di prevenzione particolarmente indirizzati alla salute della donna e del bambino
- promozione dell'offerta formativa con Corsi di formazione multidisciplinari.

Trasferibilità dei risultati

La trasferibilità dei risultati è uno degli obiettivi primari del Piano 2009-2011, in particolare per quanto riguarda:

- applicazione nella diagnostica di nuovi indicatori biochimici di esposizione e di effetto;
- introduzione di procedure analitiche nuove e/o migliorate messe a punto nel corso degli studi;
- approntamento di protocolli di studio per indagini epidemiologiche sul consumo di alcol in gravidanza;
- organizzazione e partecipazione ad attività formative e informative sulle tematiche oggetto della ricerca.

**Centro Nazionale
Sostanze Chimiche**

Attività di controllo, valutazione, parere

Aggiornamenti di normative (OCSE e UE)

Il CSC partecipa con propri rappresentanti alle attività di aggiornamento e adeguamento tecnico di diverse normative comunitarie sui prodotti chimici (regolamento REACH, regolamento classificazione ed etichettatura sostanze e miscele, direttiva biocidi), e partecipa alla definizione ed aggiornamenti delle linee guida OCSE.

Piano triennale

Nel prossimo triennio si prevede una intensa attività di adeguamento tecnico sia del regolamento REACH (inserimento sostanze altamente preoccupanti in Allegato XIV, inserimento nuove restrizioni in Allegato XVII, revisione Linee Guida), che del regolamento 1272/2008 sulla classificazione/etichettatura (adeguamento lista sostanze classificate, adeguamento criteri di classificazione). Per quanto riguarda la direttiva 98/8/CE sui prodotti biocidi, nel prossimo triennio il CSC parteciperà all'attività di inclusione delle sostanze attive nell'Allegato I alla Direttiva, nonché al processo di revisione della direttiva stessa.

Attività di valutazione della documentazione presentata a supporto delle domande di registrazione dei prodotti fitosanitari

Il CSC partecipa con propri rappresentanti alle attività 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.

Piano triennale

Nel prossimo triennio si prevede di proseguire nell'attività già in corso. In particolare l'attività dovrà essere rifocalizzata in funzione dell'entrata in vigore della nuova regolamentazione comunitaria sui prodotti fitosanitari.

Attività ispettiva e di controllo

Il CSC partecipa alle attività ispettive organizzate dall'Autorità centrale, che nel campo delle sostanze chimiche è il 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.

Piano triennale

Nel prossimo triennio si prevede un forte incremento di attività ispettive, che verranno svolte d'intesa con le strutture periferiche, in base ad un recente accordo con le Regioni. Le ispezioni riguarderanno principalmente la corretta applicazione dei regolamenti REACH e classificazione/etichettatura. Il CSC avrà anche un ruolo importante nel processo di formazione degli ispettori provenienti dalle strutture periferiche dell'SSN.

Coordinamento nazionale in ambito UE dello sviluppo/aggiornamento delle linee guida di saggio per prodotti chimici

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.

Piano triennale

Nel prossimo triennio si prevede un incremento dell'attività di definizione e aggiornamento dei metodi di saggio, anche in considerazione della modifica recentemente avvenuta dei criteri di classificazione delle sostanze e delle miscele.

Elaborazione di monografie di valutazione di biocidi già presenti in commercio

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 Salute.

Piano triennale

Nel prossimo triennio si prevede la conclusione dell'attività di revisione delle sostanze attive. 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.

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

Il CSC partecipa con propri esperti alle attività ispettive atte a certificare i laboratori in grado di svolgere test non clinici in regime di buona pratica di laboratorio, condizione essenziale per l'accettabilità dei dati prodotti.

Piano triennale

Si prevede nel prossimo triennio un incremento di attività ispettive, tenuto conto del prevedibile incremento di domanda di studi in regime BPL finalizzati a supportare le imprese negli adempimenti legati al regolamento REACH, nonché alla revisione di diversi metodi di prova dovuta all'entrata in vigore dei nuovi criteri di classificazione di cui al regolamento 1272/2008(CLP).

Partecipazione come esperti/delegati ad attività OECD nell'ambito dell'Environment Directorate

Il CSC partecipa con propri esperti alle attività della *Task Force on Hazard Evaluation*, alla *Task Force on Exposure Assessment*, alla *Task Force on Biocides* e ai *SIDS Initial Assessment Meetings* (SIAM).

Piano triennale

Per il prossimo triennio si prevede di proseguire nell'attività, che verrà sempre più integrata con l'attività svolta in ambito UE sulle sostanze chimiche in applicazione del regolamento REACH.

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 Antiveleni per la gestione delle intossicazioni acute. Il CSC esprime pareri su situazioni di rischio potenziale legate all'uso di sostanze chimiche.

Piano triennale

Si prevede di proseguire nell'attività già intrapresa, tenuto conto anche delle novità introdotte dai regolamenti REACH e CLP.

Centro
per la ricerca e la valutazione dei prodotti immunobiologici

Attività di ricerca

Valutazione esterna di qualità (VEQ) delle tecniche diagnostiche di amplificazione genomica (NAT) finalizzate alla qualificazione biologica dei prodotti ad uso trasfusionale (sangue, emocomponenti, prodotti plasma derivati), programma 2008-2009-2010

La ricerca degli acidi nucleici virali nel plasma, mediante tecniche di amplificazione genica (NAT) rappresenta un valido strumento per ridurre il rischio di trasmissione virale attraverso l'uso del sangue e suoi derivati.

L'impiego dei kit commerciali, standardizzati e convalidati dal produttore e che presentano elevate performance in termini di sensibilità e specificità, ha contribuito enormemente all'armonizzazione dei risultati tra i laboratori riducendo al minimo il rischio di errore da parte dell'operatore. Tuttavia i laboratori devono continuamente verificare la qualità delle proprie tecniche diagnostiche attraverso la partecipazione a programmi ufficiali di Valutazione Esterne di Qualità (VEQ).

Con il presente progetto è stato istituito un programma VEQ sulle metodiche diagnostiche NAT per la ricerca di HCV, HIV e HBV, destinato a tutte le Strutture Trasfusionali italiane.

Il progetto si articolerà nel seguente modo:

- pianificazione dello studio, organizzazione dei pannelli e stesura delle note informative e modulistica;
- selezione dei campioni positivi titolati in UI/mL per l'allestimento del pannello;
- saggi pilota per la ricerca della diluizione ottimale dei campioni positivi;
- produzione dei pannelli e verifica analitica;
- confezionamento e distribuzione con corriere dedicato ai laboratori (due invii per anno);
- raccolta ed elaborazione dei dati e stesura di un report annuale da distribuire ai partecipanti.

Risultati attesi nel triennio

Il presente progetto ha lo scopo di fornire alle Strutture 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, ed in particolare di conoscere i limiti della metodica NAT impiegata;
- 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.

Approcci innovativi ad un vaccino antinfluenzale: produzione in cellule di insetto

La maggior parte dei vaccini antinfluenzali sono prodotti in uova embrionate di pollo e sono costituiti da virus intero inattivato, da virus frammentato o dalle proteine di superficie HA e NA. Tali vaccini sono soggetti alla disponibilità di uova, che limita la quantità di vaccino producibile, e all'esigenza di un aggiornamento annuale della composizione a causa dell'elevata variabilità della HA e NA. Inoltre hanno limitata efficacia verso ceppi influenzali non direttamente correlati.

Recentemente sono stati prodotti vaccini antinfluenzali in cellule eucariotiche di mammifero che, pur permettendo di ottenere elevate rese, presentano il rischio di contaminazione con virus avventizi.

Studi recenti hanno mostrato la possibilità di esprimere proteine del virus dell'influenza in cellule di insetto, usando il baculovirus come sistema di espressione. La produzione di un vaccino influenzale con questa tecnologia avrebbe il vantaggio di presentare un ridotto rischio di eventuali virus avventizi, anche perché la loro coltivazione non richiede l'uso di siero bovino. La necessità dell'aggiornamento annuale della composizione del vaccino potrebbe essere superata attraverso l'uso di proteine virali altamente conservate tra i differenti sottotipi, le proteine interne M1, M2 e NP.

Questo progetto si propone di sviluppare un vaccino antinfluenzale innovativo mediante l'espressione delle proteine HA, M e NP in cellule di lepidottero usando un vettore di espressione baculovirale.

Risultati attesi nel triennio

La scelta del sistema di espressione baculovirus/cellule d'insetto permetterà di ottenere un vaccino caratterizzato da alte rese proteiche, senza i problemi collegati alla crescita in uova o in cellule di mammifero. Inoltre l'uso di proteine altamente conservate permetterà di ottenere un vaccino capace di conferire una più ampia protezione, anche contro ceppi influenzali non strettamente correlati a quello vaccinale.

Trasferibilità dei risultati

I risultati verranno trasferiti alla comunità scientifica nazionale e internazionale attraverso congressi e pubblicazioni su riviste scientifiche *peer-reviewed*.

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*, in collaborazione con i "Laboratori della Leptosirosi" operanti presso strutture universitarie, ospedaliere e di prevenzione in Ancona, Bari, Messina, Palermo, Parma, Pavia, Roma, Torino, Trieste e Verona, che fungono da Laboratori di riferimento regionali. Il sistema di sorveglianza prevede: i) la conferma sierologica dei casi di sospetta leptosirosi segnalati dalle unità ospedaliere, mediante il metodo di riferimento (microagglutinazione-MAT con leptospire vive); ii) la raccolta e la caratterizzazione molecolare ad antigenica dei ceppi isolati dai pazienti al fine di identificare i *serovar* circolanti sul territorio nazionale; iii) indagini epidemiologiche nel campo delle infezioni umane o animali da *Leptospira* mirate. Allo scopo di rendere efficace e completa la sorveglianza è indispensabile da parte del Centro Nazionale per le Leptosirosi:

- raccogliere ed elaborare su base nazionale i dati clinici sierologici ed epidemiologici relativi ai casi di leptosirosi umana;
- identificare a livello di sierogruppo e serovar i ceppi di *Leptospira* isolati da casi clinici, da animali, e da acque superficiali o altri campioni ambientali, provenienti dai diversi "Laboratori della Leptosirosi" o da altri enti;
- caratterizzare a livello della struttura molecolare sia i ceppi di leptospire di origine italiana che i ceppi tipo necessari per la loro identificazione;

- confermare in laboratorio i casi di sospetta leptospirosi segnalati da unità ospedaliere di Regioni italiane prive di un Laboratorio della Leptospirosi;
- verificare se la batteria di ceppi utilizzata nella MAT in Italia per la sierodiagnosi della leptospirosi è ancora adeguata o se c'è stata una eventuale introduzione di ceppi “nuovi” per il territorio;
- valutare la sensibilità e la specificità di tecniche diagnostiche commerciali al fine di identificare quelle più idonee al territorio;
- promuovere il controllo di qualità dei Laboratori della Leptospirosi che collaborano con l'ISS alla sorveglianza della Leptospirosi umana;
- Mantenere i contatti con gli analoghi centri operanti negli altri Paesi e partecipare al sistema di sorveglianza a livello europeo ed extraeuropeo.

Risultati attesi nel triennio

- Confermare in laboratorio con gli opportuni metodi diagnostici i casi di sospetta leptospirosi
- Identificare a livello di sierogruppo e serovar (mediante caratterizzazione fenotipica e genotipica) i ceppi di *Leptospira* isolati da casi clinici al fine di individuare i *serovar* circolanti in Italia e causa di infezione nell'uomo
- Verificare se la batteria di ceppi utilizzata nella MAT in Italia per la sierodiagnosi della leptospirosi è ancora adeguata o se c'è stata una eventuale introduzione di ceppi “nuovi” per il territorio
- Valutare la sensibilità e la specificità di tecniche diagnostiche commerciali al fine di identificare quelle più idonee al territorio
- Promuovere il controllo di qualità dei Laboratori della Leptospirosi che collaborano con l'ISS alla sorveglianza della Leptospirosi umana
- Mantenere i contatti con gli analoghi centri operanti negli altri Paesi e partecipare al sistema di sorveglianza a livello europeo ed extraeuropeo.

Trasferibilità dei risultati

Attraverso la conferma (con gli opportuni metodi diagnostici) dei casi clinici sospetti, l'identificazione dei *serovar* infettanti, la raccolta e l'elaborazione dei dati clinici, epidemiologici e sierologici dei casi identificati è possibile costruire l'epidemiologia nazionale della leptospirosi ed afferire al sistema di sorveglianza mondiale.

Attraverso la valutazione della sensibilità e specificità di kit ELISA reperibili in commercio (differenti sia per tipo di antigene(i) utilizzato(i) che per metodo di preparazione) è possibile identificare quelli più idonei al territorio e fornire un servizio al sistema sanitario nazionale.

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 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. Annualmente, i rotavirus causano negli USA 3,5 milioni di casi di diarrea, 0,5 milioni di visite specialistiche e 55.000 ricoveri ospedalieri.

L'obiettivo del presente progetto è il monitoraggio dei tipi di rotavirus circolanti in Italia nel periodo precedente l'introduzione della vaccinazione. Questo, infatti, appare essere l'unico metodo per giudicare in merito alla congruità delle formule antigeniche dei vaccini da porre in commercio, per valutare quindi gli effetti della vaccinazione di massa sul pool di sierotipi di

rotavirus già circolanti e predisporre eventuali modificazioni delle formule antigeniche vaccinali, come già in atto per i vaccini influenzali.

Il progetto si propone di sorvegliare la diffusione dei diversi ceppi di rotavirus nella popolazione infantile da 0 a 5 anni attraverso lo studio di pazienti ospedalizzati o in day hospital per gastroenterite acuta. Nell'impossibilità di pervenire ragionevolmente all'eradicazione dell'infezione, l'obiettivo della vaccinazione è universalmente ritenuto essere la riduzione dei casi gravi di malattia e la necessità di ricorso a cure mediche. La popolazione ospedalizzata appare pertanto il target più idoneo dell'attività di sorveglianza, rappresentando i casi di infezione con ceppi di rotavirus ad alta patogenicità. Al fine di evidenziare eventuali differenze epidemiologiche legate alla geografia nazionale, è prevista la creazione di 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 centri ospedalieri pediatrici per la ricerca attiva di soggetti ospedalizzati per gastroenterite (GE) acuta. I centri arruolati dovranno essere dotati di laboratorio virologico al fine di espletare la diagnostica di primo livello, con kit commerciali, mentre la genotipizzazione dei ceppi di rotavirus sarà eseguita di regola presso il laboratorio centrale dell'ISS; in casi particolari di esperienza consolidata, la caratterizzazione molecolare dei virus sarà condotta presso i centri collaboranti. I dati epidemiologici e di caratterizzazione virale saranno elaborati e raccolti in un database centralizzato, presso l'ISS. La scelta dei centri collaboranti è stata effettuata in base sia alle competenze di medicina pediatrica che di laboratorio diagnostico virologico, arruolando strutture in grado di assicurare una attività di sorveglianza stabile dopo l'introduzione della vaccinazione, per almeno cinque anni dall'inizio del presente programma.

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 del Lavoro, 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*) che è 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 standards delle preparazioni di riferimento definite. Nell'ambito del 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*, insieme ai corrispondenti 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

Questo progetto (BSP090), promosso dal Programma di Standardizzazione dei Prodotti Biologici dell'EDQM (*European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare*), ha lo scopo di stabilire preparazioni biologiche di riferimento (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 3 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 II del progetto: due sistemi per Bet v 1 e uno per Phl p 5a. L'obiettivo dello studio in fase II 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 secondo la Farmacopea Europea, su larga scala, 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.

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)

Responsabile del progetto: Dr. Stefan Vieths, Paul Ehrlich Institut, Germany.

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*) che è 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. Nell'ambito del 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*, insieme ai corrispondenti 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 dallo IUIS, nel gennaio 2006 il Comitato Direttivo del "Programma di Standardizzazione dei Prodotti Biologici" ha approvato il progetto BSP090.

Risultati attesi nel triennio

Questo progetto (BSP090), promosso dal Programma di Standardizzazione dei Prodotti Biologici dell'EDQM (*European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare*), ha lo scopo di stabilire preparazioni biologiche di riferimento (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 3 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 II del progetto: due sistemi per Bet v 1 e uno per Phl p 5a. L'obiettivo dello studio in fase II 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 secondo la Farmacopea Europea, su larga scala, 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.

Identificazione e valutazione di nuove sostanze con potenziale attività antivirale nei confronti di virus responsabili di malattie del tratto respiratorio nell'uomo

Lo spettro dei virus responsabili di malattie del tratto respiratorio o associati ad esse si è arricchito negli ultimi anni con l'identificazione di nuovi agenti patogeni quali i metapneumovirus, i poliomavirus, i coronavirus, i mimivirus ecc. Malgrado in soggetti sani e immunocompetenti i farmaci antivirali forniscano benefici clinici limitati, nel caso di soggetti immunocompromessi o pazienti trapiantati la disponibilità di una terapia antivirale può risultare critica. Tuttavia, al momento, gli antivirali utilizzabili contro questi agenti patogeni sono molto limitati quando non inesistenti, ed è pertanto necessario individuare nuove sostanze con efficace attività antivirale. Un possibile approccio è rappresentato dalla identificazione, in proteine di virus respiratori, di regioni che possano essere il bersaglio di farmaci antivirali il cui meccanismo di azione sia noto. Un esempio in questo senso è rappresentato dal coronavirus della SARS, la cui proteasi 3CLpro è risultata sensibile all'azione dei farmaci inibitori delle proteasi antiretrovirali. Questo progetto si propone, a partire da tecniche di *molecular modelling* e *docking*, di effettuare uno screening iniziale delle proteine di alcuni patogeni respiratori, in particolare i metapneumovirus, e delle loro possibili interazioni con farmaci antivirali *in silico*, che sarà poi seguito da una valutazione *in vitro*, ed eventualmente *in vivo*, dell'effetto inibente la replicazione virale delle sostanze più promettenti.

Risultati attesi nel triennio

- Identificazione di regioni di proteine virali come possibili target di farmaci antivirali mediante analisi di omologia della struttura proteica sia primaria che terziaria, e verifica della potenziale azione antivirale mediante *docking* molecolare.
- Valutazione dell'attività antivirale delle sostanze più promettenti in colture cellulari e, nel caso di esito positivo, in modelli animali.

Trasferibilità dei risultati

I risultati verranno trasferiti alla comunità scientifica nazionale e internazionale attraverso congressi e pubblicazioni su riviste scientifiche *peer-reviewed*. La sostanza ad attività antivirale più promettente sarà proposta per la procedura di brevetto da parte dell'ISS.

Implementazione e validazione dei saggi analitici per il controllo di stato di nuovi vaccini glicoconiugati anti-meningite ACWY

Il vaccini anti-meningococco attualmente presenti sul mercato internazionale si basano sulla protezione indotta dal polisaccaride di uno o più tipi di *Neisseria meningitidis* (C, A, W135, Y). Il principio attivo di questi vaccini è costituito dai polisaccaridi purificati, oppure da glicoconiugati contenenti gli oligosaccaridi del meningococco legati a proteine *carrier*. In Europa soltanto il glicoconiugato anti meningococco gruppo C è disponibile attualmente sul mercato, mentre è in fase di registrazione all'EMA un vaccino glicoconiugato tetravalente (A, C, W135 e Y) prodotto in Italia. Per questo nuovo vaccino, l'ISS e NIBSC (UK) sono le due *Official Medicines Control Laboratory* (OMCL) ufficialmente preposte per il *batch release* in Europa, in accordo con gli art. 111 (1), 113, 114(1)-(2) e 115 della Direttiva 2001/83/EC.

Nella Farmacopea Europea, allo stato attuale, non esiste nessuna monografia specifica che contempli i vaccini glicoconiugati meningococcici tetravalenti, per cui il controllo di questo vaccino dovrà essere eseguito inizialmente secondo i saggi previsti dalla Ditta e riconosciuti nelle fasi di registrazione del vaccino.

Risultati attesi nel triennio

Messa a punto di tutti i saggi analitici approvati per il controllo della qualità del vaccino glicoconiugato tetravalente anti-meningococco ACWY, d'accordo con i protocolli forniti dalla Ditta.

Validazione di tutti i metodi analitici previsti, che sarà eseguita d'accordo con le apposite linee guide ICH Q2.

Tutta questa attività sarà documentata attraverso la elaborazione delle apposite Procedure Operative Standard, Protocolli di validazione e Rapporti di validazione.

L'implementazione e la validazione dei saggi analitici dovrà avvenire in anticipo rispetto alla registrazione del vaccino, per far sì che, una volta concluse le fasi di approvazione e registrazione del nuovo vaccino, l'OMCL italiano possa essere operativo già dai primi lotti che verranno prodotti per il mercato europeo.

Trasferibilità dei risultati

I saggi analitici saranno impiegati per il batch release del vaccino glicoconiugato tetravalente anti-meningococco ACWY prodotto in Italia.

L'immissione nel mercato di questo nuovo vaccino richiederà l'elaborazione di una monografia della Farmacopea Europea specifica per questa tipologia di vaccini, che dovrà contenere l'informazione sui saggi analitici essenziali per il controllo. L'esperienza sviluppata nel nostro laboratorio sul controllo di questo nuovo vaccino (sono solo due gli OMCL designati al controllo) darà un contributo alla stesura di questa monografia.

La Banca Dati delle Sostanze Chimiche Sensibilizzanti (BDS)

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 Unione Europea (nell'ambito della Direttiva 67/548/CEE), sostanze classificate come tali da enti con competenza di valutazione del rischio per l'ambiente di lavoro (es. ACGIH e DFG) o anche in generale sostanze esaminate da istituzioni sia governative (US NTP) che di settore (ETAD, 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

Fruibilità della Banca Dati sul sito web dell'ISS e quindi disponibilità delle informazioni presenti nella Banca Dati stessa sia per la comunità scientifica che per le industrie.

Trasferibilità dei risultati

SSN, informazioni per il personale esposto a rischio professionale, informazioni per le industrie.

Laboratory support for virological investigation on acute flaccid paralysis cases in: Italy, Albania, Bosnia, Bulgaria, Greece, Kosovo, Serbia & Montenegro, Macedonia, Malta and Montecarlo

Il progetto prevede il coordinamento della sorveglianza attiva delle paralisi flaccide acute (AFP) in Italia e il supporto virologico a nove Paesi del sud-est europeo, quale centro di riferimento 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 0 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 Salute e della 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 riferimento 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.

Metodo alternativo per la determinazione dell'attività biologica dei vaccini anti pertosse cellulare

I vaccini anti pertosse costituiti da una sospensione inattivata di *Bordetella pertussis* (pertosse cellulare) continuano ad essere prodotti in parallelo a quelli anti "pertosse acellulari" che comprendono solo alcuni antigeni purificati del batterio. I vaccini "pertosse cellulari" sono utilizzati nei Paesi del terzo mondo dato il loro costo più basso. Questi vaccini vengono controllati per la loro attività biologica sia dal produttore che da un'autorità di controllo. L'attività si determina confrontando la dose di vaccino necessaria a proteggere i topi dagli effetti di una dose letale di batterio, somministrata per via intracranica (Kendrick's test), con una preparazione di riferimento, necessaria per ottenere la stessa protezione. Scopo di questo studio è sostituire la seconda parte del saggio di attività (*challenge* intracranico) con un metodo

sierologico mediante il quale determinare gli anticorpi anti *B. pertussis*. Inoltre lo studio è in accordo con i principi della “*European Convention on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes*” e della Farmacopea Europea che richiedono di “*refine, reduce or replace*” l’uso degli animali nel controllo dei farmaci. Inoltre è anche in accordo a livello nazionale con le finalità della *Italian Platform on Alternative Methods*.

Il progetto vedrà coinvolto ISS come Responsabile insieme al *Netherland Vaccine Institute* e *European Directorate for the Quality of Medicine*.

Risultati attesi nel triennio

Tutta la sperimentazione dovrà essere eseguita in un sistema di assicurazione di qualità (Norma ISO CEI 17025) come si confà ad un laboratorio che esegue per suo compito i controlli di stato dei vaccini batterici e per poter trasferire i dati come sotto indicato.

Durante una prima fase si valuterà la presenza di una curva dose risposta immunizzando le cavie (anziché i topi, come nel modello di Kendrick) con tipologie diverse di vaccini anti pertosse combinati non solo nella maniera classica con difterite e tetano, ma anche con il vaccino anti emofilo di tipo b, anti epatite B o anti polio e un vaccino di riferimento.

Si valuterà quindi la possibilità di calcolare la potenza e la sua correlazione con il test classico. Si raccoglieranno i dati circa la possibilità di usare una sola scheda di immunizzazione per i diversi tipi di vaccini. Si procederà nello stesso tempo alla convalida del metodo ELISA secondo le linee guida ICH.

Se i risultati saranno favorevoli, si stileranno le procedure operative per le diverse fasi dello studio (stabulazione e immunizzazione delle cavie, anestesia e prelievo dei sieri, saggio ELISA, calcoli) e si valuterà il trasferimento del metodo di determinazione dell’attività biologica della componente pertossica ad altri laboratori. Solo così sarà possibile valutare la riproducibilità del metodo e quindi la sua adeguatezza per lo scopo prefissato.

Trasferibilità dei risultati

Elaborazione di un protocollo per l’esecuzione del saggio di attività biologica del vaccino anti pertosse cellulare in alternativa al Kendrick’s test da proporre alla Commissione della Farmacopea Europea. Infatti l’obiettivo è quello di mettere a punto un saggio per la determinazione della *potency* del wP da utilizzarsi durante la fase di *Batch Release* di un vaccino da parte degli *Official Medicine Control Laboratory*, e da parte delle ditte produttrici di vaccino, una volta che è stata dimostrata *consistency* nella produzione.

MVP PsA-TT-004 Valutazione della Risposta Immunitaria a Vaccini EPI

Il Progetto sul Vaccino per la Meningite (MVP), svolto attraverso la collaborazione tra la WHO e il PATH, è stato avviato nel 2001, grazie ad un finanziamento della fondazione “*Bill and Melinda Gates*” al fine di eliminare le epidemie di meningococco nell’Africa sub-sahariana, attraverso lo sviluppo e l’uso di vaccini per il meningococco coniugati. Il meningococco di sierogruppo A è l’agente eziologico predominante delle epidemie da meningite nell’Africa sub-sahariana.

Il vaccino candidato PsA-TT, prodotto dal “*Serum Institute of India*” (SIIL), è un vaccino composto dal sierogruppo A di meningococco *Neisseria meningitides*, esattamente dal polisaccaride del capsido (PsA) coniugato con una proteina carrier dal tossoide tetanico (TT). Essendo il PsA-TT un vaccino coniugato, si prevede che conferisca un’immunità di lunga durata e una *boostable memory response* più efficace rispetto al vaccino polisaccaridico non coniugato. Il vaccino in studio PsA-TT, serve per la prevenzione della malattia da meningococco di sierogruppo A *N. meningitidis*, in Africa, dove la malattia è endemica e causa periodicamente grandi epidemie di meningite acuta. La popolazione target è rappresentata da bambini, adolescenti e adulti.

Lo studio MVP PsA-TT-004 ha lo scopo di valutare la sicurezza e l'immunogenicità di tre dosaggi differenti di vaccino PsA-TT somministrati in due dosi, a 14 settimane e nove mesi, in concomitanza con i vaccini e la schedula vaccinale prevista per l'*Expanded Programme on Immunization* (EPI), usata correntemente in Ghana. Quest'ultima include tre dosi di vaccino polio orale di Sabin OPV + i vaccini DTwPHibHBV che vengono somministrati a 6, 10 e 14 settimane di età, una dose di vaccino contro la Febbre Gialla e una di Morbillo somministrati a nove mesi. A 12 e 18 mesi di età, è prevista anche la somministrazione di una dose *booster* di vaccino DTPwPHibHBV, correntemente non usato nel programma EPI del Ghana.

Lo studio in Italia è condotto in collaborazione con l'Università di Siena. In particolare, l'ISS esaminerà circa 900 sieri per valutare la risposta anticorpale verso il vaccino antipolio orale di Sabin, mentre il Laboratorio di Epidemiologia Molecolare dell'Università di Siena effettuerà le indagini per gli altri antigeni. Il Reparto Vaccini virali del CRIVIB è stato scelto perché è un Centro Regionale di Referenza WHO per la polio.

Risultati attesi nel triennio

L'obiettivo dello studio è di valutare l'immunogenicità dei vaccini EPI, e identificare possibili interferenze provocate dal vaccino PsA-TT quando somministrato in concomitanza con essi; effettuare test sierologici per valutare la risposta immunitaria verso i singoli antigeni dei vaccini EPI (difterite, tetano, pertosse cellulare, morbillo, polio Tipo 1, Tipo 2 e Tipo 3, Febbre Gialla, Hib, e Epatite B) su campioni di siero ottenuti dai soggetti arruolati nel lo studio MVP PsA-TT-004. Lo studio sarà effettuato secondo protocolli e tempi stabiliti dalla WHO e dal PATH. I risultati dei saggi saranno trasferiti dai laboratori (ISS e Università di Siena) che effettuano le indagini sierologiche ad un database predisposto dal PATH.

Trasferibilità dei risultati

I risultati dello studio saranno inviati alla WHO e al PATH e daranno informazioni sull'efficacia del vaccino PsA-TT in termini di stimolazione della risposta anticorpale indotta dai singoli antigeni e la possibile interferenza con i vaccini previsti dal programma EPI.

I risultati saranno pubblicati su riviste scientifiche.

Ottimizzazione e validazione di un test ELISA per la determinazione quantitativa di anticorpi anti-pertosse in sieri di cavia immunizzate con vaccini antipertosse cellulare per uso umano

In base a direttive europee per la difesa degli animali da laboratorio, si sollecitano studi alternativi per sostituire metodi di indagine *in vivo* dei sistemi biologici con metodi *in vitro*. Per esempio, il saggio di *potency* per la componente pertossica nei vaccini batterici combinati DTwP per uso umano contenenti cellule intere di *Bordetella pertussis* (wP) prevede l'esecuzione di un test *in vivo* di protezione su topo, il Kendrick Test (KT). Recentemente, in alternativa al KT, è stato proposto un test ELISA per dosare la risposta anticorpale verso cellule intere di *B. pertussis* in sieri di topo immunizzati con vaccini combinati. Questo test non è stato ancora validato e sono stati fatti studi iniziali per applicarlo anche ai sieri di cavia.

Lo scopo di questo progetto è ottimizzare e validare tale metodo ELISA e in particolare standardizzare il processo di preparazione di una coltura di *B. pertussis* da usarsi come antigene per il *coating* delle piastre ELISA, per determinare l'attività biologica di vaccini anti wP mediante lo studio della risposta anti pertosse cellulare. La validazione del metodo seguirà le indicazioni dettate dalle linee guida dell'EMA, *Validation of Analytical Procedures ICH Topic Q2A e Q2B*. Il disegno dello studio prevede la definizione di un protocollo di lavoro per la preparazione della formulazione antigenica idonea per il *coating*, il *coating optimization*, la preparazione e conservazione in aliquote di reagenti e soluzioni di riferimento. Lo studio verrà realizzato in collaborazione con altri laboratori europei per dimostrare la riproducibilità del metodo.

Risultati attesi nel triennio

Ottimizzare e standardizzare un metodo di produzione ed inattivazione della coltura di *B. pertussis* da utilizzare nell'ELISA come coating antigen. Le preparazioni antigeniche prodotte con questo metodo nei diversi laboratori coinvolti nello studio saranno confrontate per verificare la omogeneità fra le varie preparazioni e confermare così l'idoneità del metodo e la sua applicabilità a qualsiasi laboratorio interessato.

Creare un metodo sensibile e specifico per la determinazione quantitativa del titolo anti pertossico cellulare che non risenta di eventuali cross reazioni. Determinare la precisione (ripetibilità e precisione intermedia) del metodo, la riproducibilità del dato fra i vari laboratori partecipanti nelle specifiche condizioni di lavoro di ciascuno e la sua robustezza.

Trasferibilità dei risultati

Il metodo ELISA per la determinazione degli anticorpi anti *B. pertussis* in cavie immunizzate con vaccini wP, dopo validazione, potrebbe essere proposto per l'inserimento in Farmacopea Europea come metodo alternativo al KT per la determinazione della potenza vaccini anti pertosse cellulari.

La validazione di un metodo di preparazione antigenica che possa essere applicato indistintamente in qualsiasi laboratorio fornirà ai vari *Official Medicine Control Laboratory* un efficace strumento per adottare in autonomia il test sierologico alternativo nel rispetto dell'enunciato delle 3R (*Refinement, Reduction and Replacement*).

Progetto giovani ricercatori: "A novel acellular support in antitumour and antiviral innate immunity: human Natural Killer cells-derived microvesicles" (UO2)

Il progetto ha lo scopo di caratterizzare e valutare l'attività antivirale e antitumorale di esosomi derivati da cellule NK (NKEXO), che sia essa di tipo citolitico o antiproliferativo o immunomodulatorio. Il progetto si propone inoltre di indagare la possibilità di isolare, direttamente da cellule NK purificate, e caratterizzare le microvesicole di origine endolisomale (NKEL), per le quali esistono evidenze preliminari che siano precursori degli esosomi. Nell'ambito del progetto la nostra unità operativa avrà il compito di indagare la presenza di NKEXO in plasma umano ottenuto da donatori sani, nonché da pazienti HIV, HCV o HBV positivi. Una volta isolati, gli esosomi verranno caratterizzati, valutando in particolare ogni eventuale differenza tra pazienti sani e pazienti infetti. Per questi ultimi, verrà quindi valutata ogni eventuale correlazione tra livello e attività degli NKEXO e stadio dell'infezione. La valutazione dell'attività degli NKEXO sarà effettuata *in vitro* utilizzando opportuni modelli di infezione. Inoltre saranno messi a punto e convalidati metodi per la quantificazione di NKEXO nel plasma umano.

Risultati attesi nel triennio

Indagini preliminari hanno rilevato la presenza di NKEXO nel plasma umano. Il progetto porterà alla caratterizzazione di tali esosomi, e alla individuazione delle differenze tra donatori sani e pazienti infetti da virus. Tali differenze sono attese, in virtù del differente stato di attività del sistema immunitario dei due gruppi di pazienti. Confidiamo inoltre nella convalida di un metodo quantitativo per la determinazione degli NKEXO nel plasma umano.

Trasferibilità dei risultati

La dimostrazione di una correlazione tra il profilo degli NKEXO e lo stato di progressione dell'infezione virale apre nuove prospettive per il follow up di pazienti infetti da HIB, HBV o HCV. Questo infatti può condurre all'identificazione di nuovi criteri per la valutazione del rischio di progressione dell'infezione virale in anticipo sulla comparsa dei primi sintomi clinici.

Ciò aiuterebbe una migliore definizione del tipo e delle modalità di trattamento a cui sottoporre il paziente.

Progetto: Malattie allergiche respiratorie: studio di monitoraggio delle linee guida GINA e ARIA. Sottoprogetto: Appropriatezza della diagnosi e dell'immunoterapia e qualità degli estratti allergenici disponibili in commercio

Nel settore delle patologie allergiche la diagnosi *in vivo* e l'immunoterapia specifica sono due aspetti importanti nella pratica clinica. Gli estratti allergenici utilizzati in diagnosi e in immunoterapia sono miscele complesse di molecole allergeniche e non. Sebbene sostanziali progressi siano stati fatti nel settore della standardizzazione e della qualità degli estratti allergenici negli ultimi 20 anni, ci sono ancora problemi legati alla variabilità di lotti diversi dello stesso prodotto e differenze fra le varie ditte produttrici. In tale contesto, il principale obiettivo di questo studio è la valutazione dell'appropriatezza della diagnosi e dell'immunoterapia in relazione alla qualità degli estratti allergenici utilizzati, attraverso un confronto dell'attività biologica delle preparazioni disponibili sul mercato in Italia.

Sulla base di iniziative simili condotte a livello europeo, tale progetto potrà contribuire al miglioramento dell'approccio diagnostico e immunoterapeutico della rinite e dall'asma allergico, secondo i requisiti delle linee guida GINA e ARIA, fornendo all'AIFA informazioni sulla qualità delle preparazioni commerciali (estratti allergenici) disponibili sul mercato italiano.

Risultati attesi nel triennio

Lo studio sarà condotto in collaborazione con le Unità cliniche afferenti al progetto, e sarà incentrato sull'impatto della qualità degli estratti allergenici commerciali sull'appropriatezza della diagnosi e dell'immunoterapia dei pazienti allergici. In una fase preliminare, saranno raccolte informazioni sulle preparazioni allergeniche per la diagnosi *in vivo*, l'immunoterapia sottocutanea (SCIT) e sublinguale (SLIT) per alcuni allergeni quali ad esempio gli acari. Le preparazioni disponibili in commercio in Italia, e le relative soluzioni in *bulk*, saranno richieste direttamente alle ditte farmaceutiche che le producono. Una serie di esperimenti saranno condotti per effettuare un confronto del contenuto proteico e allergenico dei prodotti, al fine di valutare la loro idoneità per l'uso, come ad esempio l'inibizione del legame delle IgE, la reattività con anticorpi monoclonali e policlonali, il contenuto proteico totale, le analisi in *skin prick test* (SPT) sui pazienti. Infine, i dati clinici (SPT) saranno confrontati con i dati di qualità ottenuti dall'analisi degli stessi prodotti.

Trasferibilità dei risultati

I dati ottenuti forniranno, in primo luogo, informazioni sulla qualità e l'eterogeneità dei prodotti disponibili in commercio e, in secondo luogo, informazioni sul potenziale impatto di tale qualità/eterogeneità sull'appropriatezza della diagnosi e dell'immunoterapia. Poiché sia la diagnosi *in vivo* che l'immunoterapia sono due importanti aspetti nella gestione del paziente allergico, le informazioni sulla qualità degli estratti commerciali disponibili possono essere di notevole utilità per migliorare l'appropriatezza diagnostica e terapeutica.

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 paralisi flaccida acuta (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 del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, 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 excretor*.

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.

Studio della risposta immune anti-tossoide difterico e anti-tossoide tetanico in cavie immunizzate con vaccini combinati contenti la componente pertosse cellulare

Negli ultimi anni il Consiglio di Europa e la Commissione Europea hanno promosso la realizzazione di diversi studi collaborativi riguardanti metodi serologici alternativi per la sostituzione dei tradizionali saggi di potenza dei vaccini difterici (D) e tetanici (T) basati sul *challenge in vivo*. È stato così dimostrato che la potenza dei vaccini D e T può essere determinata nello stesso gruppo di animali (cavie), riducendo così sia il numero di animali impiegati nel controllo, che la sofferenza inflitta loro. Questi nuovi saggi sono stati validati e incorporati nell'ultima Edizione della Farmacopea Europea come alternativa ai saggi di *challenge in vivo* per tutti i vaccini monovalenti o combinati contenenti le componenti D o/e T, ad eccezione di quelli che contengono anche le componenti pertosse cellulare (wP) e/o il coniugato del *Haemophilus type b*.

Dal 2005 Reparto Vaccini batterici è impegnato in progetti di ricerca riguardanti l'ottimizzazione di metodi serologici alternativi al “*Mouse protection test*” (MPT) o Kendrick test, che viene eseguito per il controllo della potenza dei vaccini contenenti la componente wP. Tutti i vaccini impiegati in questi studi contengono le componenti DT e vengono utilizzati per la produzione di sieri in cavie, sui quali si analizza la risposta immune anti-wP.

Lo scopo di questo studio è quello di determinare se è possibile stabilire un protocollo di immunizzazione che permetta la determinazione della potenza D e T attraverso metodi serologici in vaccini combinati contenenti anche la componente wP.

Risultati attesi nel triennio

In una prima fase del progetto si pretende verificare se è possibile ottenere una dose-risposta per le componenti D e T in sieri di cavie immunizzate anche con wP. A questo scopo, gruppi di cavie saranno immunizzati con diversi vaccini combinati contenenti almeno le componenti DTwP. Il range di dosi vaccinali utilizzato sarà ampio allo scopo di poter individuare anche una dose-risposta per la componente wP.

I risultati ottenuti saranno utilizzati per l'ottimizzazione del protocollo d'immunizzazione da applicare successivamente per le immunizzazioni di cavie con altri vaccini DTwP, allo scopo di ottenere, nei sieri degli stessi animali, dosi-risposte anticorpali idonee per il calcolo della potenza di questi tre componenti vaccinali. Tutte le risposte serologiche saranno misurate in ELISA e i dati ottenuti utilizzati per il calcolo delle relative potenze mediante Combistat.

Nelle due fasi dello studio è prevista la collaborazione con altri laboratori esteri che contribuiranno nelle fasi di preparazione dei sieri immuni.

Trasferibilità dei risultati

L'implementazione di un protocollo di immunizzazione comune per le componenti D e T dei vaccini DTwP per la determinazione serologica della potenza di questi due componenti permetterebbe di ridurre il numero di animali utilizzati nei test di routine per il *batch release* di questo tipo di vaccini. Inoltre, l'utilizzo di questi metodi alternativi potrebbero rappresentare uno strumento utile per lo studio della *consistency* della produzione.

Questo beneficio si incrementerebbe ulteriormente qualora anche la potenza della componente wP potesse essere calcolata serologicamente negli stessi animali utilizzando lo stesso protocollo di immunizzazione.

Tecniche di Amplificazione Genica : sviluppo e titolazione delle preparazioni di riferimento HCV RNA HIV RNA HBV DNA, WNV RNA e di un pannello per HBV DNA

Questo progetto affronta il problema della standardizzazione delle tecniche di amplificazione genica (*nucleic-acid amplification techniques*, NAT) applicate alla ricerca dei virus HCV, HIV, HBV e WNV nel plasma. In particolare il progetto si focalizzerà sui seguenti aspetti:

- Sviluppo di Preparazioni di Riferimento nazionali per HCV RNA, HIV RNA e HBV DNA da impiegare nei saggi di amplificazione genica. Le preparazioni saranno titolate in UI/mL contro i rispettivi Standard Internazionali attraverso studi collaborativi che coinvolgeranno alcune Strutture Trasfusionali.
- Collaborazione con le Strutture Trasfusionali al fine di definire: i) una concentrazione virale per i Controlli Esterni di Qualità; ii) un protocollo standardizzato per la preparazione di Controlli Esterni di Qualità.
- Sviluppo e titolazione in di una preparazione nazionale per il *West Nile Virus* attraverso uno studio collaborativo con alcune Strutture Trasfusionali sul territorio nazionale.
- Sviluppo e titolazione in UI/mL di un pannello di campioni HBV DNA contro lo Standard Internazionale attraverso uno studio mini-collaborativo.

Risultati attesi nel triennio

Gli obiettivi del presente studio sono i seguenti:

- Fornire alle Strutture Trasfusionali preparazioni di riferimento per HCV, HIV, HBV, WNV da impiegare nella convalida dei metodi NAT, nella convalida degli operatori o come Controlli Esterni di Qualità a titolo noto da impiegare nelle sedute analitiche al fine di monitorarne la performance e la competenza degli operatori.
- Fornire alle Strutture Trasfusionali un supporto tecnico-scientifico per lo sviluppo di procedure standard per l'allestimento di Controlli Esterni di Qualità.
- Fornire alle Strutture Trasfusionali un pannello di campioni HBV di diverso genotipo e concentrazione da impiegare nelle fasi di valutazione e convalida dei metodi NAT impiegati.

Trasferibilità dei risultati

Vedi sopra.

Utilizzo dell'immunoterapia per il trattamento delle patologie allergiche in Italia ed efficacia percepita dai pazienti

L'allergia è un importante problema di salute pubblica nei Paesi industrializzati e la sua prevalenza è in continuo aumento. Oggi, più del 25% degli abitanti delle zone industrializzate soffre di rinite, asma, congiuntivite, dermatite o di allergie alimentari. I sintomi delle malattie allergiche possono essere alleviati utilizzando la terapia farmacologica, sebbene l'immunoterapia specifica (ITS) sia l'unico trattamento che può alterare il naturale corso della malattia e condurre a miglioramenti a lungo termine che vengono mantenuti anni dopo l'interruzione del trattamento.

Attualmente sono disponibili poche informazioni relative all'uso dell'immunoterapia sottocutanea (SCIT) o sublinguale (SLIT) in Italia, alla tipologia di prodotto utilizzato e al corrispondente dosaggio, alla via di somministrazione e all'effetto percepito dai pazienti.

Pertanto lo scopo del progetto è di ottenere queste informazioni che possono rappresentare la base per affrontare meglio l'approccio all'immunoterapia in Italia. Saranno inoltre raccolte informazioni sui prodotti utilizzati in immunoterapia in tutti quei casi in cui è stata selezionata come trattamento. Tali informazioni saranno di primaria importanza per meglio indagare se esiste un rapporto tra i diversi prodotti disponibili in commercio e il miglioramento clinico osservato; inoltre l'analisi dei dati fornirà anche informazioni indirette sui costi connessi con l'ITS e l'associazione con la sicurezza e l'efficacia.

Risultati attesi nel triennio

Una serie di centri sanitari saranno selezionati in diverse Regioni d'Italia e gli allergologi che vi lavorano saranno invitati a partecipare al nostro studio. Saranno quindi informati sulla finalità dello studio e coloro che daranno il loro consenso saranno invitati a compilare un questionario.

Il questionario sarà realizzato insieme alle Unità cliniche che parteciperanno a questo progetto e le domande saranno preparate ad hoc, sulla base di questionari precedentemente standardizzati.

Lo scopo dello studio è raccogliere informazioni riguardanti la percezione e l'uso dell'ITS tra gli allergologi in Italia, la tipologia di prodotto utilizzato e la via di somministrazione. Inoltre saranno raccolte informazioni relative all'effetto del trattamento percepito dal paziente insieme alla valutazione clinica effettuata dall'allergologo.

In Europa sono stati condotti molti studi riguardanti la qualità, l'efficacia e la sicurezza dell'ITS. Nonostante questo, attualmente l'ITS è poco utilizzata in Italia, dove vengono regolarmente prescritte farmaci come antistaminici e corticosteroidi per ridurre i sintomi e l'infiammazione di molte malattie allergiche come asma e rinite. Purtroppo, per le patologie allergiche IgE mediate, la terapia farmacologica può essere utilizzata solo per il controllo dei

sintomi clinici, ma non è un trattamento curativo. Pertanto, le informazioni ottenute sull'ITS possono rappresentare la base per meglio indirizzare questo approccio in Italia.

Trasferibilità dei risultati

I pazienti allergici hanno una scarsa qualità della vita a causa dei loro sintomi. Anche se generalmente i pazienti non hanno bisogno di ricovero, le allergie causano un numero elevato di assenze da scuola e dal lavoro. Un'analisi dei costi connessi alle patologie allergiche ha dimostrato come non solo vi sia un elevato costo diretto legato al consumo di farmaci e alle visite mediche, ma anche elevati costi indiretti dovuti alle assenze dalla scuola e dal posto di lavoro. A tale proposito, è stato dimostrato che l'ITS è associata a vantaggi economici poiché può portare a miglioramenti a lungo termine, e di conseguenza ad una forte riduzione dell'uso dei medicinali e delle spese da parte dell'SSN.

I risultati ottenuti in questo studio possono essere di notevole interesse, sia per indirizzare in modo appropriato l'uso di questo trattamento in Italia sia perché consentono di valutare la corretta applicazione delle linee guida sull'immunoterapia.

Valutazione di possibili metodiche alternative al saggio SRD per determinare la concentrazione di antigene HA nei vaccini influenzali

Uno dei parametri più critici nella valutazione di un vaccino da parte dell'Autorità di Controllo prima della sua immissione in commercio è il contenuto di antigene (*potency*), che è effettuata mediante un saggio di immunodiffusione radiale in gel d'agar (SRD). L'SRD, in uso da circa 30 anni, è attualmente il metodo accettato in Farmacopea Europea. Si tratta di un test laborioso e lungo (due giorni), richiede la produzione annuale di antigeni e anticorpi standard, ed è caratterizzato da un elevato grado di variabilità inter-laboratorio. Il concretizzarsi di un rischio di pandemia influenzale a partire dal 1997 ha evidenziato la necessità di ridurre drasticamente i tempi richiesti per la produzione e commercializzazione di un vaccino influenzale. Si rende perciò necessario sviluppare metodi di misurazione del contenuto antigenico più rapidi e precisi di quello attuale. In particolare sono stati recentemente riportati studi preliminari di valutazione dell'HPLC per la quantificazione dell'HA influenzale. Affinché questo tipo di approccio possa essere considerato una valida alternativa al test SRD, occorre verificarne l'utilizzo su più ceppi e vaccini virali, in più laboratori. Scopo di questo progetto è la messa a punto di una metodica HPLC per la misurazione della concentrazione di HA nei vaccini influenzali, a partire da protocolli già disponibili, al fine di valutarne l'utilizzo nel controllo di stato sui vaccini influenzali, per confronto con il metodo di riferimento SRD.

Risultati attesi nel triennio

La messa a punto di una metodica HPLC 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
- Valutare il vantaggio in termini di riduzione dei tempi di esecuzione nonché di abbattimento dei tempi necessari per la produzione dei reagenti SRD.

Trasferibilità dei risultati

Elaborazione di un protocollo per l'esecuzione del saggio per la determinazione della concentrazione di antigene HA nei vaccini anti influenzali basato sull'HPLC in alternativa al test SRD, da utilizzarsi durante la fase di *Batch Release* di un vaccino da parte degli *Official Medicine Control Laboratory*. Tale protocollo potrà essere trasferito anche ad altri OMCL per una valutazione/validazione interlaboratorio.

Centro
per la ricerca e la valutazione dei prodotti immunobiologici

Attività di controllo, valutazione, parere

Attività di controllo e Sistema di Assicurazione della Qualità

Al CRIVIB è affidata la missione di valutare la qualità dei Prodotti (Farmaci) Immunobiologici al fine di garantirne la sicurezza d'uso per l'uomo. In particolare, tra i Farmaci Immunobiologici sono compresi: Vaccini Batterici e Virali destinati all'uso umano, Emoderivati (Immunoglobuline umane, C1 Inattivatore umano), 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 sui singoli lotti (*Batch-Release*) di Vaccini Batterici e Virali, di Immunoglobuline, di C1 Inattivatore umano, di Plasma Pool (DL.vo 24 aprile 2006, n. 219, GU 21 giugno 2006, n. 142). Il CRIVIB ricopre il ruolo di Laboratorio Ufficiale di Controllo dei Medicinali (OMCL) per il controllo di stato (*Batch Release*) dei Prodotti (Farmaci) Immunobiologici. Nell'ambito di tale attività l'ISS partecipa alla Rete Europea dei Laboratori di Controllo dei Farmaci (OMCL Network) di tutti gli Stati membri dell'Unione Europea coordinato dall'*European Directorate for the Quality of Medicine and Health Care* (EDQM) con sede a Strasburgo. Tale attività, che prevede il controllo lotto per lotto di ogni prodotto prima dell'immissione in commercio, viene svolta mediante metodiche analitiche che devono rispondere a certi requisiti come richiesto dalla Farmacopea Europea o dalle linee-guida europee, e si concretizza con l'emissione di un Certificato di *Batch Release* che consente la libera circolazione del prodotto in tutti gli Stati membri dell'Unione Europea. Il consuntivo dei controlli effettuati è oggetto di un Rapporto Annuale presentato a tutti gli OMCL a cui fa da supporto una banca-dati.
 - Sorveglianza Post-Marketing della qualità dei Farmaci Immunobiologici: collaborazione all'espletamento del programma annuale di controllo della qualità di lotti campione di Farmaci Immunobiologici prelevati dal mercato nazionale (DL.vo 24 aprile 2006, n. 219, GU 21 giugno 2006, n. 142), dal mercato europeo nell'ambito dei programmi MRP (*Mutual Recognition Procedure*) e CAP (*Centrally Authorized Product*) (EDQM e EMEA).
 - Analisi di Farmaci Immunobiologici difettosi (Farmacovigilanza): viene eseguito il controllo della qualità su lotti o campioni specifici in seguito a segnalazioni di difettosità, di presenza di corpi estranei e d'insorgenza di eventuali reazioni avverse.
 - L'attività analitica/sperimentale comprende, inoltre, lo sviluppo di metodi e di approcci 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 Sistema di Assicurazione della Qualità (SAQ) di CRIVIB è l'insieme di azioni pianificate e sistematiche atte a garantire che le attività controllate soddisfino i requisiti di qualità prestabiliti. Attraverso il Sistema di Assicurazione della Qualità, il CRIVIB assicura la costanza delle procedure che garantiscono il proprio funzionamento. Il CRIVIB è dotato di un Manuale della Qualità e di un insieme di Procedure Generali e Operative Standard, che gestiscono tutte le attività. Inoltre il SAQ fornisce una evidenza esterna obiettiva della qualità del lavoro svolto, in particolare per garantire la qualità del dato analitico ottenuto in tutta la attività di controllo. Il SAQ del CRIVIB è realizzato in accordo con la normativa tecnica indicata nelle norme UNI EN ISO 9001:2008 e UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 per i laboratori di taratura e di prova che prevede la utilizzazione di metodiche analitiche opportunamente convalidate descritte in apposite

Procedure Operative, l'uso di apparecchiature opportunamente utilizzate e mantenute e la registrazione puntuale e dettagliata di tutte le operazioni effettuate. Le attività del SAQ sono coordinate da un team di Assicuratori della Qualità. Al fine di mantenere attivo il Sistema, una continua attività di controllo viene esercitata dalle figure preposte sia per l'aggiornamento delle procedure che per la gestione delle eventuali non conformità rilevate e per l'attuazione delle azioni correttive. Lo svolgimento di audit (ispezioni) interni permette di verificare, periodicamente, la rispondenza del sistema e del personale ai criteri stabiliti nel Manuale della Qualità. Il SAQ del CRIVIB è stato ripetutamente sottoposto a visite ispettive da parte di organismi internazionali quali WHO, EMEA ed EDQM con esito favorevole.

Piano triennale

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 (Decreto Legislativo 24 aprile 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 (CCS) 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.

Piano triennale

Continuerà l'attività di Farmacovigilanza per il prossimo triennio. Sulla base della consistente attività ricevuta nel corso del 2008, si prevede un carico di lavoro superiore agli anni precedenti.

Attività di parere e valutazione di dossier (Decreto Legislativo 24 aprile 2006, n. 219)

Attività di valutazione e parere:

- valutazione dei dossier di registrazione relativamente agli aspetti della qualità dei Farmaci Immunobiologici per uso umano quali Vaccini, Emoderivati, Anticorpi monoclonali e Allergeni, con particolare riferimento a quanto disposto dalle procedure nazionali, di mutuo riconoscimento, decentralizzate e centralizzate europee;
- valutazione dei Plasma Master File, per gli aspetti di competenza, per l'emissione della certificazione con procedura centralizzata;
- partecipazione ai lavori di organismi nazionali e internazionali (Farmacopea Europea, EMEA, EDQM, WHO).

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, siano essi di valenza nazionale o europea. Svolge attività di consulenza e parere su problematiche inerenti ai vaccini batterici ed altri medicinali contenenti sostanze di origine batterica.

Partecipa, inoltre, con i propri esperti a gruppi di lavoro internazionali quali il *Working Party* su *Monocyte Activation Test* e il Gruppo 15 della Farmacopea Europea, a gruppi di lavoro dell'*European directorate for the Quality of Medicine*.

Il Reparto Vaccini virali (Poliovirus e Rotavirus) esprime parere, per la parte di competenza (qualità), sui dossier di registrazione di questi vaccini, siano essi di valenza nazionale o europea svolge attività di consulenza e parere su problematiche inerenti i vaccini antiPoliovirus e antiRotavirus.

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, siano essi di valenza nazionale o europea svolge attività di consulenza e parere su problematiche che riguardano i vaccini antinfluenzali.

L'Italia ricopre, da diversi anni, il ruolo di Stato di riferimento (RMS) per le procedure di Mutuo Riconoscimento relative a vaccini antinfluenzali prodotti in Italia o a partenza italiana. Recentemente l'Italia ha anche ricoperto il ruolo di *Rapporteur* o *Co-Rapporteur* in Procedure Centralizzate, concernenti vaccini pandemici e pre-pandemici.

Esperti dell'USSI partecipano inoltre a gruppi di lavoro internazionali, quali l'*ad hoc Influenza Working Party* dell'EMA e la *Task Force on Pandemic Vaccines* dell'EDQM.

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 tecnologia del DNA-ricombinante, anticorpi monoclonali, siano essi di valenza nazionale o europea.

Relativamente alle problematiche allergologiche, la Sezione gestisce la Banca Dati delle sostanze chimiche sensibilizzanti in collaborazione con il CSC e con il SIDBAE – Settore Informatico, dell'ISS.

L'USSAB partecipa, inoltre, con i propri esperti a gruppi di lavoro internazionali quali ad esempio il *Biologics Working Party* dell'EMA.

Piano triennale

L'attività di parere e valutazione proseguirà per tutto il triennio. Si prevede un carico di lavoro superiore a quello svolto nel triennio precedente.

L'Unità Scientifica – Sezione Influenza (USSI) proseguirà l'attività di consulenza per conto dell'AIFA sui dossier riguardanti i vaccini stagionali tradizionali, coltivati in uova embrionate di pollo, e di vaccini pandemici e pre-pandemici, che potrà essere ampliata in seguito alla registrazione di nuovi vaccini antinfluenzali, come, ad esempio, quelli prodotti in coltura cellulare. Inoltre l'Unità Influenza si occuperà della valutazione dei dossier tecnici di altri vaccini virali diversi da quelli oggetto delle attività del Reparto Vaccini virali.

Gli esperti dell'Unità Scientifica – Sezione Allergeni e Biotecnologici (USSAB) parteciperanno anche ad un gruppo di lavoro, recentemente 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 centralizzati

Il regolamento EMEA prevede per ogni Paese membro dell'Unione Europea l'individuazione di un Coordinatore e di un *Contact Point* relativamente all'attività di valutazione di dossier di Plasma Master File (PMF) da certificarsi mediante procedura centralizzata (EMEA). Sono oggetto di tale attività anche gli aggiornamenti annuali dei PMF nonché variazioni di tipo IB e II.

Il Reparto Prodotti biologici (*Contact Point*) gestisce questa attività di valutazione in collaborazione con il Dipartimento EOMM (Coordinatore) provvedendo, secondo una tempistica ben definita, alla stesura di *Evaluation Report* (ER) per i PMF assegnati dall'EMEA.

I compiti del *Contact Point* prevedono anche la partecipazione a teleconferenze organizzate dall'EMEA prima della presentazione degli ER al *Biologics Working Party*.

Piano triennale

Questa attività di valutazione proseguirà per tutto il triennio. Si prevede un carico di lavoro superiore a quello svolto nel triennio precedente.

Controllo di stato dei vaccini antinfluenzali (Decreto 31 marzo 2008)

L'Unità Scientifica – Sezione Influenza (USSI) effettua attività di Controllo di Stato (*Batch Release*) di tutti i vaccini antinfluenzali stagionali prodotti in Italia, sia per il mercato nazionale che europeo. 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 eseguiti saggi per la determinazione del contenuto antigenico (*potency test*) di ciascuno dei tre 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 (*purity test*).

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.

Piano triennale

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 150 lotti di vaccino/anno.

Inoltre, in seguito alla recente registrazione in ambito europeo (EMEA) 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.

Controllo di Stato dei vaccini antipolio e anti-rotavirus (Decreto 31 marzo 2008)

Il Reparto Vaccini virali, RVV, (Poliovirus e Rotavirus) effettua attività di controllo (*Batch Release*) per i vaccini poliovirus e rotavirus.

Vaccini polio Sabin. La richiesta di vaccino anti-polio attenuato di Sabin (OPV) è molto cresciuta negli ultimi dieci anni per far fronte ai programmi WHO di vaccinazione per l'eradicazione della polio nel mondo, in particolare nelle regioni ancora endemiche. L'RVV controlla i vaccini OPV prodotti in Italia per il mercato estero. Sulle sospensioni madri di

vaccino monovalente (sierotipi 1-3) si esegue il saggio di neurovirulenza su scimmia (MNVT), esaminando preparati istologici dell'SNC. Per limitare l'uso di primati, sono stati sviluppati nuovi metodi alternativi per il saggio di neurovirulenza : i) una PCR quantitativa per stabilire la frazione di virus retromutanti, potenzialmente neurovirulenti, presenti nel vaccino (MAPREC); ii) un saggio di neurovirulenza in vivo su topi transgenici per il recettore di poliovirus suscettibili all'infezione. Questi nuovi saggi sono stati validati per il sierotipo 3 di polio. Sul prodotto finito pre-marketing, sia trivalente che monovalente, si eseguono saggi *in vitro* di identità, potenza e stabilità termica dei componenti virali e viene esaminata la loro conformità alle specifiche autorizzate in fase di registrazione. L'attività di controllo per il *Batch Release* comprende, inoltre, la verifica dei protocolli di produzione e controllo forniti dalla Ditta.

Vaccini polio Salk In Italia, la vaccinazione obbligatoria viene effettuata (Decreto 18 giugno 2002, Ministero della Salute) somministrando quattro dosi di vaccino inattivato di Salk (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. Tale controllo prevede la titolazione dell'antigene D dei tre sierotipi di poliovirus, usando un saggio immunoenzimatico (ELISA).

Vaccini rotavirus. Il rotavirus è il principale agente causale di enterite acuta nell'infanzia sia nei Paesi in via di sviluppo che in quelli industrializzati. La mortalità da rotavirus nel mondo è stimata essere di circa 800.000 per anno, e particolarmente colpiti sono i Paesi in via di sviluppo. Nei Paesi industrializzati, a fronte di una mortalità ridotta, l'impatto economico e sulla salute pubblica è tuttavia enorme. Negli USA, ogni anno si registrano mediamente circa 300 morti, 160.000 ospedalizzazioni e 2.000.000 visite mediche per gastroenterite da rotavirus. In Italia sono stati registrati e sono in commercio 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 partecipa agli studi di *proficiency* (PTS) e di standardizzazione biologica (BSP), organizzati dall'EDQM. Inoltre partecipa agli studi collaborativi organizzati dalla WHO per la messa a punto di metodiche analitiche o per la definizione di Standard Internazionali relativi ai vaccini polio e antirotavirus.

Piano triennale

Per l'attività di *Batch Release* del vaccino antipolio attenuato di Sabin OPV si prevede nei prossimi anni il controllo annuale di circa dieci sospensioni madri (*bulk*) e per il prodotto finito, di circa 60 lotti di trivalente, circa 50 lotti di monovalente di tipo 1 e circa 50 lotti di monovalente di tipo 3. È prevista l'estensione del controllo della neurovirulenza su topi transgenici anche per le sospensioni madri (*bulk*) di tipo 1 e l'esecuzione presso l'ISS del MAPREC anche per il tipo 1.

Per i vaccini antirotavirus è previsto il controllo di 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 attività di controllo dei vaccini batterici (Decreto 31 marzo 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) 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.

Sui vaccini batterici viene svolta anche un'attività di sorveglianza post-marketing (DL.vo 24/04/2006, n. 219) – Programma di controllo annuale della composizione dei medicinali – e farmacovigilanza.

Piano triennale

Nell'ambito dell'attività di controllo (*Batch release*) dei vaccini per uso umano, tanto la Farmacopea Europea come anche WHO richiedono che sia valutata la presenza di tossicità specifica in vaccini anti-pertosse cellulare (wP) attraverso il saggio *Mouse Weight Gain* (MWG). Il saggio si basa sul minor incremento di peso dei topi immunizzati con vaccini wP che presentano una attività tossica, rispetto all'incremento di peso dei topi non vaccinati. È stata dimostrata una correlazione fra i risultati del saggio e la presenza di reazioni avverse in bambini vaccinati con wP. Si tratta di un saggio di sicurezza di carattere generale in quanto esistono numerose tossine prodotte durante la crescita di Bordetella pertussis che possono influenzare l'MWG.

Data la maggior frequenza di reazioni avverse nei vaccini wP rispetto a quelli acellulari, quest'ultimi sono quelli prevalentemente utilizzati nella maggior parte dei Paesi sviluppati, inclusa l'Italia. Tuttavia, per il loro minor costo di produzione, i wP sono ancora prodotti e sono quelli principalmente impiegati nei Paesi in via di sviluppo.

Nell'ambito dell'attività di *Official Control Authority for the Batch Release*, il Reparto Vaccini batterici intende mettere a punto il saggio per la determinazione della tossicità specifica in vaccini cellulari anti-pertosse, per integrare i saggi che il Reparto Vaccini batterici esegue sui lotti che vengono sottoposti al controllo di un vaccino combinato (DTwP-Hib) prodotto in Italia per il mercato estero non EU.

Nell'ambito dell'attività di sorveglianza post-marketing, l'RVB intende proseguire e ampliare l'attività di caratterizzazione e quantificazione del contenuto polisaccaridico di vaccini batterici del tipo glicoconiugati.

In particolare, per quanto riguarda la caratterizzazione del contenuto polisaccaridico in vaccini batterici mediante cromatografia di esclusione accoppiata a rivelazione spettrofotometrica (HPSEC-UV a serie di diodi) si intende mettere a punto e convalidare metodi per determinare la dimensione molecolare di poli e oligosaccaridi di vaccini glicoconiugati anti meningococcici e anti pneumococcici.

Per quanto riguarda, invece, la quantificazione del contenuto polisaccaridico in vaccini batterici mediante cromatografia a scambio anionico accoppiata a rivelatore ad amperometria pulsata (HPAEC-PAD), il Reparto intende estendere e convalidare l'estensione della procedura per la "Determinazione quantitativa del saccaride totale e libero nei vaccini glicoconiugati anti *Haemophilus influenzae* di tipo b tramite dosaggio del ribitolo" a quei vaccini, presenti sul mercato, con alto contenuto di lattosio, come eccipienti. I due monosaccaridi derivati dall'idrolisi di tale zucchero, infatti, interferiscono nella quantificazione del picco del ribitolo nelle condizioni cromatografiche previste dal metodo attualmente in uso.

Controllo di Stato dei vaccini virali MPaR, Varicella, Epatite (DM 31 marzo 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.

Piano triennale

Continuerà anche per il prossimo triennio l'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, 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 marzo 2008; L 21 ottobre 2005, n. 219; DL.vo 24 aprile 2006, n. 219)

Per ogni lotto di prodotto sottoposto a controllo di stato il Reparto Prodotti biologici effettua attività di controllo (*Batch Release*) per ogni lotto delle immunoglobuline normali e specifiche (controllo di fase II) 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 e l'attività specifica (controlli di fase I). 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).

Piano triennale

Sulla base dell'esperienza pregressa, si prevede il controllo di circa 150 lotti di immunoglobuline per anno, per un totale di 450-500 lotti nel triennio 2009-2011.

Coordinamento relativo alla attività del Gruppo di Biotecnologia/Farmaci dell'Agenzia Europea per la Valutazione dei Medicinali (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 *Biological Working Party* (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.

Piano triennale

- EMA

Nel corso degli anni immediatamente precedenti nell'ambito delle attività del gruppo sono state avviate attività nell'ambito delle Linee Guida per i prodotti biosimilari, per gli anticorpi monoclonali, per la definizione dei criteri da soddisfare a livello di qualità dei prodotti biologici da sottoporre a sperimentazione clinica di varie fasi, ecc. Inoltre, in maniera altrettanto presente, si è avuta la partecipazione ai gruppi di lavoro per la stesura della nuova Linea Guida sugli allergeni, argomento di grande importanza anche alla luce delle problematiche associate con questi medicinali ancora in una situazione di grande complessità a livello regolatorio in alcuni Paesi europei inclusa l'Italia. Inoltre, presso il *Biological Working Party* 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 attualmente gestita unitamente al Dipartimento EOMM. Per definizione delle attività EMA, la stragrande maggioranza delle attività svolte in particolare nel 2008 si prolunga sicuramente negli anni immediatamente successivi. Pertanto, per il periodo 2009-2011 l'attività che verrà svolta presso il CRIVIB per questo aspetto sarà sicuramente volta al mantenimento delle attività già avviate in precedenza. Tuttavia, alcuni riassetto raggiunti nel CRIVIB stesso fanno ipotizzare con buona probabilità un maggiore coinvolgimento del personale CRIVIB in questa attività europea, sia aumentando le partecipazioni ai vari Gruppi di lavoro e alle riunioni stesse del BWP reclutando e formando altri esperti in grado di ampliare la copertura delle competenze in sede di riunione. È stato già avviato inoltre un piano di formazione di personale in settori non propriamente legati alla qualità ma anche alla non clinica e clinica di prodotti immunobiologici, fermo restando la necessità di mantenere un chiaro rapporto con il Dipartimento MIPI per quanto concerne la valutazione clinica di alcuni vaccini di particolare complessità.

Infine, la partecipazione alle riunioni EMA nel triennio 2009-2011 vedrà anche sviluppato l'aspetto legato alla partecipazione a nuovi *peer drafting group* nuove linee guida di interesse crescente. Tra i vari argomenti da considerare potenzialmente, il maggiore interesse sarà rivolto a quelle problematiche ancora in fase di completo sviluppo riguardo i prodotti biosimilari, i prodotti per *trial* clinici e i prodotti derivati dal plasma umano. Ovviamente numerose linee guida saranno gestite in collaborazione tra BWP e CAT (*Committee for Advanced Therapy*), e per quanto di competenza l'attività cercherà di interagire al massimo con i delegati di tale comitato per fornire laddove necessario tutto il supporto richiesto.

Inutile ricordare che tutta l'esperienza maturata a livello di BWP è sempre stata e continuerà ad essere di supporto alla elaborazione di pareri per l'AIFA, mantenendo grazie al progetto EMA un completo sinergismo e coerenza tra le posizioni scientifiche assunte a livello internazionale e nazionale dalle varie autorità regolatorie. Tale attività verrà pertanto ovviamente continuata per tutto il triennio cui il presente progetto si riferisce, con particolare riguardo alle iniziative di espansione del pannello delle competenze stesse e degli esperti coinvolti nel meccanismo di valutazione europea dell'EMA del CRIVIB.

– EDQM

Nell'ambito delle attività dell'EDQM (*European Directorate for the Quality of Medicines*) numerose sono le attività che afferiscono al CRIVIB. La partecipazione di esperti nelle iniziative EDQM è costante ed estesa. Tra i vari esempi, si ritiene

fondamentale sottolineare la partecipazione ai due importanti *Advisory Group* della rete dei Laboratori di Controllo dei Medicinali Europei (OMCL), quello relativo alle attività della rete nel loro complesso (AdG-GEON), e quello relativo alle attività di controllo dei medicinali biologici in senso esteso (AdG-OCABR) con risvolti in particolare a livello delle problematiche di *Batch Release*. Il mandato del Direttore del CRIVIB nell'AdG-GEON scadrà nel 2009, quello nell'AdG-OCABR scadrà nel 2010 (rinnovabile) e per il triennio 2009-2011 è stato conferito un terzo incarico (delegato per l'Italia nella commissione di Farmacopea Europea).

Inoltre, il Direttore del CRIVIB riveste attualmente il ruolo di *Chairman* del Gruppo di esperti sugli allergeni, gruppo che ha predisposto la revisione della monografia generale sugli allergeni e che si occuperà della stesura delle altre monografie specifiche nel settore. Infine, 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.

Tutte queste attività nel triennio 2009-2011 verranno mantenute e vedranno il coinvolgimento degli esperti del CRIVIB in aumento anche in funzione di nuovi prodotti di competenza che arriveranno al controllo analitico sia a livello di *Batch Release* che di sorveglianza di prodotti in commercio (Programma di sorveglianza post-marketing predisposto dall'AIFA).

Esame di richieste di autorizzazione alla sperimentazione animale, in deroga ai sensi degli art. 8-9 del DL.vo 116 del 27/01/1992

Espressione del parere relativo ad autorizzazione alla sperimentazione animale, in deroga agli art. 8-9 DL.vo 116 del 27/01/1992, 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.

Piano triennale

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 Centro, su richiesta di parere da parte del Direttore dell'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 Valutazione Esterna di Qualità è una importante procedura di *quality assurance* 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) in particolare delle metodiche PCR e di Studi di Standardizzazione Biologica (BSP), organizzati dall'EDQM. Inoltre partecipa agli Studi Collaborativi organizzati dalla WHO per la messa a punto di metodiche analitiche o per la definizione di Standard Internazionali.

Il Reparto Vaccini batterici partecipa agli Studi di *Proficiency* (PTS) e Studi di Standardizzazione Biologica (BSP), organizzati dall'EDQM. Inoltre partecipa agli studi

collaborativi organizzati dalla WHO per la messa a punto di metodiche analitiche o per la definizione di Standard Internazionali.

Il Reparto Vaccini virali (poliovirus) partecipa agli Studi di *Proficiency* (PTS) e Studi di Standardizzazione Biologica (BSP), organizzati dall'EDQM. Inoltre partecipa agli studi collaborativi organizzati dalla WHO per la messa a punto di metodiche analitiche o per la definizione di Standard Internazionali.

L'USSI partecipa agli Studi Collaborativi organizzati dalla WHO per la messa a punto di metodiche analitiche o per la definizione di Standard Internazionali.

Piano triennale

Il CRIVIB continuerà la partecipazione regolare agli Studi di *Proficiency* e Studi di Standardizzazione Biologica organizzati annualmente dall'EDQM o da altri organismi internazionali, quali la WHO.

Plasma pool testing (Farmacopea Europea "Human plasma for fractionation"; DM 29 marzo 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 gli *Official Medicines Control Laboratory* dell'Unione Europea. 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.

Piano triennale

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 aprile 2006, n. 219)

L'AIFA, su proposta dell'ISS, sentita la CUF e il Consiglio Superiore di Sanità, 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.

Il Reparto Vaccini virali effettua i controlli post-marketing del vaccino antipolio inattivato di Salk, adottato in Italia per la vaccinazione obbligatoria (Decreto 18 giugno 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'Unità Scientifica – Sezione Influenza (USSI), esegue controlli di sorveglianza Post-marketing su lotti di vaccino antinfluenzale già immessi sul mercato.

Piano triennale

Si prevede che tale attività comporterà il controllo di circa 100 lotti di immunoglobuline (potrebbe essere estesa anche ad altri prodotti immunologici) nonché il controllo di circa 30 lotti di vaccini.

Per l'attività di sorveglianza post-marketing per il vaccino inattivato antipolio di Salk (IPV) è previsto il controllo dei vaccini maggiormente in uso nel nostro Paese (circa tre lotti).

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) Regolamento

La sorveglianza post-marketing dei prodotti autorizzati centralmente (CAP) è un'attività coordinata a livello europeo, nella quale sono coinvolti EMEA, 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 del campionamento e dell'invio dei prodotti e della relativa documentazione agli OMCL prescelti annualmente per l'esecuzione dei saggi.

Gli OMCL sono responsabili dell'esecuzione dei saggi previsti dal CHMP per il prodotto in esame.

Una procedura simile, coordinata dall'EDQM, viene seguita per il programma di sorveglianza post-marketing per prodotti autorizzati attraverso il Mutuo Riconoscimento (MRP).

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.

Piano triennale

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 EMEA/EDQM prevederà la messa a punto e la relativa convalida o trasferibilità dei metodi di analisi previsti per il controllo.

Valutazione e controllo disinfettanti

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 (PMC).

Il CRIVIB inoltre partecipa, attraverso un rappresentante con funzioni di esperto per l'attività virucida e *Convenor* del *Virus Task (VTG) Group* ai lavori del CEN – *Technical Committee 216/ Disinfectants* che produce le norme europee per la regolamentazione della dimostrazione di efficacia di questi prodotti.

A scopo di registrazione e/ di revisione di prodotti esistenti, sono stati valutati 50 dossier di prodotti disinfettanti, di cui 11 con attività virucida, per uso umano, animale e industriale.

Piano triennale

Continuazione 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 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 dal EC/EFTA e dal CEN.

Continuerà l'attività di valutazione dei dossier per la registrazione dei disinfettanti a seconda delle richieste pervenute dal Ministero della Salute. L'esperto del CRIVIB si occuperà della stesura di un nuovo standard europeo per la valutazione dell'attività virucida dei disinfettanti su superficie.

**Centro Nazionale
Malattie Rare**

Attività di ricerca

Angiopietine-Tie-2: ruolo nella megacariopoiesi

Il sistema ligando-recettore angiopietina (Ang)-Tie-2 regola l'integrità vascolare modulando l'angiogenesi in condizioni fisiologiche, ma anche in patologie quali disordini infiammatori e cancro. L'Ang-1 e l'Ang-2, i ligandi meglio caratterizzati di Tie-2 competono per lo stesso sito del dominio extracellulare del recettore. Lo stato funzionale dei vasi sanguigni sarebbe determinato dall'equilibrio tra le quantità dell' Ang-1 e dell' Ang-2.

Studi recenti mostrano che Tie-2 è coinvolto nella regolazione dell'ematopoiesi: Ang-1 promuove la sopravvivenza e mantiene la quiescenza delle cellule staminali ematopoietiche Tie-2⁺; cellule ematopoietiche differenziate quali sottopopolazioni di monociti e granulociti esprimono Tie-2. Inoltre, la significativa espressione di Tie-2 nei megacariociti (MK) sia immaturi che differenziati suggerisce un suo ruolo chiave anche nella megacariopoiesi. La conoscenza di tale ruolo nel differenziamento dei MK può costituire una risorsa importante per modulare la produzione di MK e piastrine anche in condizioni patologiche. Pertanto, ci proponiamo di analizzare l'effetto dell'attivazione e dell'inibizione specifica del Tie-2 sui progenitori MK. Inoltre, con l'intento di identificare molecole bersaglio di Tie-2 coinvolte nella megacariopoiesi, analizzeremo i segnali innescati dalla sua attivazione.

Risultati attesi nel triennio

Al fine di studiare il ruolo del Tie-2 nella megacariopoiesi, saranno allestite colture di progenitori ematopoietici CD34⁺ in condizioni che permettono la crescita/differenziazione selettiva di MK (*unilineage*). Le popolazioni di MK a diversi stadi di differenziamento e maturazione saranno successivamente analizzate per identificare le molecole attivate dal *signalling* Ang-Tie-2 e che sono coinvolte nei diversi stadi del differenziamento degli MK.

Inoltre verrà valutata l'eventuale produzione endogena di Ang a diversi stadi di sviluppo MK. Infatti, dati preliminari mostrano elevate quantità di Ang-1 e -2 in coltura, suggerendo un effetto autocrino delle angiopietine sugli MK.

Con lo scopo di stimolare o inibire specificamente il Tie-2 o i suoi ligandi, i progenitori MK verranno: i) trattati con anticorpi bloccanti specifici per il Tie-2 o con recettori solubili bloccanti specifici per le angiopietine endogene; ii) trasdotti con *small interfering RNA* che inibiscono specificamente l'espressione del Tie-2, dell'Ang-1 o dell'Ang-2; iii) trattati con farmaci antiangiogenici che bloccano Ang-2 o Tie-2.

Sulla popolazione di MK ottenuta in queste condizioni verrà valutata la proliferazione, il differenziamento la poliploidizzazione MK e la produzione di piastrine.

Sulla base dei risultati ottenuti in altri sistemi sperimentali, ci aspettiamo che il Tie-2 promuova la proliferazione e la poliploidizzazione MK attivando i *pathway* delle MAP chinasi e della PI3 chinasi.

Trasferibilità dei risultati

Diversi farmaci antitumorali già in commercio o in corso di sperimentazione riducono l'angiogenesi tumorale inibendo il *signaling* Ang-Tie-2. La comprensione del ruolo svolto dalle angiopietine e dal Tie-2 è cruciale per evitare eventuali effetti collaterali dei farmaci antiangiogenici. In particolare, l'analisi del ruolo svolto dalle Ang-1 e-2 e dal Tie-2 nella megacariopoiesi potrebbe spiegare lo sviluppo di trombocitopenia in pazienti affetti da cancro e trattati con farmaci antiangiogenici e potrebbe indicare nuove strategie terapeutiche per prevenire la deplezione di piastrine nei tumori.

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'EMEA 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 5 individui su 10.000 cittadini nell'Unione Europea. 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'Unione Europea, 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 Commissione EU, WHO, FDA e le Agenzie nazionali del Farmaco.

Organization for Economic Cooperation and Development(OECD): Quality and Proficiency Testing for Molecular Genetic Testing

L'Organization for Economic Cooperation and Development (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 del 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 effettuare 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: i) Organizzazione dei laboratori; ii) Qualifica del personale; iii) Tipi di test eseguiti; iv) Adozione di schemi di qualità; v) Informazioni circa i campioni (in particolare lo scambio di campioni attraverso i vari Paesi); vi) Tecniche impiegate; vii) Pratiche di refertazione (inclusa la consulenza); viii) Schemi di accreditamento; ix) 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).

Ruolo delle alterazioni dei lipidi di membrana nella patogenesi delle alterazioni neurologiche nella malattia di Niemann-Pick di tipo C: un possibile nuovo approccio terapeutico

I *raft* lipidici, composti da sfingolipidi e colesterolo, costituiscono zone di membrana in cui sono segregate numerose proteine deputate alla sopravvivenza e al differenziamento delle cellule nervose. Il nostro gruppo ha dimostrato recentemente che l'estrazione del colesterolo dai *rafts* causa una diminuita sensibilità dei neuroni all'NMDA (N-metil-D-aspartato), coinvolto in molte malattie neurodegenerative. Risultati preliminari indicano che questo effetto è rilevabile anche in fettine di cervello di roditore. Nel progetto si utilizzeranno topi WT e NPC1^{-/-} per studiare l'effetto di alterazioni strutturali dei *rafts* sulle risposte cellulari ai neurotrasmettitori eccitatori (in particolare NMDA, AMPA e acido kainico) attraverso le modificazioni dei parametri elettrofisiologici e di *videoimaging*. In particolare verranno studiati: i) i meccanismi coinvolti nella modificazione della trasmissione sinaptica e della induzione/mantenimento del potenziamento a lungo termine (LTP), modello di memoria; ii) la mobilitazione del calcio NMDA e insulina-dipendente nei neuroni ippocampali in coltura e i loro effetti sulla sopravvivenza, visto che una modificazione dei *raft* può alterare sia il *signalling* del calcio, sia l'attivazione dei recettori insulinici. Successivamente si valuterà se la manipolazione farmacologica dei *raft* di membrana possa migliorare le alterazioni di conduzione delle cellule nervose in modelli di malattie neurodegenerative e malattie dislipidemiche, quali la malattia di Niemann-Pick, per stabilire nuovi target terapeutici.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto si propone di identificare i meccanismi che sottendono alla comunicazione interneuronale, che vengono coinvolti nella disregolazione dei *raft* lipidici, utilizzando diversi approcci sperimentali. L'applicazione di tecniche fluorimetriche per la misura del contenuto intracellulare di calcio e di potassio in colture cellulari di ippocampo di ratto consentirà di valutare su singoli neuroni l'implicazione di specifici sistemi recettoriali coinvolti nelle alterazioni lipidiche delle membrane citoplasmatiche. Gli studi elettrofisiologici su fettine di strutture del sistema limbico (quali ippocampo e corteccia entorinale) forniranno informazioni sulle alterazioni della trasmissione sinaptica e della plasticità sinaptica attraverso la registrazione di potenziali di campo in extracellulare. Verranno inoltre valutate eventuali modificazioni di rilascio a livello presinaptico di glutammato, il principale neurotrasmettitore eccitatorio presente in queste strutture, utilizzando tecniche di stimolazione quali la *paired pulse facilitation* e la *paired pulse inhibition*. I dati risultanti da questi studi forniranno informazioni sullo specifico coinvolgimento dei sistemi recettoriali, e daranno indicazioni sulle possibilità di utilizzare nuove strategie.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti attraverso questi studi, oltre a contribuire a chiarire il ruolo dell'alterata regolazione dei rafts lipidici nell'insorgenza dei sintomi neurologici della malattia di Niemann-Pick di tipo C, potrebbero indicare come i microdomini lipidici possano costituire un bersaglio nel trattamento della malattia, aprendo così il campo a nuove strategie farmacologiche terapeutiche sia nelle patologie neurodegenerative che in quelle dislipidemiche. In particolare a questo scopo saranno utilizzati fibroblasti di pazienti NPC, in cui è possibile osservare l'accumulo di lipidi, per valutare la validità dell'approccio terapeutico.

**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, purché 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 5 individui su 10.000 cittadini nell'Unione Europea. 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'Unione Europea, 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'Unione Europea.

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 Commissione EU, WHO, FDA e le Agenzie nazionali del Farmaco.

Piano triennale

Partecipazione a tutte le attività del COMP:

- Riunioni mensili all'EMA per la designare i prodotti medicinali "orfani"
- Partecipazione allo sviluppo di *Policy* per i prodotti medicinali orfani (es. *review* dei criteri per la designazione di prodotto medicinale "orfano"; contribuire allo sviluppo del Database degli esperti, ecc.)
- Promuovere la ricerca nel settore delle malattie rare e farmaci orfani (collaborare con la Commissione EU: DG-Research e SANCO, con le Agenzie nazionali che finanziano la ricerca e con le azioni sovra-nazionali quali ad es. E-RARE)
- Partecipare alla cooperazione internazionale: collaborare con FDA, Agenzie del Canada e altri Paesi interessati a sviluppare *policy* comuni con il COMP-EMA; con la WHO
- Organizzazione di specifici Meeting sui farmaci orfani: es. è previsto il 3-4 maggio 2010 il Meeting per la celebrazione dei dieci anni di lavoro del COMP.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD): quality and proficiency testing for molecular genetic testing

L'*Organization for Economic Cooperation and Development* (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 del 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 effettuare un'analisi comparativa;
- identificare aree di possibili cooperazioni internazionali per sviluppare standards 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).

Piano triennale

Continuare l'attività collaborativa con OECD, in particolare attualmente le Linee guida sono state distribuite in tutti i Paesi OECD e il Centro verificherà la loro applicazione nel nostro Paese.

Centro Nazionale Sangue

Attività di ricerca

Applicazioni della proteomica allo studio delle lesioni da conservazione dei globuli rossi e al controllo di qualità del plasma, delle immunoglobuline aspecifiche per uso endovenoso e dei fattori VIII e IX plasmaderivati e ricombinanti

Lo studio collaborativo con l'Università degli Studi della Tuscia si avvale di tecniche di proteomica con la finalità di: i) individuare soluzioni conservanti che possano ridurre i fenomeni di stress ossidativo a cui vanno incontro le proteine della membrana eritrocitaria; ii) studiare le alterazioni del proteoma plasmatico durante il processo produttivo e di conservazione; iii) confrontare la qualità e la purezza dei prodotti derivati dal plasma con quelli di origine ricombinante. Il tempo di *storage* delle emazie concentrate è legato all'aumento di rischi che si possono tradurre in un forte stress ossidativo in grado di influire sull'efficacia trasfusionale. Di conseguenza, l'eliminazione dell'ossigeno nelle sacche di stoccaggio e la creazione di un'atmosfera inerte ha dimostrato di poter ridurre l'entità dei fenomeni ossidativi nello stoccaggio di emazie concentrate. Recentemente è stata proposta una nuova soluzione, la CPD-AS65, che sembrerebbe migliorare notevolmente le condizioni di conservazione soprattutto in condizioni di anaerobiosi. Il nostro intento è quello di realizzare uno studio proteomico comparativo cinetico tra emazie conservate in CPD-AS65 in presenza e in assenza di ossigeno.

Fenomeni di *storage lesion* si verificano anche durante le varie fasi del processo produttivo del plasma. La valutazione delle alterazioni subite dal proteoma del plasma durante questo processo si articolerà in due fasi. Nella prima fase verrà caratterizzato e studiato il proteoma nativo del plasma. Nella seconda fase si analizzeranno gli effetti indotti sul proteoma dal successivo processo di congelamento, essenziale per la produzione del plasma fresco congelato (PFC).

Nel campo della produzione degli emoderivati (Fattori VIII, IX, e immunoglobuline G aspecifiche per uso endovenoso) invece ad oggi si avverte una forte necessità di controllo della qualità dei preparati in commercio. In tal senso la proteomica si propone come un valido strumento in grado di valutare e raffrontare qualità e purezza dei prodotti, non che evidenziare eventuali neoantigeni che potrebbero avere un ruolo nell'insorgenza di inibitori (dei fattori della coagulazione) o di fenomeni di ipersensibilità.

Risultati attesi nel triennio

Nell'ambito dello stoccaggio di emazie concentrate leucodeplete riteniamo che ci siano ottime probabilità di identificare dei *biomarker* proteici associati allo stress ossidativo. In letteratura esistono forti evidenze circa l'esistenza di specie proteiche citosoliche in grado di migrare verso la membrana in condizioni di forte stress ossidativo. L'identificazione di tali *biomarker* permetterebbe: i) una valutazione accurata, riproducibile e quindi attendibile dello stato di conservazione delle emazie in condizioni di aerobiosi (nell'arco dei 42 giorni di stoccaggio); ii) una valutazione biologica della qualità dei procedimenti di stoccaggio in condizioni di anaerobiosi, essenziale per la messa a punto di nuovi metodi di stoccaggio in atmosfera inerte.

Ad oggi l'organizzazione macromolecolare dei complessi multiproteici del plasma risulta poco indagata. L'attività biologica dei complessi multiproteici implicati nel processo della coagulazione sanguigna risulta essere subordinata al mantenimento di una conformazione nativa. Tali strutture potrebbero subire dei danni durante il processo di congelamento-scongelo del plasma. Ci aspettiamo che un'analisi del proteoma nativo del plasma, prima e dopo il procedimento di produzione del plasma fresco congelato, possa evidenziare una variazione dei livelli dei complessi multiproteici della coagulazione.

Dalla comparazione proteomica di emoderivati di origine plasmatica e ricombinante ci attendiamo di identificare diversi "contaminanti proteici". Soprattutto nel caso degli emoderivati ricombinanti riteniamo che ci siano buone possibilità di identificare specie proteiche derivanti dal processo di produzione della molecola ricombinante.

Trasferibilità dei risultati

I risultati prodotti nell'ambito dello studio potrebbero aprire nuovi scenari nella pratica trasfusionale per quanto riguarda:

- Lo stoccaggio di concentrati di emazie. Lo sviluppo di metodiche riproducibili per la conservazione in condizioni di anaerobiosi permetterebbe un miglioramento della qualità del sangue trasfuso con una riduzione delle complicazioni post trasfusionali;
- La conservazione del PFC. L'eventuale scoperta di una riduzione della quantità dei complessi multiproteici della coagulazione associata al procedimento di produzione del PFC, potrebbe indurre una revisione di tale procedimento;

e nella pratica industriale:

- il controllo di qualità della produzione di emoderivati di origine plasmatica e ricombinante.

Attività Banche Cordonali (ABC): raccolta e studio dei dati relativi all'attività di bancaggio di unità di sangue placentare per trapianto allogenico nelle banche italiane di sangue del cordone ombelicale

Il CNS collaborerà al progetto di raccolta e studio dei dati relativi all'attività di bancaggio di unità di sangue placentare per trapianto allogenico nelle banche italiane di sangue del cordone ombelicale condiviso con la *Milano Cord Blood Bank*, Centro di Medicina Trasfusionale, Terapia Cellulare e Criobiologia della Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, al fine di migliorare e standardizzare le attività di bancaggio di sangue cordonale. Obiettivo del presente progetto è raccogliere i dati di attività 2009-2011 delle banche del sangue del cordone ombelicale (o sangue placentare) italiane in un database nazionale localizzato presso il CNS. Il database verrà sviluppato sulla base dei modelli preliminari realizzati dalla *Milano Cord Blood Bank* per un analogo censimento delle attività delle banche italiane nel 2007 e 2008 e raccoglierà ed elaborerà periodicamente i dati sulle donazioni raccolte, caratterizzate, congelate e distribuite per trapianto di cellule staminali emopoietiche ai centri italiani e stranieri. Questo tipo di trapianto è attualmente una procedura terapeutica standard per il trattamento di gravi patologie ematologiche dell'età pediatrica e adulta. A fianco della sorgente cellulare tradizionale, rappresentata dal midollo osseo e dal sangue periferico dopo mobilizzazione con fattori di crescita, si è consolidato negli ultimi 20 anni l'uso del sangue placentare, raccolto dopo il parto dal cordone ombelicale previo consenso informato della madre. Circa 500.000 donazioni di sangue placentare sono attualmente disponibili in un centinaio di banche che conservano questo particolare tipo di sangue allo stato congelato. In Italia sono attualmente attive 18 banche, con un inventario totale di circa 28.000 donazioni, che hanno consentito la realizzazione di circa 800 trapianti. Rispetto alla procedura consolidata di trapiantare una unità di sangue placentare, studi recenti eseguiti su alcune centinaia di pazienti hanno dimostrato che l'impiego di due unità di sangue placentare per trapiantare lo stesso paziente migliora significativamente la sopravvivenza dei pazienti.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto consentirà di pianificare e monitorare nel tempo il complesso sistema di donazione, *banking* e trapianto del sangue placentare italiano, contribuendo ad ottimizzare le risorse messe a disposizione delle banche. L'attività nazionale va peraltro considerata nel contesto mondiale. A tale proposito, nel 2004 l'*Institute of Medicine* (US) ha pubblicato la raccomandazione di triplicare l'inventario esistente, allo scopo di garantire un ottimo livello di compatibilità e dose cellulare – i parametri maggiormente associati al successo del trapianto – al 90% dei pazienti caucasici. È pertanto necessario espandere il patrimonio italiano del sangue placentare per poter offrire le migliori opportunità di trattamento ai pazienti, ricordando altresì

che ogni Paese ha necessità di importare circa il 40% delle donazioni di cellule staminali emopoietiche, per ragioni legate al profilo immunogenetico delle diverse popolazioni e alla compatibilità fra donatore e ricevente, definita sulla base del sistema HLA. Per le stesse ragioni, ogni Paese può esportare una parte rilevante del proprio inventario, contribuendo al successo del trapianto a livello internazionale e recuperando una parte significativa dei costi di raccolta, caratterizzazione, criopreservazione e distribuzione del sangue placentare tramite il rimborso internazionale di circa 20.000 euro/dollari per unità ceduta (17.000 euro in Italia). Questa tariffa si basa sulla considerazione che solo una piccola parte dell'inventario (5-10%?) verrà verosimilmente utilizzata a livello clinico - a causa dell'elevato polimorfismo del sistema HLA e che il costo di bancaggio ammonta a circa 1.000 euro per unità.

Trasferibilità dei risultati

I risultati prodotti potranno essere trasferiti alle Regioni, consentendo di: i) documentare lo sviluppo dell'inventario di sangue placentare disponibile per trapianto allogenico in tutte le banche pubbliche italiane; ii) correlare l'attività di *banking* con l'entità delle risorse economiche utilizzate da tutte le banche; iii) pianificare la continuazione delle attività di bancaggio del sangue placentare a livello nazionale dopo il 2011. Questi dati potranno essere valorizzati nel contesto dei rendiconti di attività del Registro Italiano Donatori di Midollo Osseo di Genova (IBMDR), che gestisce il registro dei donatori di cellule staminali emopoietiche italiani, e del Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO).

Ruolo della via di segnalazione beta-adrenergica nella cardiomiopatia da accumulo secondario di ferro

La collaborazione scientifica con il Reparto di Farmacologia preclinica del Dipartimento del Farmaco è a sostegno dello studio sperimentale per contrastare l'insorgere dell'insufficienza cardiaca conseguente al sovraccarico di ferro di origine trasfusionale. La captazione di ferro nei cardiomiociti sembra avvenire principalmente attraverso un processo che non è mediato dal sistema della transferrina. Al momento la terapia dell'eccessivo deposito di ferro è incentrata sull'impiego dei chelanti del ferro, la cui efficacia rimane tuttora controversa.

Studi recenti hanno indicato che i canali del calcio di tipo L (LTCC) hanno un ruolo chiave nel trasporto di ferro all'interno dei cardiomiociti in condizioni di sovraccarico di ferro, cioè quando si verifica saturazione della transferrina e riduzione del numero dei recettori per la transferrina. Pertanto, i canali LTCC potrebbero rappresentare un nuovo target terapeutico per la riduzione dell'accumulo di ferro nei cardiomiociti. I meccanismi che regolano il processo di attivazione dei canali LTCC non sono completamente conosciuti. È noto però che la stimolazione beta-adrenergica, attraverso l'attivazione della via cAMP/PKA, è capace di indurre fosforilazione della subunità alfa1 del canale, favorendo così l'apertura del canale di calcio. Noi ipotizziamo, pertanto, che l'attivazione beta-adrenergica, una condizione ben nota in presenza di disfunzione cardiaca, possa potenziare l'ingresso di ferro nella cellula cardiaca attraverso la fosforilazione dei canali LTCC, accelerando così il progressivo deterioramento della funzione cardiaca. Nel presente progetto ci proponiamo di valutare l'impatto del blocco del sistema beta-adrenergico cardiaco sulla cardiomiopatia indotta da accumulo di ferro in un modello murino di sovraccarico di ferro.

Risultati attesi nel triennio

Questo programma ha lo scopo di valutare la relativa efficacia di una serie di manovre sperimentali tese a rallentare o evitare il progressivo deterioramento della funzione del cuore in condizioni di sovraccarico marziale, ma anche quello di chiarire la base genomica e molecolare di nuove strategie terapeutiche.

Tre diverse categorie di risultati sono attesi da questo progetto e comprendono:

- Arricchimento di conoscenze su meccanismi patogenetici della malattia. L'analisi del profilo di espressione genica in un modello sperimentale di insufficienza cardiaca da sovraccarico di ferro ha la potenzialità di mettere in luce geni che hanno un ruolo fondamentale nel processo di insufficienza cardiaca. Ciò promette sia di chiarire il meccanismo di azione di proteine che sono già sospettate di essere coinvolte nel processo, sia di identificare nuovi geni la cui espressione è legata allo sviluppo della sindrome patologica.
- Raccolta di dati genomico-funzionali che contribuiscono ad arricchire la letteratura scientifica. Gli studi dei profili di espressione genica cardiaca mediante *real-time* PCR *array* e la loro modificabilità in seguito al trattamento farmacologico o ad un intervento genetico costituiscono dati di interesse generale. Il destino finale di questi dati è la pubblicazione su riviste specializzate e la loro disseminazione attraverso congressi scientifici.
- Nuove conoscenze sul ruolo giocato dal *signaling* beta-adrenergico nell'insufficienza cardiaca da sovraccarico di ferro. Lo studio prevede il confronto tra strategie sperimentali che hanno la potenzialità di inibire lo sviluppo dell'insufficienza cardiaca con modalità diverse e dovrebbe consentire di comprendere il ruolo giocato dal *signaling* beta-adrenergico nell'insufficienza cardiaca da sovraccarico di ferro.

Trasferibilità dei risultati

La trasferibilità dei risultati di questo progetto ha valenze diverse in base alle due principali categorie di obiettivi dello studio: quella di indagine patogenetica e quella di raccolta di informazione farmacogenetica.

Lo scompenso cardiaco da sovraccarico di ferro costituisce un problema sanitario di dimensioni crescenti nei pazienti con anemia ereditaria nonostante l'impiego della terapia chelante del ferro. A differenza dei chelanti del ferro, il trattamento con beta-bloccanti dovrebbe essere particolarmente efficace nella fase iniziale di sovraccarico, riducendo l'*uptake* del ferro da parte del cardiomiocita e dunque prevenendo la progressione della malattia cardiaca. Per tale motivo, informazioni innovative in questo settore sono immediatamente trasferibili all'SSN in quanto possono apportare un effetto immediato sulla terapia e, di conseguenza, sulla prognosi. Infine è logico aspettarsi che i modelli animali che verranno messi a punto nel presente progetto costituiscono anche un elemento di trasferibilità in altri laboratori e possono essere facilmente impiegati in altre ricerche sperimentali di patologia del miocardio.

Screening nei donatori di sangue per la presenza del deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) e di sferocitosi ereditaria (HS) e valutazione della lesione da conservazione delle emazie per trasfusione normali e con difetto congenito

Il CNS collaborerà con il Reparto di Biochimica e biologia molecolare clinica del Dipartimento di EOMM nel progetto per lo screening nei donatori di sangue per la presenza del deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) e di sferocitosi ereditaria (HS) e valutazione della lesione da conservazione delle emazie per trasfusione normali e con difetto congenito. La presenza di difetti congeniti eritrocitari come il deficit di G6PD e la sferocitosi ereditaria, che è noto possono essere causa di anemia emolitica acuta o cronica, può influire in maniera determinante sulla sopravvivenza post trasfusionale dei globuli rossi conservati, ridurla drasticamente e dare luogo ad emolisi intravasale soprattutto in presenza di altri fattori scatenanti quali terapie farmacologiche, infezioni, febbre, alimenti. Dal momento che la sopravvivenza eritrocitaria è strettamente correlata allo stato metabolico ed allo stato fisico della membrana dei globuli rossi, l'indebolimento dei sistemi antiossidanti intracellulari, come in presenza di un deficit di G6PD, l'aumentata suscettibilità allo stress ossidativo e alla

denaturazione delle proteine di membrana, come nella sferocitosi ereditaria, possono innescare e accelerare quella serie di eventi che intercorrono fra l'invecchiamento eritrocitario e l'evento emolitico, con serie problematiche a carico del paziente trasfuso. Alla luce di queste osservazioni la ricerca si propone di effettuare uno screening sui donatori, afferenti al Centro Trasfusionale della Università di Roma Sapienza, per la presenza di portatori del difetto di G6PD e di difetti della membrana eritrocitaria riconducibili a sferocitosi ereditaria. Verranno sottoposti a screening per il dosaggio dell'attività enzimatica G6PD e per il test di fragilità osmotica tutti i donatori del Centro Trasfusionale dell'Università di Roma Sapienza per un periodo di 6-12 mesi e nei soggetti portatori di deficit di G6PD verrà effettuata la caratterizzazione molecolare mediante analisi genica mentre nei soggetti positivi al test di fragilità verranno effettuati i test di conferma con la caratterizzazione del difetto molecolare mediante analisi strutturale della membrana eritrocitaria. La ricerca si propone inoltre di studiare i meccanismi che sono alla base del precoce invecchiamento di tali cellule, investigando sia a livello strutturale che reologico il comportamento degli eritrociti e indagando il danno ossidativo prodotto durante l'invecchiamento in vitro indotto dalla conservazione. Verranno studiate le modificazioni reologiche, morfologiche, strutturali e metaboliche di emazie per trasfusione, conservate in soluzione preservante, dal tempo 0 fino a 42 giorni di conservazione, secondo le procedure standard. Lo studio riguarderà sia le emazie di donatori normali che quelle di donatori con difetto congenito metabolico o strutturale, individuati con lo screening e successivamente caratterizzati.

Risultati attesi nel triennio

Non esistono molti studi in letteratura sull'effetto della trasfusione di emazie con deficit di G6PD e nei pochi descritti i dati sull'emolisi posttrasfusionale nei riceventi sono contraddittori. Si ipotizza che questo possa dipendere dal fatto che nei diversi studi descritti il deficit di G6PD era dovuto a mutazioni geniche diverse, mutazioni corrispondenti a varianti diverse con caratteristiche biochimiche e cliniche eterogenee. Né sono previste indagini diagnostiche preventive sui donatori per individuare tali difetti e fino ad oggi pochissimi studi sono stati descritti sulla presenza di difetti congeniti eritrocitari nei donatori, ma nessuno sulla popolazione di donatori italiani. Non ci sono dati sulla popolazione di donatori italiani per quanto riguarda la presenza del trait sferocitico, mentre uno studio effettuato in Germania ha osservato un aumento di fragilità osmotica negli eritrociti di donatori di sangue. Si può pertanto supporre tra i donatori di sangue la presenza di portatori inconsapevoli di difetti congeniti eritrocitari e questo potrebbe giustificare la presenza di emolisi in alcuni preparati di emazie o effetti avversi sull'ospite trasfuso particolarmente in presenza di malattie preesistenti.

Gli obiettivi di questa ricerca sono effettuare: i) uno studio di prevalenza del deficit di G6PD e della sferocitosi ereditaria nei donatori di sangue, ii) una caratterizzazione dei difetti molecolari nei donatori positivi, iii) una valutazione della lesione da conservazione nei concentrati di emazie di donatori portatori di difetto congenito.

Trasferibilità dei risultati

I risultati di questa ricerca permetteranno di:

- approfondire le conoscenze sui meccanismi che sono alla base della lesione da conservazione fornendo nuovi parametri strutturali e funzionali indicativi della reale vitalità delle cellule trasfuse;
- dare 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;

- 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 riceventi;
- definire la possibilità di emolisi post trasfusionale nei riceventi in relazione al tempo di conservazione.

Studio di fattibilità per la produzione *ex vivo* di eritroblasti umani per trasfusione

La generazione *ex vivo* di globuli rossi potrà costituire un supporto nelle situazioni di carenza di tale componente del sangue. La produzione *ex vivo* di cellule eritroidi umane da impiegare nella trasfusione è un obiettivo di ricerca della *Mount Sinai School of Medicine of New York* che il CNS sta sostenendo, stabilendo un accordo collaborativo, nella sua funzione di promozione dello sviluppo tecnologico delle attività trasfusionali. In questo ambito, l'ISS ha sviluppato un sistema di coltura coperto da brevetto internazionale che permette di amplificare eritroblasti *ex vivo* in 10-14 giorni. Le colture sono iniziate con progenitori emopoietici presenti nel sangue di adulti normali, di pazienti con talassemia e da sangue di cordone. Il sistema di coltura si basa sull'inibizione reversibile esercitata dai glucocorticoidi e dagli steroidi sulla maturazione degli eritroblasti che permette loro di conservare capacità proliferativa. Dunque, eritroblasti generati *in vitro* continuano a proliferare e ad espandersi finché riforniti in modo regolare con nutrienti, fattori di crescita ed ormoni. È stato calcolato che questo sistema di coltura ha la potenzialità di generare cellule rosse in numero sufficiente per trasfusione. L'obiettivo generale di questo progetto è determinare la fattibilità di generare *ex vivo* cellule eritroidi umane in quantità sufficiente da poter essere utilizzate come prodotto di trasfusione alternativo. Idealmente, questo prodotto dovrebbe essere criopreservabile e rimanere funzionale dopo scongelamento.

Risultati attesi nel triennio

Nel corso del progetto ci proponiamo di:

- Determinare la natura (sangue di cordone o sangue adulto) e la quantità della sorgente cellulare per iniziare l'espansione delle cellule rosse;
- Migliorare il metodo di espansione riducendo gli alti volumi di coltura necessari attualmente per generare una dose trasfondibile di cellule rosse;
- Definire la composizione cellulare del prodotto di trasfusione;
- Sviluppare un processo automatizzato di espansione e conservazione del prodotto che soddisfi condizioni GMP-GTP.

Si prevede che inizialmente cellule eritroidi espanse *in vitro* saranno utilizzate nelle seguenti condizioni:

- Pazienti con gruppi sanguigni rari che sono attualmente trattati con quantità limitata di cellule rosse compatibili criopreservate in glicerolo;
- Pazienti alloimmunizzati per cui è estremamente difficile trovare attualmente sangue compatibile.

In futuro, si prevede che cellule rosse generate *ex vivo* potranno essere utilizzate per:

- Pazienti con emoglobinopatie che, se trattati con prodotti composti da cellule eritroidi immature con una prolungata vita media nell'organismo potranno beneficiare di una considerevole riduzione del fabbisogno per trasfusione e di accumulo di ferro;
- L'uso di cellule rosse generate *in vitro* come vettori di prodotti farmaceutici;
- La realizzazione di una banca nazionale di cellule generate *in vitro* e criopreservate per emergenze.

Trasferibilità dei risultati

I risultati ottenuti dallo studio potranno essere condivisi con la comunità scientifica nazionale e internazionale e si potranno avviare collaborazioni con le industrie biocellulari italiane per lo sviluppo industriale dei risultati.

Supporto organizzativo e tecnico al coordinamento della rete italiana delle banche di sangue cordonale (*Italian Cord Bank Network*)

Le Banche di sangue cordonale (SCO) sono in Italia strutture sanitarie pubbliche che, per conto dell'SSN, svolgono attività di raccolta, manipolazione minima, caratterizzazione, crioconservazione, stoccaggio, selezione e distribuzione delle cellule staminali emopoietiche cordonali per le finalità terapeutiche del trapianto allogenico di midollo osseo. Sono complessivamente 18 strutture ubicate in dieci Regioni; 16 di queste rappresentano settori di attività di Servizi Trasfusionali e due operano all'interno di Divisioni di Ematologia. A tutt'oggi le Banche hanno contribuito alla costituzione di un inventario nazionale di circa 23.000 unità e partecipano ad alimentare gli inventari dei registri internazionali, esponendo le caratteristiche immunogenetiche delle unità idonee attraverso lo sportello nazionale unico posto presso la sede del Registro Italiano dei Donatori di midollo osseo (IBMDR).

Le Banche SCO svolgono le attività di banking del sangue cordonale secondo standard definiti da linee guida nazionali (Conferenza Stato-Regioni, Atti n. 1770 del 17 luglio 2003) e internazionali (FACT-NETCORD) di comprovata qualità ed efficacia. Tutte le strutture hanno intrapreso un percorso di qualificazione delle proprie attività ottenendo e/o preparandosi a conseguire l'accreditamento internazionale FACT.

Nel rispetto della normativa nazionale attualmente vigente (OM della Salute 04/05/2007, prorogata dall'OM 29/04/2008), che prevede la raccolta e la conservazione di unità cordonali solo per uso allogenico in territorio italiano mentre prevede per la raccolta autologa la possibilità di esportazione in banca estera previa autorizzazione del Ministero della Salute, non sono presenti a tutt'oggi sul territorio nazionale Banche private, che però attraverso uffici amministrativi già operativi gestiscono le campagne informative e il percorso per l'esportazione e conservazione del sangue cordonale a scopo autologo in banche estere.

La prossima applicazione dell'articolo 8-bis della L n. del 28/02/2007, seppur subordinata alla istituzione per decreto della rete nazionale delle Banche SCO, potrebbe modificare fortemente lo scenario attuale sia per l'introduzione della conservazione autologa-allogena del sangue cordonale, sia per l'apertura alla conservazione, anche in Italia, presso strutture profit autorizzate. La conservazione dello SCO presso queste strutture potrà riguardare le unità cordonali a uso allogenico, parte integrante dell'inventario nazionale da utilizzare a scopo di trapianto emopoietico e quindi visibili nei registri internazionali attraverso l'IBMDR.

Per quanto premesso il CNS, in qualità di *competent authority*, braccio tecnico del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, deve creare i presupposti organizzativi per mantenere il necessario controllo affinché tutte le strutture, che saranno autorizzate ad operare, applichino gli standard operativi di riferimento nonché rispettino i requisiti di qualità e sicurezza, internazionalmente condivisi, che garantiscono la rispondenza del prodotto biologico alle finalità terapeutiche per cui è destinato. Il CNS deve inoltre, per mandato istituzionale, favorire lo sviluppo e il miglioramento continuo di protocolli operativi in merito alla raccolta, manipolazione minima e conservazione del sangue cordonale, che siano condivisi e applicati in tutte le strutture operanti sul territorio nazionale.

Risultati attesi nel triennio

In attuazione dell'articolo 10, comma 3, della L n. 219/05 il Ministero del Lavoro, Salute e Politiche Sociali emanerà il decreto di istituzione della Rete nazionale di banche per la

conservazione del sangue di cordone ombelicale, di seguito denominata ITCBN (*Italian Cord Blood Network*), affidando al CNS, come previsto dalla succitata L 219/05, le funzioni di coordinamento e di controllo tecnico-scientifico della rete di intesa con la Consulta tecnica permanente per il sistema trasfusionale, avvalendosi dei necessari raccordi con il CNT per gli aspetti di carattere clinico-assistenziale correlati al trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche.

È previsto il raggiungimento dei seguenti obiettivi:

- Definizione delle modalità operative della ITCBN e l'attuazione di incontri periodici;
- Definizione di requisiti qualitativi e quantitativi applicabili alle unità di SCO e dei requisiti organizzativi delle Banche a garanzia di uniformità dei livelli di assistenza su tutto il territorio nazionale;
- Costituzione di una commissione tecnica permanente multidisciplinare per la definizione e l'aggiornamento continuo delle indicazioni cliniche alla conservazione del sangue cordonale a scopo autologo familiare;
- Definizione e costituzione di gruppi di lavoro monotematici, all'interno della ITCBN, finalizzati alla emanazione di documenti e protocolli operativi condivisi e applicati in tutta la ITCBN.

Trasferibilità dei risultati

L'attività svolta nell'ambito del progetto permetterà di migliorare l'operato delle banche di sangue cordonale (*Italian Cord Bank Network*) sostanziale con un sempre migliore coordinamento della rete. La rete ha infatti la finalità di creare le opportune sinergie tra i professionisti che operano nelle Banche al fine di favorire l'applicazione di uniformi modalità operative per tutte le fasi del *banking* di SCO, di condividere obiettivi quantitativi e qualitativi per l'incremento dell'inventario nazionale, di promuovere la corretta informazione dell'opinione pubblica sulla donazione del sangue cordonale, di stimolare iniziative di ricerca in questo ambito.

Tecniche di Amplificazione Genica: sviluppo e titolazione delle preparazioni di riferimento HCV RNA, HIV RNA, HBV DNA, WNV RNA e di un pannello per HBV DNA

L'introduzione dell'obbligatorietà di eseguire gli esami con tecniche di amplificazione genica (*Nucleic-acid Amplification Technique*, NAT) per la ricerca dei virus HCV, HIV, HBV nel sangue donato ha comportato una crescente richiesta di preparazioni di riferimento da parte delle strutture trasfusionali che eseguono la NAT. Le preparazioni di riferimento per la NAT sono utilizzate per la convalida dei metodi NAT, degli operatori o come *run control*. Il CNS ha ritenuto opportuno sostenere e partecipare al progetto per lo sviluppo e la titolazione delle preparazioni di riferimento HCV RNA, HIV RNA, HBV DNA, WNV RNA e di un pannello per HBV DNA proposto dal Reparto di Prodotti biologici del CRIVIB. Il progetto si pone l'obiettivo di supportare la standardizzazione delle tecniche di amplificazione genica applicate alla ricerca dei virus HCV, HIV, HBV e WNV finalizzata alla qualificazione biologica del sangue e dei suoi componenti. In particolare il progetto si focalizzerà sui seguenti aspetti:

- Sviluppo di preparazioni di riferimento nazionali per HCV RNA, HIV RNA e HBV DNA da impiegare nei saggi di amplificazione genica finalizzati alla qualificazione biologica del sangue e degli emocomponenti. Le preparazioni saranno titolate in UI/mL contro i rispettivi Standard Internazionali attraverso studi collaborativi che coinvolgeranno alcune strutture trasfusionali;
- Collaborazione con le strutture trasfusionali al fine di definire una concentrazione virale e un protocollo standardizzato per la preparazione dei *run control*;
- Sviluppo e titolazione di una preparazione nazionale per il *West Nile Virus* attraverso uno studio collaborativo con alcune Strutture Trasfusionali sul territorio nazionale;

- Sviluppo e titolazione in UI/ml di un pannello di campioni HBV DNA contro lo Standard Internazionale attraverso uno studio mini-collaborativo.

Risultati attesi nel triennio

Gli obiettivi del presente studio sono i seguenti:

- Fornire alle strutture trasfusionali preparazioni di riferimento per HCV, HIV, HBV, WNV da impiegare nella convalida dei metodi e sistemi diagnostici NAT, nella convalida degli operatori o come *run control* a titolo noto da impiegare nelle sedute analitiche al fine di monitorare la performance delle stesse e la competenza degli operatori;
- Fornire alle strutture trasfusionali un supporto tecnico-scientifico per lo sviluppo di procedure standard per l'allestimento di *run control*;
- Fornire alle strutture trasfusionali un pannello di campioni HBV di diverso genotipo e concentrazione da impiegare nelle fasi di valutazione e convalida delle metodiche.

Trasferibilità dei risultati

Lo sviluppo e la distribuzione di preparazioni di riferimento nazionali per la convalida delle metodiche NAT eseguite per la ricerca dei virus per HIV, HBV, HCV contribuisce ad assicurare i requisiti per la qualità dei controlli virologici eseguiti all'interno dei servizi trasfusionali e a mantenere elevati i livelli di sicurezza del sangue donato.

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 e efficacia delle piastrine preparate con procedure standardizzate impiegando l'inattivazione dei globuli bianchi (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 globuli bianchi, 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 e 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.

La proteomica offrirà un nuovo approccio per il controllo di qualità delle piastrine e per incrementare la qualità e la sicurezza di questi prodotti terapeutici. La valutazione globale delle piastrine sottoposte a inattivazione dei patogeni dai servizi trasfusionali italiani fornirà evidenze per decidere sull'uso di queste tecnologie di inattivazione.

Risultati attesi nel triennio

L'obiettivo primario dello studio clinico è quello di dimostrare che le piastrine da sangue intero (preparate con il metodo del *buffy coat* senza leucofiltrazione e con trattamento fotochimico per l'inattivazione dei patogeni) e le piastrine da aferesi (leucodeplete e sottoposte a trattamento fotochimico per l'inattivazione dei patogeni), trasfuse a pazienti oncoematologici, hanno incidenza di alloimmunizzazione-HLA simile o minore rispetto alle piastrine non trattate. 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 sono: 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 (come raccomandato dalla *Position Paper Health Technology Assessment for Medical Devices in Europe, What has to be considered* della EUCOMED). Obiettivi secondari dello studio di proteomica sono: 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. I dati forniranno agli amministratori regionali e agli ospedali una base razionale per le valutazioni economiche in merito all'eventuale introduzione delle tecnologie di inattivazione dei patogeni nella produzione di emocomponenti da destinare a categorie selezionate di pazienti o a tutti i pazienti. I dati 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), contribuendo ad un adeguato governo clinico di questo peculiare aspetto della produzione di emocomponenti. 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 fornirà formazione ed esperienza allo staff clinico e tecnico dei servizi trasfusionali coinvolto nell'emovigilanza attiva. Questa esperienza può essere facilmente trasferita agli altri servizi trasfusionali che non hanno partecipato allo studio.

La proteomica fornirà nuove e utili conoscenze sui cambiamenti che si verificano durante il trattamento e la conservazione degli emocomponenti, introducendo un nuovo approccio alla valutazione qualitativa e quantitativa degli emocomponenti. Lo studio di proteomica fornirà 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. L'insieme dei dati dello studio in vivo e di quello in vitro fornirà dati che potranno, auspicabilmente, avere globalmente un impatto originale e utile nell'ambito clinico della terapia trasfusionale.

Valutazione esterna di qualità (VEQ) delle tecniche diagnostiche di amplificazione genomica (NAT) finalizzate alla qualificazione biologica dei prodotti ad uso trasfusionale (sangue, emocomponenti, prodotti plasma derivati), programma 2008-2009-2010

La partecipazione a studi di *proficiency testing* è uno dei requisiti per la qualità richiesti ai servizi trasfusionali dal DL.vo n. 208 del 9 novembre 2007. A questo scopo il CNS si è avvalso dell'esperienza del Reparto Prodotti biologici del CRIVIB istituendo una collaborazione per l'avvio di un programma di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ) dei test dedicati alla ricerca del genoma di HCV, HIV e HBV. La ricerca degli acidi nucleici virali nel sangue mediante tecniche di amplificazione genica (NAT) rappresenta un valido strumento per ridurre il rischio

di trasmissione virale attraverso l'uso del sangue e suoi derivati. L'impiego dei kit commerciali, standardizzati e convalidati dal produttore e che presentano elevate performance in termini di sensibilità e specificità, ha contribuito enormemente all'armonizzazione dei risultati tra i laboratori riducendo al minimo il rischio di errore da parte dell'operatore. Tuttavia i laboratori devono continuamente verificare la qualità delle proprie tecniche diagnostiche attraverso la partecipazione a programmi ufficiali di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ).

Il progetto di VEQ per HCV, HIV e HBV prevede diverse fasi:

- pianificazione dello studio, organizzazione dei pannelli e stesura delle note informative e della modulistica;
- selezione dei campioni positivi titolati in UI/ml per l'allestimento del pannello;
- saggi pilota per la ricerca della diluizione ottimale dei campioni positivi;
- produzione dei pannelli e verifica analitica;
- confezionamento e distribuzione con corriere dedicato ai laboratori (due invii per anno);
- raccolta ed elaborazione dei dati e stesura di un report annuale da distribuire ai partecipanti.

Risultati attesi nel triennio

La partecipazione ai programmi di VEQ, oltre a rappresentare un requisito normativo cogente, è certamente lo strumento più idoneo per misurare la correttezza delle performance e dei risultati analitici mediante una valutazione basata sul confronto con altri laboratori. Attraverso la valutazione dei risultati ottenuti nel corso di un programma VEQ è possibile misurare globalmente l'efficacia del sistema di gestione per la qualità adottato all'interno del proprio laboratorio, valutare la performance delle procedure analitiche adottate (metodica, strumentazione, reagenti, calibratori), generare risultati in linea con i parametri e le specifiche del saggio e, non ultimo, evidenziare eventuali criticità nelle fasi pre e post-analitiche dell'intero processo diagnostico.

Trasferibilità dei risultati

Dalla partecipazione al programma di VEQ i servizi trasfusionali potranno:

- confrontare l'affidabilità delle proprie prestazioni analitiche con quelle di altri laboratori;
- prendere confidenza con la tecnologia in uso, e in particolare conoscere i limiti della metodica NAT impiegata;
- individuare gli elementi di criticità del processo analitico.

Il singolo servizio trasfusionale, a seguito della comunicazione dei propri risultati, potrà valutare il bisogno di riesaminare le procedure operative adottate ed eventualmente attivare adeguate misure correttive.

Centro Nazionale Sangue

Attività di controllo, valutazione, parere

Attività di audit nell'ambito dei percorsi di trapianto emopoietico

Con il Decreto legislativo n. 191 del 6 novembre 2007, la legislazione italiana ha recepito la Direttiva europea 2004/23/CE del Parlamento e del Consiglio d'Europa del 31 marzo 2004, 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 (CSE) 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 del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali 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, così come richiesto dalla direttiva europea. 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, stabilendo una stretta collaborazione con il CNT, per i suoi specifici ambiti di competenza. Tali ambiti sono 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 all'avvio di questo iter, i PT hanno iniziato un percorso di accreditamento tecnico-professionale secondo gli standard internazionali stabiliti dalla *Joint Accreditation Committee ISBT-EBMT* (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.

Piano triennale

Nel corso del 2009 CNS e CNT proseguiranno la conduzione delle 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. Le attività saranno 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 (2009-2010) è previsto il completamento delle prime visite ispettive ai PT non ancora ispezionati secondo un calendario coordinato con quello dell'organizzazione JACIE. È però possibile che in futuro tale attività venga condotta da CNS/CNT in maniera coordinata con i percorsi regionali di autorizzazione e accREDITAMENTO in attuazione a quanto disposto dal Decreto 191/2007.

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 corso dell'anno 2008 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 riguardano l'etichettatura delle unità di sangue ed emocomponenti ed è stata resa obbligatoria l'etichetta di validazione per evitare che unità non validate possano invece essere rilasciate. Tali linee guida prevedono 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*. 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). Riguardo al finanziamento delle attività trasfusionali, il CNS ha espresso il proprio parere sugli indicatori da applicare per la ripartizione dei fondi stanziati a beneficio delle Regioni per gli adeguamenti richiesti alle stesse e ai servizi trasfusionali dalla Legge 219/2005 e dai Decreti Legislativi 207/2007 e 208/2007.

Piano triennale

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. Nel corso del 2009 saranno rese definitive le linee guida sui requisiti da rispettare nel processo di bancaggio del sangue da cordone ombelicale. Nel corso del 2009 e 2010 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

Il CNS fornisce supporto tecnico all'AIFA per il controllo dei medicinali derivati dal sangue secondo i criteri e le modalità definiti in base alle normative nazionali e dell'Unione Europea, con riferimento agli aspetti inerenti alla raccolta, produzione, conservazione e distribuzione del sangue e del plasma umani sulla cui produzione non interviene un processo industriale, nonché alle valutazioni epidemiologiche, cliniche e del rischio associato alle malattie trasmissibili con il sangue e con i suoi prodotti. Tale attività comprenderà l'esecuzione di visite ispettive presso i centri di raccolta esteri (oltre a quelli italiani nel contesto dell'applicazione del 19 e 20 della legge 21 ottobre 2005 n. 219), il controllo sui medicinali plasmaderivati per gli aspetti di competenza sopra esplicitati, la definizione di flusso informativo con AIFA sui dati di distribuzione dei medicinali plasmaderivati. Inoltre, nell'ambito della collaborazione con AIFA è prevista la stesura di pareri tecnici su documentazione tecnica dei medicinali plasmaderivati.

Piano triennale

Nell'ambito dell'attuazione dell'articolo 15 della legge 21 ottobre 2005, il CNS fornirà supporto al Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali nei lavori istruttori finalizzati all'emanazione di un decreto ministeriale di identificazione dei centri e delle aziende di frazionamento, nonché della definizione di schema tipo di convenzione con le stesse aziende, nonché il monitoraggio quantitativo e qualitativo del processo d'invio di plasma alle aziende farmaceutiche produttrici di farmaci emoderivati. Particolare rilievo sarà attribuito alla gestione delle eccedenze di plasma e plasmaderivati appartenenti alle regioni italiane, dando operatività alle indicazioni fornite dal gruppo di esperti istituito *ad hoc*.

Nell'ambito del programma nazionale plasma di cui al comma 2, art. 26 del DL.vo 261 del 20 dicembre 2007, saranno svolte attività di programmazione, valutazione e monitoraggio relativamente al governo dell'offerta (produzione plasma e plasmaderivati) e della domanda (linee guida) e del grado di raggiungimento degli obiettivi di miglioramento di qualità del sistema identificati nel programma stesso.

Nell'ambito dei compiti assegnati dalla Commissione Europea, e in particolare del TAIEX, verrà fornita attività di formazione in materia trasfusionale anche in relazione ai progetti di collaborazione internazionale.

Programma di autosufficienza nazionale

Ai sensi dell'art. 12 della Legge 21 ottobre 2005 n. 219 il CNS fornisce indicazioni al Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali e alle Regioni 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. Nel corso dell'anno 2008, 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.

Gli obiettivi quantitativi su base annuale previsti dal Programma di autosufficienza nazionale per l'anno 2008 sono stati pienamente conseguiti. Infatti, è stata registrata una produzione media di unità di globuli rossi pari a 42 unità/1.000 pop/anno rispetto a 41,9 programmato, e un consumo medio pari a 41,7 unità/1000 pop/anno rispetto a 41,8 programmato. Per quanto riguarda il plasma inviato alla lavorazione industriale per la produzione di farmaci emoderivati, il 2008 ha fatto segnare il più elevato incremento mai registrato (+38.355 Kg, pari a +6,3%). Per quanto riguarda i principali farmaci emoderivati, è stato registrato un elevato consumo medio di albumina, stimato in 600 g/1.000 pop/anno, significativamente più alto rispetto alle media dei Paesi europei ed extra-europei comparabili.

La situazione di carenza estiva 2008 è stata presidiata e risolta 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 del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali e del CNS nel mese di luglio; iii) attivazione di un programma straordinario in collaborazione con la Regione Campania e con le Associazioni e Federazioni dei donatori di sangue. Nei restanti periodi dell'anno, alcune situazioni di occasionale carenza non coperte da accordi convenzionali fra Regioni sono state sistematicamente compensate.

Al fine di rilevare con sempre maggiore affidabilità la domanda di farmaci emoderivati, nel corso del 2008 il CNS ha stabilito un rapporto di collaborazione con l' Agenzia Italiana del Farmaco.

Piano triennale

Nel corso del 2009 il CNS effettuerà specifiche azioni di monitoraggio mensile delle attività produttive e dei consumi relativamente alla programmazione definita dalle Strutture regionali di coordinamento per le attività trasfusionali e finalizzate a garantire la costante autosufficienza di globuli rossi e delle quote di plasma da inviare alla lavorazione industriale. La messa in opera prevista per la metà del 2009 del Sistema informativo dei servizi trasfusionali (SISTRA), istituito con il Decreto del Ministro della Salute del 21 dicembre 2007, doterà le Regioni di un sistema di raccolta e monitoraggio dei dati di attività delle strutture trasfusionali. A livello nazionale, il sistema informativo consentirà di avere a disposizione, in tempi utili, elementi informativi e strumenti di monitoraggio e verifica che certamente faciliteranno le iniziative di programmazione per l'autosufficienza.

La programmazione per l'anno 2009 prevede un incremento di produzione di unità di globuli rossi pari a 1,7%, a fronte di una previsione d'incremento dei consumi di 1,3%. Il fabbisogno compensativo delle Regioni carenti è previsto intorno a 75.000 unità, a fronte del quale risultano cessioni programmate da altre Regioni per circa 65.000 unità e la disponibilità di ulteriori 19.800 unità per il completamento delle cessioni programmate, per compensazioni occasionali, nonché per fronteggiare situazioni straordinarie non prevedibili. Specifici interventi sono previsti per presidiare eventuali carenze estive. In relazione agli eventi epidemici da virus Chikungunya e *West Nile* occorsi, rispettivamente, nel 2007 e 2008, è inoltre prevista la definizione di un preparedness plan finalizzato a presidiare gli effetti sul sistema sangue di eventuali riaccensioni epidemiche sostenute da virus emergenti e riemergenti.

Per quanto concerne il plasma da inviare alla lavorazione industriale è programmato un incremento del 3,8%. Attraverso la collaborazione con l'AIFA, nel corso del 2009 il CNS disporrà di dati sufficientemente affidabili da utilizzare ai fini del monitoraggio e della programmazione della produzione di plasma da inviare alla lavorazione farmaceutica. Saranno pianificati interventi volti ad analizzare l'utilizzo dei farmaci emoderivati a maggior consumo al fine di promuoverne l'uso clinico appropriato, con particolare riferimento all'albumina.

Nel prossimo triennio saranno intraprese azioni per quanto concerne:

- la modifica delle relazioni compensative economico-finanziarie interregionali per la cessione e acquisizione di emocomponenti e farmaci emoderivati, con riferimento all'inserimento di tali scambi compensativi nell'ambito della organizzazione interregionale della mobilità sanitaria;
- la promozione di iniziative di formazione ed aggiornamento finalizzate al miglioramento continuo delle funzioni di sistema ed all'adeguamento di dette funzioni ai nuovi compiti richiesti dalla normativa vigente ed al progresso tecnico-scientifico in materia di qualità e sicurezza dei prodotti e delle prestazioni trasfusionali;
- la promozione dell'attivazione di accordi interregionali per la gestione dell'invio del plasma alla lavorazione industriale e per la contrattualizzazione e assegnazione dei servizi di conto-lavorazione presso le Regioni ove tali accordi non siano già effettuati;
- la verifica dell'applicazione delle indicazioni del Programma annuale di autosufficienza nazionale 2008 per quanto concerne il miglioramento della qualità della produzione degli emocomponenti;
- le linee guida per l'utilizzo clinico appropriato degli emocomponenti e dei farmaci emoderivati;
- le indicazioni del Programma 2008 inerenti ai Comitati per il buon uso del sangue;
- le indicazioni del Programma 2008 inerenti alla ricognizione di banche di globuli rossi congelati di fenotipi rari e per le emergenze, e relative basi di dati.

Centro Nazionale Trapianti

Attività di ricerca

Prevenzione e gestione degli eventi avversi nel processo di prelievo e trapianto di organi e tessuti: criticità del sistema e *clinical governance*

All'interno del panorama dell'assistenza sanitaria, il trapianto è un prodotto che a differenza di altre prestazioni medico-chirurgiche si caratterizza per la sua natura multifattoriale e multidisciplinare, dove ogni processo di donazione ha una sua unicità, ogni ricevente ha una sua specificità e non sempre esistono relazioni stabili tra prestazioni erogate e risultati ottenuti. La complessità di cui è caratterizzato il processo di donazione e trapianto rende pertanto necessario monitorare affinché le strutture coinvolte operino in standard di qualità e sicurezza.

Risultati attesi nel triennio

Creazione di un piano organizzativo e di *clinical governance* in grado di prevenire i rischi connessi al processo di donazione e trapianto.

Trasferibilità dei risultati

Potenziamento della qualità gestionale delle strutture che partecipano al processo e in modo particolare dei centri di coordinamento locale, regionale e interregionale.

Impatto del *matching* donatore/ricevente nei confronti dell'outcome del trapianto di fegato (breve, medio e lungo termine)

Costituiscono obiettivi del progetto: l'implementazione della raccolta delle informazioni cliniche dei centri di trapianto, relativamente alle caratteristiche del donatore, del ricevente e della fase operativa del trapianto di fegato; l'elaborazione dei dati e l'individuazione di fattori prognostici dell'outcome a breve termine (*primary non function* e *delayed non function*) e a lungo termine, attraverso il follow-up prospettico per complessivi cinque anni di coorte costituita da 1.000 trapianti consecutivi eseguiti dai vari centri italiani e l'eventuale valutazione retrospettiva dei dati in possesso del CNT.

Programma Nazionale di coordinamento delle attività per la sicurezza dalle infezioni nei trapianti d'organi, tessuti e cellule

Realizzazione di un Programma Nazionale di coordinamento delle attività per la sicurezza dalle infezioni nei trapianti d'organi e tessuti (ProSIT), gestito attraverso il coordinamento dai proponenti con obiettivo la promozione della sicurezza dagli agenti infettivi.

Il coordinamento dei proponenti opererà quale organo di indirizzo e riferimento, riconosciuto a livello nazionale, per la sicurezza dagli agenti infettivi in campo di trapianto d'organi e tessuti. Verrà prodotta un'attività che integrerà quella attualmente effettuata dal CNT.

L'attività del coordinamento riguarderà in particolare il ricevente di organi, la donazione e il trapianto di organi tessuti e cellule, i laboratori, la gestione degli avventi avversi.

Risultati attesi nel triennio

Rappresenta il primo obiettivo del progetto la determinazione e individuazione delle soglie di rischio: rischio inaccettabile, rischio aumentato ma accettabile; rischio calcolato; rischio non valutabile; rischio standard. Il secondo obiettivo è quello di definire e codificare le modalità operative del processo di valutazione del rischio sottolineando che il processo che porta alla valutazione dell'idoneità del donatore di organi è un processo multifasico e multidisciplinare e che la valutazione si deve basare, in tutti i casi, su: anamnesi; esame obiettivo; esami strumentali e di laboratorio (questi ultimi da eseguire su un campione raccolto prima di eventuali trattamenti che comportino emodiluizione); esami istopatologici e/o autoptici eventualmente suggeriti dai tre precedenti livelli di valutazione.

Studio di fattibilità per gli scambi internazionali di organi

L'attività di donazione e trapianto di organi è molto diversa nei vari Paesi europei, ma la carenza di organi è un problema comune.

Lo scambio di organi tra Stati membri è già una pratica diffusa tra Stati membri. Esistono tuttavia grandi differenze tra gli organi scambiati oltre frontiera tra Stati membri che stabiliscono enti e regole per lo scambio internazionale di organi come Eurotransplant e Scandiarttransplant e gli altri Stati membri, che lo effettuano sulla base di accordi bilaterali.

Senza tali accordi di scambio plurilaterali, gli Stati membri scambiano molti meno organi, ma la percentuale può aumentare nel caso in cui alcuni accordi bilaterali siano in essere.

Le differenze nelle percentuali di scambio indicano che il potenziale di scambio non è raggiunto e che tuttavia gli scambi transfrontalieri potrebbero avere chiari benefici, dato che un *pool* di donatori più ampio è importante per soddisfare i bisogni di tutti i pazienti in lista di attesa. Questo è particolarmente vero per i pazienti difficili (quali ad esempio i pediatrici, le urgenze oppure i pazienti iperimmunizzati che richiedono un *matching* donatore-ricevente altamente specifico) e gli Stati membri di piccole dimensioni per superficie o popolazione

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi da questo progetto è individuare valide basi statistiche per valutare se lo scambio internazionale di organi sia vantaggioso e fattibile, quali Stati membri ne beneficerebbero e quali categorie di pazienti e in caso positivi, quali possibili protocolli potrebbero essere adottati per attuare un programma internazionale per far fronte a queste esigenze.

Centro Nazionale Trapianti

Attività di controllo, valutazione, parere

Certificazione nazionale dei coordinatori

Sulla base di quanto raccomandato dal Consiglio d'Europa e a completamento del progetto di qualità intrapreso presso i Centri di Coordinamento regionali e interregionali, il CNT ha avviato un progetto di certificazione dei singoli operatori che partecipano e controllano il processo di donazione degli organi.

L'obiettivo di tale certificazione è quello di consolidare e migliorare la qualità dell'intero processo, che va dall'identificazione del potenziale donatore all'allocazione degli organi, e la qualità del lavoro svolto, documentando l'iter formativo, l'esperienza e la preparazione specifica del personale sanitario che partecipa attivamente all'intero processo. La Commissione Nazionale per la Certificazione dei Coordinatori, ufficialmente istituita dalla Consulta Tecnica Permanente per i Trapianti e composta da esperti nazionali dei Centri regionali e interregionali ha definito sulla base dell'esperienza maturata in campo europeo, dei livelli di qualità raggiunti in Italia, della normativa vigente e delle raccomandazioni nazionali e internazionali, la tipologia dei candidati che possono accedere alla Certificazione (personale sanitario dei Coordinamenti Locali, medici rianimatori che partecipano al processo di donazione, personale sanitario dei Centri regionali, interregionali e nazionali) i criteri minimi e gli standard richiesti, rivedibili anno per anno, che ha diffuso mediante un Bando annuale, adeguatamente pubblicizzato dal Centro Nazionale, ai Centri regionali e interregionali.

Piano triennale

La Certificazione nazionale per i Coordinatori interrotta nell'anno 2008, verrà nuovamente riproposta a tutta la rete trapiantologica dall'anno 2010. I criteri minimi e gli standard richiesti ai singoli coordinatori ai fini della certificazione, verranno annualmente aggiornati sulla base delle nuove disposizioni delle Linee Guida nazionali e delle Direttive Europee in tema di donazione e trapianto di organi e tessuti.

Controllo del processo di donazione e trapianto tramite SIT

Il Sistema Informativo del CNT (SIT) nasce nel 1999, anno in cui la legge n. 91 non solo regola la donazione e il trapianto degli organi, ma sancisce anche la necessità di informatizzare le attività del Centro. In particolare l'armonizzazione delle 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".
- Processo di donazione e trapianto

Il coordinamento locale ha il compito di seguire le fasi del processo di donazione e di trasmettere al centro regionale i dati relativi ai potenziali donatori.

Il Centro Regionale Trapianti o il Coordinamento interregionale (a seconda delle differenti organizzazioni) coordinano le attività di raccolta e trasmissione dei dati al SIT relativi al processo di donazione e trapianto, nonché la valutazione del rischio del donatore. Il Centro Trapianti sarà responsabile dell'invio dei dati di follow-up per i trapianti di propria competenza.

- Liste di attesa
I gestori di lista (Centri regionali o interregionali), con frequenza mensile, inviano al SIT le liste di attesa e tutte le relative movimentazioni. Le liste inviate vengono processate dal Sistema e ogni eventuale errore presente viene segnalato al Gestore di Lista.
- Dichiarazioni di volontà
La donazione degli organi è regolamentata dalla legge n. 91 del 1 aprile 1999 e dal decreto ministeriale dell'8 aprile 2000. Il SIT consente la raccolta delle dichiarazioni di volontà depositate presso le ASL. I coordinamenti possono così verificare se è presente nel Sistema l'espressione della volontà del potenziale donatore. Nel corso dell'anno 2005 è stato siglato un accordo per la visualizzazione nel SIT dei testamenti olografi dell'AIDO.
- Programma Nazionale Pediatrico
Le liste di attesa pediatriche e il processo di allocazione da donatore pediatrico vengono gestite nel SIT. Il CNT è responsabile dell'intero processo e svolge una funzione di monitoraggio e aggiornamento dell'algoritmo di allocazione specifico per le diverse tipologie di organo.
- Programma Nazionale Intestino
Le liste di attesa di intestino vengono gestite a livello nazionale e inserite direttamente nel SIT da parte dei Centri interregionali.

Piano triennale

Trattandosi di attività di carattere istituzionale le attività di controllo esercitate tramite SIT interesseranno le medesime aree del triennio precedente.

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. Quest'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

Piano triennale

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. Prosegua pertanto anche per il prossimo triennio (2009-2011) il compito di verifica del CNT in collaborazione con l'ISS.

Counseling al cittadino

In conformità all'art. 2 L 91/99 il CNT offre ai cittadini un servizio continuativo di *counseling* 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.

Piano triennale

L'Area Medica continuerà anche per il prossimo triennio (2009-2011) a svolgere attività di consulenza al cittadino sia telefonicamente, sia attraverso la casella di posta dedicata.

Counselling per la donazione del sangue da cordone ombelicale

Il sangue del cordone ombelicale è estremamente ricco di cellule staminali emopoietiche, ossia cellule che originano gli elementi del sangue: globuli rossi, globuli bianchi e piastrine.

Il sangue placentare, come il midollo osseo, viene impiegato nella terapia delle patologie ematologiche in età pediatrica e offre minori rischi di rigetto rispetto all'impiego delle cellule del midollo osseo o del sangue periferico, grazie all'imaturità cellulare. La conservazione delle cellule staminali estratte dal cordone ombelicale al momento del parto, segue in Italia due strade: uso allogenico (donazione altruistica) o uso autologo (donazione dedicata per un consanguineo con patologia per la quale sia accertata l'efficienza terapeutica dello SCO). Le procedure di prelievo e di conservazione dello SCO sono in entrambi questi casi fornite dall'SSN. Le cellule staminali estratte dal cordone ombelicale vengono quindi conservate nelle apposite banche a -190°, fino al momento del loro utilizzo. Con l'ordinanza ministeriale del 7 aprile 2005 si è aperta per i cittadini italiani una terza possibilità: esportare presso una Banca estera il sangue cordonale per la conservazione autologa. In questo caso il costo della procedura è interamente a carico del cittadino che decide di esportare lo SCO. L'ordinanza ministeriale prevede che, prima dell'autorizzazione all'esportazione, da richiedersi al Ministero della Salute, si effettui un *counselling* con il CNT allo scopo di informare, chiarire eventuali dubbi e indirizzare eventualmente verso una donazione allogenica gli interlocutori. Il *counselling* viene effettuato telefonicamente con lo scopo di capire quali sono i motivi che spingono i genitori a voler conservare queste cellule per il proprio figlio; successivamente viene inviata dagli interessati la richiesta di attestazione di avvenuto *counselling* con il CNT. Entro e non oltre 24 ore, il CNT invia l'attestazione richiesta sia per e-mail che per fax, in modo che tale documentazione venga trasmessa al Ministero della Salute, ossia all'autorità competente per il rilascio dell'autorizzazione all'esportazione.

Piano triennale

L'attività di *counselling* per la donazione del sangue da cordone ombelicale non viene più svolta come negli anni precedenti con un colloquio con tutte le utenti in quanto tale modalità è stata sostituita dalla modulistica cartacea, è svolta dal personale del telefono verde del CNT.

La parte scientifica rimane sotto la responsabilità dell'Area Medica attraverso colloqui telefonici nel corso dei quali vengono forniti tutti i chiarimenti richiesti.

Il numero dei colloqui ha segnato nel tempo un trend positivo, segno che il cittadino mostra interesse ad avere informazioni dettagliate e specifiche da parte di personale medico.

Si ritiene pertanto necessario che tale servizio resti disponibile anche per il prossimo triennio, considerando che l'interscambiabilità delle competenze scientifiche personale afferente all'Area Medica consente di fornire risposte esaurienti a tutti i quesiti posti.

Interrogazioni parlamentari

Il CNT fornisce pareri ed 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.

Piano triennale

Continua anche per il prossimo triennio (2009-2011) il ruolo del CNT nel fornire elementi di risposta per problematiche legate al settore dei trapianti sottoposte al Ministero della Salute o ad altri organi istituzionali.

Ispezioni ai centri di coordinamento locali e audit sicurezza

L'attività chirurgica, e in particolare quella trapiantologica, non è solo l'applicazione di procedure condivise, di esperienze complesse che devono tener conto del contesto in cui si opera, delle risorse disponibili, dell'efficacia dei trattamenti proposti e dei risultati raggiunti, ma anche da come vengono svolte le attività che la producono. Con l'avvio degli audit ai centri di trapianto, il CNT si è posto quindi l'obiettivo di valutare non solo il risultato di ogni centro in termini di sopravvivenza organo/paziente, ma anche la qualità del processo gestionale che, attraverso l'organizzazione delle strutture e il percorso decisionale degli operatori, conduce al trapianto. Questa iniziativa, che rappresenta una tappa importante e non certo la fine di un processo di trasparenza intrapreso da tutto il sistema, ci ha permesso di estendere il concetto qualità alla struttura (qualità organizzativa), al processo (qualità gestionale) e in fine all'esito (qualità percepita). In sostanza gli audit hanno consentito di accertare sia la coerenza del sistema con quanto previsto dalla normativa, che la sua efficacia. Nel contempo è stato possibile verificare, validare e quindi garantire al cittadino (questo è in ultima analisi lo scopo della certificazione, oltre che stimolare il miglioramento continuo) i percorsi gestionali e decisionali che i professionisti intraprendono nello svolgimento delle loro attività. Il risultato di questo approccio è stato estremamente positivo perché attraverso il confronto tra le varie strutture coinvolte è stato possibile verificare l'appropriatezza dei trattamenti e la significatività dei risultati raggiunti. Riteniamo i risultati di questa esperienza fortemente attendibili, anche perché ottenuti in un tempo relativamente contenuto (nove mesi) e la metodologia attuata si è rivelata estremamente efficace nel valutare le attività nella loro multifattorialità. L'obiettivo finale è stato quello di promuovere lo sviluppo di una cultura di qualità nei trapianti d'organo, coinvolgendo direttamente i centri di trapianto e i professionisti del settore, attraverso la raccolta, l'analisi, la verifica e la diffusione dei risultati ottenuti, in modo tale da costituire, da un lato uno strumento di trasparenza per i cittadini, dall'altro uno stimolo per le strutture affinché, là dove ce ne fosse necessità, si impegnino a migliorare.

Piano triennale

Gli audit si svolgeranno su tutto il territorio nazionale in un arco temporale non superiore a 18 mesi (inizio gennaio 2009). Ogni Coordinatore regionale deve inviare al CNT i nominativi dei membri della propria Commissione regionale, mentre il CNT nominerà un suo rappresentante come commissario nazionale responsabile della corretta metodologia di svolgimento dell'audit stesso.

Per la rilevazione delle informazioni e degli *item* stabiliti durante la pianificazione e la programmazione dell'attività, verrà utilizzata un'apposita scheda divisa in sei aree di interesse così composte: caratteristiche strutturali dell'Ospedale e della Rianimazione; struttura e organizzazione del CL (requisiti); caratteristiche del personale del CL; processi e procedure; attività di formazione e ricerca clinica; gestione dei documenti e informatizzazione. Al termine di tale programma di audit la Commissione nazionale valuterà i risultati raccolti e pianificherà, per ogni singola realtà, in collaborazione con il Coordinatore regionale, gli eventuali correttivi da apportare.

Ispezioni banche dei tessuti

Il CNT ha avviato nel 2004, al fine di ottemperare alle indicazioni e alle norme previste dalla Direttiva Europea 2004/23/CE "Definizione di norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani", un programma di attività finalizzato ad ispezioni per la certificazione delle Banche dei tessuti presenti in Italia.

La certificazione viene rilasciata dal CNT, in qualità di organismo tecnico competente delegato dal Ministero della Salute, alle Banche dei tessuti che in seguito ad ispezione abbiano dimostrato di aver posto in essere un'attività coerente e aderente ai dettami delle linee guida predisposte dallo stesso CNT e dalla normativa vigente (DL.vo 191/2007).

Si precisa che le linee guida sono state redatte in conformità ai dettami delle Direttive tecniche europee 17/2006 e 86/2006, in attesa di recepimento, e del DL.vo 191/2007, tenendo in considerazione anche il documento "*Guide to safety and quality assurance for organs, tissue and cells*" (Consiglio d'Europa, giugno 2006).

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.

Oltre alle attività di ispezione gli esperti del CNT forniscono pareri ed elaborano periodicamente i dati delle attività delle banche dei tessuti.

Piano triennale

In ottemperanza alle norme vigenti che regolamentano il settore, in particolare il DL.vo 191/2007, si prevede di continuare l'attività ispettiva di sorveglianza alle banche tessuti con ispezioni a cadenza biennale e di implementare un analogo sistema ispettivo per le strutture che trattano cellule staminali emopoietiche. A questo proposito è già stato redatto e distribuito un questionario a tutti i centri per verificarne il livello di aderenza alle Direttive europee e sulla base delle risultanze è stato redatto un piano delle ispezioni, che verranno condotte in collaborazione con il CNS.

Per supportare il personale CNT/CNS in queste ispezioni è stato analogamente organizzato un corso di formazione per ispettori esperti di CSE.

Un analogo percorso verrà sviluppato per le banche di sangue cordonale.

Un altro settore di attività che si dovrà sviluppare è quello delle ispezioni alle *cell factory*. Il Regolamento europeo 1394/2007, appena entrato in vigore, che stabilisce norme di qualità e sicurezza per le strutture che producono medicinali per terapia avanzata, stabilisce che ove le strutture utilizzino, come materiali di partenza per la preparazione di questi medicinali, cellule e tessuti di origine umana, debbano sottostare per alcuni aspetti alle norme previste dalle DE 23/2004 e dal DL.vo 191/2007. Il CNT organizzerà quindi un programma di sorveglianza, analogo a quello realizzato per le banche tessuti, anche per queste tipologie di strutture per le parti di propria competenza.

Ispezioni centro trapianti

L'attività chirurgica, e in particolare quella trapiantologia, non è solo l'applicazione di procedure condivise, di esperienze complesse che devono tener conto del contesto in cui si opera, delle risorse disponibili, dell'efficacia dei trattamenti proposti e dei risultati raggiunti, ma anche da come vengono svolte le attività che la producono. Con l'avvio degli audit ai centri di trapianto, il CNT si è posto quindi l'obiettivo di valutare non solo il risultato di ogni centro in termini di sopravvivenza organo/paziente, ma anche la qualità del processo gestionale che, attraverso l'organizzazione delle strutture e il percorso decisionale degli operatori, conduce al trapianto. Questa iniziativa, che rappresenta una tappa importante e non certo la fine di un processo di trasparenza intrapreso da tutto il sistema, ci ha permesso di estendere il concetto qualità alla struttura (qualità organizzativa), al processo (qualità gestionale) e in fine all'esito (qualità percepita). In sostanza gli audit hanno consentito di accertare sia la coerenza del sistema con quanto previsto dalla normativa, che la sua efficacia. Nel contempo è stato possibile verificare, validare e quindi garantire al cittadino (questo è in ultima analisi lo scopo della certificazione, oltre che stimolare il miglioramento continuo) i percorsi gestionali e decisionali che i professionisti intraprendono nello svolgimento delle loro attività. Il risultato di questo approccio è stato estremamente positivo perché attraverso il confronto tra le varie strutture coinvolte è stato possibile verificare l'appropriatezza dei trattamenti e la significatività dei risultati raggiunti. Riteniamo i risultati di questa esperienza fortemente attendibili, anche perché ottenuti in un tempo relativamente contenuto (nove mesi) e la metodologia attuata si è rivelata estremamente efficace nel valutare le attività nella loro multifattorialità. L'obiettivo finale è stato quello di promuovere lo sviluppo di una cultura di qualità nei trapianti d'organo, coinvolgendo direttamente i centri di trapianto e i professionisti del settore, attraverso la raccolta, l'analisi, la verifica e la diffusione dei risultati ottenuti, in modo tale da costituire, da un lato uno strumento di trasparenza per i cittadini, dall'altro uno stimolo per le strutture affinché, là dove ce ne fosse necessità, si impegnino a migliorare.

Piano triennale

Gli audit presso i 18 Centri di Trapianto di Cuore presenti a livello nazionale si svolgeranno nell'arco temporale dell'anno 2009. Come per gli audit precedenti e al fine di rendere più agevole il lavoro della Commissione nazionale, il centro trapianti sottoposto ad audit dovrà riportare in volumi rilegati le informazioni elencate nell'apposita scheda precedentemente inviategli. Tale materiale andrà a costituire atto documentale ufficiale per il CNT.

Negli anni 2010 e 2011 è in programma l'organizzazione degli audit ai centri di trapianto di polmone.

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.

Piano triennale

Prosegue anche per il prossimo triennio (2009-2011) l'attività di pareristica del CNT.

Registro 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'*Italian Bone Marrow Donor Registry* (IBMDR). L'IBMDR è l'unica struttura riconosciuta a livello nazionale dalla L. 6 marzo 2001, n. 52 quale registro nazionale donatori midollo osseo. Attraverso tale collaborazione il CNT provvede all'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. È stata inoltre attivata una collaborazione tra Ministero della Salute e CNS per la predisposizione nell'ambito delle singole competenze linee guida per la costituzione di una rete di banche del cordone ombelicale.

Il CNT, inoltre, intrattiene rapporti di collaborazione con il Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO).

Piano triennale

Per il triennio 2009-2011 il CNT collaborerà alla costituzione della rete delle banche cordonali, al monitoraggio e al controllo delle attività delle stesse in conformità alle norme vigenti e alla predisposizione di piani e programmi di formazione dedicati agli operatori.

Registro cerebrolesi (progetto QPIDO)

L'identificazione in Rianimazione del potenziale donatore di organi è il punto chiave e il presupposto fondamentale dell'attività di trapianto a scopo terapeutico.

Nel nostro Paese la diagnosi e l'accertamento di morte con criteri neurologici sono regolati da precise norme di Legge che richiedono un periodo di osservazione effettuato da un Collegio di medici specialisti. I dati disponibili, benché parziali e regionalizzati, suggeriscono che vi sia un'ampia differenza tra il numero di soggetti che presentano tutti i segni clinici di morte con criteri neurologici (a cuore battente) e il numero di accertamenti di morte e di segnalazioni al Centro regionale e al Coordinamento locale. Il Gruppo di Lavoro istituito dalla Consulta Nazionale Trapianti con la finalità principale di analizzare l'efficienza nel processo di identificazione del potenziale donatore, ha ritenuto prioritario prevedere due livelli operativi del "progetto qualità", affiancando alla valutazione del processo di donazione (che ha come punto zero la segnalazione dell'accertamento di morte del potenziale donatore) la realizzazione di un registro di tutti i deceduti nelle terapie intensive italiane, affetti da lesioni encefaliche e sottoposti a misure rianimatorie. Tale registro dovrebbe evidenziare in modo prospettico, oltre all'epidemiologia clinica dei decessi in rianimazione dei soggetti affetti da lesione cerebrale acuta, l'effettuazione o meno della diagnosi di morte con criteri neurologici, descrivere i principali fattori che possono influire sull'operato dei rianimatori (età, diagnosi, fattori di esclusione assoluti e relativi, diniego dei familiari, difficoltà organizzative) e interrompere il processo di identificazione senza che avvenga la segnalazione al coordinamento locale o regionale. Da alcuni anni in molte Regioni sono attivi sistemi di rilevazione dei dati, per singolo paziente o aggregati, periodici o prospettici, su supporto cartaceo o informativo, inerenti i decessi in rianimazione e il processo di donazione. Al fine di valorizzare la metodologia e l'esperienza già acquisite nelle singole Regioni, sono stati evidenziati gli *item* comuni ai singoli programmi, definendo quindi un debito informativo "nazionale" che permettesse una sintesi omogenea dei dati. In aderenza ai principi di garanzia di efficienza e qualità, il processo prevede inoltre un feed-back informativo che comprenda la possibilità di effettuare alcune ispezioni alle terapie intensive sulla base delle criticità emergenti e dell'analisi degli indicatori elaborati.

Piano triennale

Il monitoraggio del Registro Cerebrolesi continuerà anche per il prossimo triennio (2009-11).

Servizio di pronta disponibilità

Nell'espletamento delle sue funzioni di cui all'art. 8 della Legge n. 91 del 1 aprile 1999, il CNT ha attivato un servizio di reperibilità 24 ore su 24 per tutto l'anno, garantito dai medici del CNT (al momento tre unità incluso il Direttore che, pur non essendo ufficialmente in turnazione, svolge quotidianamente tale attività). A tal fine il personale reperibile è stato dotato di apparecchiatura mobile i cui numeri sono conosciuti in ambito nazionale. L'istituzione della reperibilità consiste nell'obbligo del medico reperibile di essere prontamente rintracciato, fuori del proprio orario di lavoro e di raggiungere, qualora richiesto dall'evento, il luogo di lavoro in tempi ragionevolmente brevi. Il servizio consente agli operatori della rete di avere un supporto in tempo reale per tutte le problematiche relative ai processi decisionali delle attività di prelievo e trapianto con funzione di integrazione al servizio della commissione nazionale della sicurezza (*second opinion*). Il risvolto operativo, gestionale e assistenziale del servizio di pronta disponibilità è quindi molto chiaro il confronto, la discussione e la condivisione del proprio operato non solo affinano le capacità di chi ne usufruisce, ma tendono a creare quella circolazione costante di idee e di opinioni che è il miglior sistema di istruzione permanente e che consente anche al professionista che opera più in periferia di non restare isolato.

Piano triennale

Prosegue anche per il prossimo triennio (2009-2011).

Sorveglianza dei programmi nazionali di trapianto

Il trapianto di organi è il prodotto di un percorso organizzativo-gestionale che, coinvolgendo figure professionali di discipline diverse, inizia con l'individuazione del potenziale donatore e si conclude con l'atto operatorio del trapianto. Esso rappresenta il coronamento di un lungo e impegnativo lavoro di molti operatori appartenenti ad unità operative diverse. L'esigenza quindi di un modello organizzativo efficiente, unitamente all'adozione di procedure operative codificate in ambito nazionale che ne possano assicurare il normale e produttivo svolgimento, risponde ad una reale necessità. A seguito di ciò sono state individuati diversi programmi di trapianto di portata nazionale a cui si è cercato di dare risposte concrete con una regolamentazione condivisa dei protocolli operativi e dei processi gestionali. In questo ambito il CNT si configura come un sistema di "controllo" finalizzato a verificare lo stato di attuazione dei programmi stessi in modo complessivo e analitico e rappresenta un forte strumento di verifica delle procedure essendo deputato ad analizzare sistematicamente l'andamento delle linee di attività. Esso certamente svolge una funzione di "controllo" critico e giudicante, ma contestualmente assume il ruolo di collaboratore e coadiutore delle varie strutture operative per la corretta applicazione dei protocolli gestionali. Tra le varie problematiche di portata nazionale ne sono state individuate alcune di assoluta priorità che non avrebbero potuto essere altrettanto efficacemente gestite in ambito regionale. Tra queste figurano: il trapianto di cuore in pazienti con condizioni cliniche di urgenza; il trapianto di fegato con tecnica *split*; il trapianto di rene in pazienti di difficile trapiantabilità (iperimmuni); il trapianto con organi che presentano fattori di rischio; il trapianto di organi in soggetti con infezione da HIV; il trapianto di organi in soggetti pediatrici, il trapianto di fegato da donatore vivente; il trapianto di intestino e multiviscerale. Il CNT in collaborazione con il CIR OCST ha aperto il 4 aprile 2005 un ufficio operativo, denominato *Italian Gate to Europe*, che gestisce lo scambio degli organi con tutte le organizzazioni estere di trapianto. Tutti questi programmi sono regolamentati da protocolli operativi emanati dal CNT la sorveglianza dei quali è affidata al Centro Nazionale stesso. A

questi programmi di trapianto va aggiunto il protocollo per l'istituzione dell'archivio biologico nazionale per la sicurezza della rete trapiantologia che consiste nell'obbligo di conservare in ogni centro regionale tutti i sieri dei donatori e dei relativi riceventi trapiantati. L'iniziativa si pone l'obiettivo di incrementare i livelli di sicurezza della rete trapiantologia consentendo, in caso di eventi avversi, di procedere a test specifici sui campioni stoccati. Le modalità di preparazione e conservazione (procedure) dei campioni sono state uniformate sul territorio nazionale. L'iniziativa necessita di un monitoraggio continuo e di eventuali implementazioni che si renderanno necessarie.

Piano triennale

Anche per il prossimo triennio (2009-2011) prosegue il controllo da parte del CNT dei programmi di trapianto a carattere nazionale sopra descritti. Ad essi va aggiunto il monitoraggio dei trapianti di rene da donatore vivente in modalità incrociata (*cross-over*) iniziato nel 2008. Il monitoraggio prevede la partecipazione attiva del personale dell'area medica sia come gestore del registro nazionale, sia in qualità di componenti la commissione di parte terza nazionale per la sorveglianza della procedure previste dal protocollo. Contestualmente a tali attività è stata avviato il monitoraggio dai pazienti con plurime iscrizioni nel programma di trapianto di rene che prevede un servizio di consulenza da parte del personale dell'area medica per aiutare i pazienti nella scelta del centro trapianti dove mantenere le due iscrizioni consentite in ambito nazionale.

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 febbraio 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.

Piano triennale

Rientrando tale attività tra quelle consolidate nel tempo, anche nel triennio 2009/2011 si prevede la continuazione delle stesse secondo le modalità sopra descritte.

Organismo di valutazione e accreditamento

Attività di ricerca

La prevenzione primaria del cancro della mammella

Studi epidemiologici hanno evidenziato che lo stile di vita nei Paesi industrializzati, caratterizzato da un elevato apporto calorico e da una scarsa attività fisica comporta un incremento del rischio di sviluppare il cancro. I meccanismi responsabili della correlazione tra stile alimentare e cancro coinvolgono un aumento delle concentrazioni dei fattori di crescita e degli ormoni sessuali, i cui livelli sono influenzati dalla massa di tessuto adiposo, dall'attività fisica e dalla dieta.

In particolare alcuni studi hanno evidenziato che alti livelli sierici di androgeni, tra cui il testosterone, e, dopo la menopausa, di estrogeni, favoriscono lo sviluppo di carcinomi mammari.

Il progetto si propone di valutare l'effetto della dieta e dell'attività fisica sullo sviluppo di recidive in pazienti con il cancro alla mammella attraverso la determinazione delle concentrazioni di testosterone e altri ormoni sessuali e fattori di crescita, mediante tecniche di screening. In particolare il progetto intende istituire un programma nazionale per il controllo qualità della misura dei livelli di testosterone nei laboratori di analisi. La standardizzazione dei dosaggi degli ormoni steroidei sessuali, mediante metodi di conferma LC-MS/MS è indispensabile per garantire l'affidabilità dei risultati, la possibilità di correlazioni e quindi la tutela della salute pubblica.

Risultati attesi nel triennio

- Sviluppo di un metodo LC-MS/MS per la determinazione di ormoni sessuali nel siero di donne, con particolare riferimento al testosterone;
- Validazione del metodo di conferma LC-MS/MS e dei metodi di screening utilizzati dagli altri laboratori coinvolti nel progetto, mediante la preparazione e la valutazione di materiali di riferimento (omogeneità, assegnazione del valore al materiale di riferimento, stima dell'incertezza di misura);
- Definizione di procedure operative e di un programma di controllo qualità per l'analisi di ormoni sessuali in campioni di siero.

Trasferibilità dei risultati

Consolidamento delle banche dati e delle informazioni per una più efficace azione di monitoraggio e prevenzione del cancro alla mammella.

Programma per la ricerca sanitaria 2008 – Attività di ricerca finalizzata in materia di sicurezza alimentare

La diffusione dei trattamenti illeciti con promotori di crescita nelle produzioni zootecniche può comportare gravi rischi per la salute dei consumatori, data la potenziale attività endocrina e cancerogena dei residui negli alimenti. Al fine di prevenire l'esposizione dei consumatori a sostanze ad effetto anabolizzante, assume fondamentale importanza la rilevazione della presenza dei residui mediante sistemi di controllo affidabili e la ricerca di biomarcatori alternativi che consentano di discriminare un animale trattato da uno non trattato.

Tra le sostanze illegalmente impiegate quali promotori di crescita, i corticosteroidi di sintesi, quali ad esempio desametasone e prednisolone, esplicano la loro attività farmacologica a concentrazioni notevolmente inferiori rispetto a quelle degli analoghi naturali (cortisolo, cortisone).

Il progetto di ricerca si propone di: studiare il profilo di escrezione del prednisolone e dei suoi metaboliti nei bovini; caratterizzare prodotti utilizzati per l'alimentazione di vitelli; valutare l'eventuale correlazione dei livelli di ormoni glucocorticoidi endogeni con i residui di prednisolone nelle urine; valutare eventuali fenomeni di bioconversione microbica *in vivo* di

sostanze strutturalmente simili; effettuare la ricerca dei residui anche in matrici alternative; valutare la variazione dei livelli di corticosteroidi endogeni in bovini trattati con somatotropina.

Risultati attesi nel triennio

- Determinare se l'eventuale presenza di prednisolone nelle urine di bovino può essere correlata a processi naturali e non solo a trattamenti illeciti;
- Sviluppo di metodi che prevedano l'utilizzo di altre matrici target al fine di evidenziare differenze dei profili ormonali tra animali trattati e non trattati con anabolizzanti.
- Studio dei profili di escrezione degli ormoni proteici e degli ormoni steroidei endogeni e di sintesi e dei loro metaboliti nei fluidi biologici bovini.
- Individuazione di nuovi biomarcatori di trattamenti illeciti.

Trasferibilità dei risultati

I metodi analitici di conferma sviluppati potranno essere trasferiti ai laboratori che operano sul territorio nazionale nell'ambito del controllo ufficiale dei prodotti alimentari di origine animale.

Sviluppo di un protocollo diagnostico integrato per il controllo relativo a trattamenti illeciti con promotori di crescita nei ruminanti

Negli allevamenti dei bovini destinati al consumo umano è frequente il ricorso a sostanze ad effetto anabolizzante al fine di incrementare la produttività. La legislazione nazionale e comunitaria vieta l'utilizzo di tali sostanze a causa dei possibili effetti endocrini e cancerogeni dei residui negli alimenti di origine animale.

La rapida metabolizzazione ed eliminazione di tali sostanze, l'utilizzo di combinazioni di molecole a bassa concentrazione o addirittura sconosciute, rende difficile indirizzare la ricerca ad una specifica molecola e identificarla. Alcuni studi hanno evidenziato che tali molecole inducono alterazioni istologiche a livello di vari organi (organi sessuali secondari maschili e femminili, timo) che perdurano per tutta la vita commerciale dell'animale. L'esame istopatologico eseguito al momento della macellazione può pertanto fornire un valido ausilio come esame di screening sugli allevamenti.

Il presente progetto si propone pertanto di sviluppare un metodo istologico affidabile in termini di accuratezza e precisione, da applicare quale screening nella valutazione delle lesioni microscopiche causate negli organi bersaglio da steroidi sessuali e cortisonici e metodiche chimiche e molecolari per la ricerca rispettivamente delle sostanze vietate e delle modificazioni genetiche indotte dalle stesse, quali indagini di conferma.

Risultati attesi nel triennio

Miglioramento delle strategie di controllo dei trattamenti con promotori di crescita e della base scientifica per l'analisi del rischio mediante: i) caratterizzazione dei profili ormonali in animali da reddito in condizioni controllate e dopo trattamento con anabolizzanti; ii) individuazione della correlazione tra residui *marker* e principi attivi precursori; iii) ricerca di nuovi metaboliti indicatori di trattamento illecito; iv) comparazione risultati dei metodi di screening con i parametri dei metodi di conferma LC-MS/MS.

Trasferibilità dei risultati

Consolidamento delle banche dati e delle informazioni per una più efficace azione di prevenzione e controllo dell'uso di sostanze ad effetto anabolizzante; trasferimento delle conoscenze ai laboratori di controllo ufficiale e coordinamento delle attività tecnico-scientifiche dei suddetti laboratori in attuazione delle disposizioni europee vigenti in materia di trattamenti illeciti con promotori di crescita.

Organismo di valutazione e accreditamento

Attività di controllo, valutazione, parere

Attività di formazione e comunicazione

L'attività è finalizzata alla formazione e aggiornamento degli auditor. Questo compito si svolge sia con l'organizzazione di corsi di formazione per auditor definito delle "40 ore" per circa 25 esperti e con l'organizzazione di incontri periodici di aggiornamento. Quest'ultima attività serve per aggiornare gli auditor su le nuove disposizioni in materia di accreditamento, la gestione del processo analitico, la validazione dei metodi di prova, la stima dell'incertezza di misura e l'interpretazione dei risultati delle analisi.

A queste iniziative se ne affiancheranno altre tese a stabilire un livello di equivalenza delle procedure di audit in materia di sicurezza alimentare.

Organizzazione a livello nazionale di un gruppo *ad hoc* (*Food Safety Audit Group*) che avrà il compito di promuovere il continuo adeguamento delle norme e metodologie. Il gruppo svolgerà un ruolo importante nel predisporre gli strumenti di coordinamento per gli aggiornamenti degli auditor anche quando le varie strutture di accreditamento cui aderenti a COPA evolveranno nell'ente unico di accreditamento.

Si organizzeranno ulteriori incontri formativi specifici su tematiche quali: gestione del rischio biologico e chimico nei laboratori di prova in cui saranno approfonditi aspetti relativi a campionamento e responsabilità; condizioni ambientali dei laboratori; prove e campo di applicazione dell'accreditamento ORL; criticità dell'esame documentale per la valutazione preliminare e l'accertamento dei requisiti minimi per sostenere la verifica ispettiva; limiti e doveri dei valutatori.

Piano triennale

Le attività di formazione degli auditor previste per il 2009, quali il corso di formazione/perfezionamento per Auditor "40 ore" per circa 25 esperti e l'organizzazione dell'incontro periodico di aggiornamento rivolto ai valutatori dell'ISS, saranno riproposte sia nel 2010 che nel 2011.

I destinatari degli incontri formativi, finalizzati alla qualificazione, aggiornamento e mantenimento della qualifica dei valutatori, sono i valutatori inseriti nel Registro ispettori e altri esperti. Saranno approfonditi i seguenti aspetti di rilievo: le nuove disposizioni in materia di accreditamento, la gestione del processo analitico, la validazione dei metodi di prova, la stima dell'incertezza di misura e l'interpretazione dei risultati delle analisi.

A queste iniziative se ne affiancheranno altre tese a stabilire un livello di equivalenza delle procedure di audit in materia di sicurezza alimentare.

Un notevole impulso a questo programma deriverà dalla formazione di un gruppo *ad hoc* (*Food Safety Audit Group*) che avrà il compito di promuovere il continuo adeguamento delle norme e metodologie sia a livello nazionale che europeo. Il gruppo svolgerà un ruolo importante nel predisporre gli strumenti di coordinamento per gli aggiornamenti degli auditor. A questo scopo bisognerà sviluppare una serie di incontri e gruppi di lavoro anche con istituzioni che operano a livello territoriale come le ARPA e gli Istituti Zooprofilattici.

Saranno inoltre previsti incontri formativi specifici su tematiche quali: gestione del rischio biologico e chimico nei laboratori di prova in cui saranno approfonditi aspetti relativi a campionamento e responsabilità; condizioni ambientali dei laboratori; prove e campo di applicazione dell'accreditamento ORL; criticità dell'esame documentale per la valutazione preliminare e l'accertamento dei requisiti minimi per sostenere la verifica ispettiva; limiti e doveri dei valutatori.

Attività tecnico-scientifica

L'attività è finalizzata al coordinamento tecnico-scientifico dei laboratori, alla collaborazione con le autorità centrali e regionali che elaborano i Piani annuali di sorveglianza

per i rischi alimentari, all'emanazione di norme tecniche per la ricerca dei residui, allo sviluppo di metodologie innovative, alla valutazione dei criteri per l'affidabilità dei metodi.

Le attività di ricerca sono tese all'individuazione di nuove strategie di controllo mediante la ricerca di nuovi metaboliti indicatori di trattamento illecito, la caratterizzazione dei profili ormonali in bovini in condizioni controllate e dopo trattamento con sostanze anabolizzanti e la validazione dei metodi di screening.

Le attività di ricerca riguardano, inoltre, lo studio delle alterazioni ormonali, influenzate dagli stili alimentari con particolare riferimento alle diete ricche di proteine animali, e potenzialmente correlabili allo sviluppo del carcinoma mammario; la definizione di criteri per la preparazione e valutazione di materiali di riferimento ai fini della validazione dei metodi di conferma e di screening utilizzati dalle altre unità operative.

Piano triennale

Coerentemente con la missione ad esso affidata, il Reparto opererà nell'ambito della sicurezza alimentare e della salute umana, con particolare riferimento allo sviluppo di metodologie innovative per la ricerca dei residui, all'emanazione di norme tecniche e linee guida, sia in materia di sistemi di gestione per la qualità, sia in materia di pericoli e possibili rischi, al fine di indirizzare i laboratori sulle diverse tipologie di prove da accreditare. Obiettivi prioritari saranno la definizione e la valutazione dei criteri per l'affidabilità dei metodi di analisi e l'elaborazione di procedure con particolare riguardo alla riferibilità delle misure, ai controlli qualità interni ed esterni, alla stima dell'incertezza di misura.

Il Programma di attività intende inoltre perseguire il coordinamento tecnico scientifico dei laboratori, anche in collaborazione con le autorità centrali e regionali che elaborano i Piani annuali di sorveglianza per i rischi correlati alla sicurezza alimentare, avvalendosi tra l'altro di strumenti quali i circuiti di interconfronto e le prove valutative per la verifica delle prestazioni dei laboratori accreditati e garantire la qualità dei dati prodotti. Si ritiene infatti che l'affidabilità e l'efficienza della fase analitica ricoprono un ruolo fondamentale e strategico all'interno delle politiche sulla sicurezza alimentare lungo tutta la filiera produttiva, dalla valutazione del rischio sino alle attività di autocontrollo e di controllo ufficiale.

Le attività di ricerca del Reparto saranno altresì orientate a diversi progetti di ricerca:

- "Sviluppo di un protocollo diagnostico integrato per il controllo relativo a trattamenti illeciti con promotori di crescita nei ruminanti". Il progetto è mirato all'individuazione di nuove strategie di controllo degli alimenti di origine animale, mediante la ricerca di nuovi metaboliti indicatori di trattamento illecito, alla caratterizzazione dei profili ormonali in bovini in condizioni controllate e dopo trattamento con sostanze anabolizzanti e alla validazione dei metodi di screening, sviluppati da altre unità operative coinvolte, attraverso confronto con metodi di conferma LC-MS/MS.
- "La prevenzione primaria del cancro alla mammella". L'oggetto di studio del progetto consisterà nella determinazione delle alterazioni ormonali nel siero umano, influenzate dagli stili alimentari con particolare riguardo alle diete ricche di proteine animali, e potenzialmente correlabili allo sviluppo del carcinoma mammario; la definizione di criteri per la preparazione e valutazione di materiali di riferimento ai fini della validazione dei metodi di conferma e di screening utilizzati dalle altre unità operative; l'organizzazione di programmi di valutazione esterna di qualità (VEQ) con definizione di procedure operative e requisiti.
- "Programma per la Ricerca Sanitaria 2008" – Attività di ricerca finalizzata in materia di Sicurezza Alimentare“. Tale progetto è inerente lo studio dei profili di escrezione degli ormoni proteici e degli ormoni steroidei endogeni e di sintesi e dei loro metaboliti nei fluidi biologici bovini. Al fine di discriminare tra livelli naturali e livelli riconducibili a trattamento illecito, saranno sviluppati metodi di analisi LC-MS/MS, mirati

all'individuazione e alla determinazione di nuovi biomarcatori peptidici di trattamento, in matrici target alternative.

Valutazione e accreditamento

L'Organismo di valutazione e accreditamento (già ISS ORL) è stato istituito con Decreto del 15 luglio 2008 (GU n. 179 del 01/08/2008), presso l'ISS, in continuità con l'attività dell'Organismo di Riconoscimento dei Laboratori (designato con decreto del 12 maggio 1999) per la valutazione della competenza e per l'accREDITAMENTO dei laboratori di controllo ufficiale e autocontrollo dei prodotti alimentari.

L'attività dell'Organismo è inserita nell'ambito delle prescrizioni e delle misure adottate a livello europeo in materia di sicurezza alimentare, finalizzate ad assicurare gli standard più elevati possibili di sicurezza alimentare, tutelare gli interessi dei consumatori, garantire l'affidabilità dei processi di controllo e prevenire ostacoli ingiustificati alla libera circolazione degli alimenti e dei mangimi. L'accREDITAMENTO dei laboratori rappresenta lo strumento per garantire la qualifica delle informazioni scientifiche per la valutazione del rischio, la valutazione della competenza dei laboratori da parte delle autorità pubbliche e dell'efficacia delle attività di autocontrollo e di controllo ufficiale nell'intera filiera.

L'Organismo esplica attività di valutazione e accREDITAMENTO in conformità alla norma internazionale UNI CEI EN ISO/IEC 17011, sulla base di quanto previsto dall'art. 12 del Regolamento CE n. 882/2004.

A tale scopo, effettua attività ispettive che si esplicano attraverso audit finalizzati all'accREDITAMENTO, sorveglianza, estensione, riesame (rivalutazione) per i laboratori di prova, in conformità alla norma europea UNI CEI EN ISO/IEC 17025 e a quant'altro previsto dalle disposizioni legislative vigenti in materia di sicurezza alimentare.

Piano triennale

Il miglioramento del sistema di controllo italiano in materia di sicurezza alimentare è tra gli obiettivi prioritari dell'Organismo di valutazione ed accREDITAMENTO.

– Valutazione e accREDITAMENTO

Proseguirà l'impegno per incrementare il numero di laboratori accREDITATI, dando priorità alle prove di maggiore rilevanza sanitaria e per continuare nell'attività di accREDITAMENTO dei laboratori di autocontrollo. Continuerà l'aggiornamento delle banche dati dei laboratori di autocontrollo, dei laboratori ufficiali e delle prove accREDITATE. La previsione dell'attività di valutazione e accREDITAMENTO per il 2009 comprende un totale di circa 120 audit finalizzati alla sorveglianza e all'accREDITAMENTO dei laboratori che operano nell'ambito del controllo ufficiale e dei laboratori di autocontrollo. Per il 2010 e il 2011 si prevede un incremento delle attività di circa il 30% per ciascun anno, con l'obiettivo di raggiungere un numero di laboratori accREDITATI pari a 200, alla fine del triennio.

Proseguirà, inoltre, il supporto tecnico-scientifico ai laboratori ufficiali e di autocontrollo anche finalizzato a garantire la conformità al Reg. CE n. 882/2004 e l'aggiornamento dell'Elenco dei laboratori accREDITATI e del Registro Ispettori.

**Servizio Biologico
e per la Gestione della Sperimentazione Animale**

Attività di ricerca

Studio funzionale di alcuni geni coinvolti nella omeostasi dello zinco nel ceppo enteroemorragico *Escherichia coli* O157:H7 e del loro ruolo nel meccanismo di difesa dell'ospite

Lo zinco è essenziale per la vita della cellula, ma la sua concentrazione intracellulare deve essere strettamente controllata in quanto tale ione è potenzialmente tossico. In cellule di *E. coli* K12 si conosce molto del sistema di omeostasi dello zinco mentre poco si conosce sul ceppo patogeno *E. coli* O157:H7. Diversi studi hanno suggerito che l'integrità dell'operone *znuABC*, codificante per un trasportatore dello Zn, è essenziale per assicurare a molti batteri Gram-negativi la possibilità di crescere in un terreno privo di Zn o dentro le cellule ospiti infettate, dove la Calprotectina rilasciata dai neutrofili, agisce chelando lo Zn (Corbin, *et al.* 2008). Tale trasportatore è anche coinvolto nella resistenza del batterio allo stress ossidativo, infatti mutanti *znuA*- di un ceppo patogeno di *E. coli* diverso dall'O157:H7 sono più sensibili al danno ossidativo (Sabri, *et al.* 2009). È stato recentemente dimostrato che molte specie batteriche riescono a prevenire il danno ossidativo, sopravvivendo all'azione battericida delle cellule ospiti, grazie all'enzima Cu,Zn superossido dismutasi (*sodC*); in particolare il nostro gruppo ha dimostrato che O157:H7 riesce a farlo grazie all'acquisizione di due copie aggiuntive di *sodC*. In *Salmonella* è stata inoltre osservata una correlazione tra la mancanza del gene *znuA* in condizioni di deprivazione di Zn e la diminuzione nell'espressione del gene *sodC*.

Obiettivo di questo progetto è di studiare l'interazione di *ZnuA* e *SodC* nel meccanismo di virulenza di O157:H7 e di valutare il coinvolgimento in tale processo di altri geni coinvolti nell'omeostasi dello Zn quali *zinT* e *zur*.

Risultati attesi nel triennio

– Anno 2009

Verranno costruiti preliminarmente i mutanti nulli per i geni *znuA* e *zinT* – codificanti entrambi per proteine periplasmatiche in grado di trasportare Zn all'interno del citoplasma – in maniera singola o combinata.

La costruzione del mutante nullo per il gene *zur* -codificante per una proteina regolatrice di una serie di operoni che rispondono allo Zn- permetterà invece di studiare la regolazione genica di *znuA* e *zinT*.

La costruzione di cloni recanti un epitopo (Flag) attaccato al C-terminale delle due proteine *ZnuA* e *ZinT* permetterà di rilevare la loro espressione attraverso l'uso di anticorpi anti-Flag nelle diverse condizioni. Verranno inoltre formati mutanti in grado di esprimere le proteine *ZnuA* e *ZinT* flaggate in assenza del gene *zur*, come anche la proteina *SodC* flaggata in assenza di *znuA*.

– Anni 2010-2011

Una volta ottenuti i ceppi mutanti si potrà valutare il contributo di ogni singolo gene alla capacità di crescere in condizioni di deprivazione o aggiunta di Zn e/o di altri metalli.

Si potrà valutare l'espressione dei singoli geni e la loro regolazione da parte di *zur* nelle diverse condizioni e nei diversi compartimenti cellulari.

Esperimenti di immunoprecipitazione potranno stabilire l'esistenza o meno di una correlazione fisica tra *ZnuA* e *ZinT*.

Tutti i mutanti saranno sottoposti a stress ossidativo per valutare la loro capacità di resistenza e nel mutante *znuA*- verrà inoltre studiata l'espressione dei tre geni *sodC* presenti nell'O157:H7.

Studi di 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 prodotti

Questi studi potrebbero consentire l'acquisizione di conoscenze utili a chiarire le basi molecolari del processo di infezione, indispensabili per il miglioramento e lo sviluppo di strategie terapeutiche mirate.

**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 verifica dell'assenza dei Pirogeni e del Saggio per la ricerca delle Endotossine batteriche. 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.

Piano triennale

Nel corso del triennio 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, permetteranno il potenziamento della collaborazione con l'AIFA e miglioreranno le conoscenze necessarie agli ispettori del Settore Biologico che nel corso delle ispezioni alle Officine produttrici di farmaci 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 dal Settore Biologico 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'Autorizzazione all'Immissione in Commercio (AIC) delle suddette specialità medicinali.

Piano triennale

L'attività di valutazione verrà svolta dal Settore Biologico 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 dispositivi medici

L'attività di controllo consiste nell'esecuzione del Saggio di Sterilità, del Saggio per la verifica dell'assenza dei Pirogeni e del Saggio per la ricerca delle Endotossine batteriche su farmaci e su dispositivi medici secondo i protocolli stabiliti dalla Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana. Questi controlli vengono eseguiti dal Settore Biologico su richiesta dell'AIFA, del Ministero della Salute a fronte di interventi di farmaco-vigilanza e di *post-marketing surveillance*, di ispezioni ad industrie produttrici di farmaci e a seguito di segnalazioni degli organi competenti su territorio nazionale. Tali competenze sono state stabilite dal DM n. 528 del 21/11/1987 e mantenute nel nuovo regolamento dell'ISS.

Piano triennale

Nel corso del 2008 due risultati importanti hanno caratterizzato lo svolgimento di questa attività: l'acquisizione da parte dell'EDQM della Certificazione di conformità alle norme internazionali UNI/EN ISO 17025 e l'attivazione del progetto di collaborazione con l'AIFA per il controllo della sterilità e del contenuto in endotossine nei farmaci e nei dispositivi medici. Il raggiungimento di questi due obiettivi permetterà di proseguire l'attività di controllo in conformità con gli standard di qualità internazionali previsti dagli accordi di Mutuo Riconoscimento Canada-Europa confermando l'alto livello raggiunto dall'ISS nello svolgimento delle attività istituzionali finalizzate a garantire la sicurezza dei farmaci per la tutela della salute pubblica. Nel corso del triennio l'attività verrà finalizzata al conseguimento della Certificazione di conformità – da parte dell'EDQM – anche per l'esecuzione del Saggio per la verifica dell'assenza dei pirogeni nei farmaci e nei dispositivi medici.

Convenzione per il bando delle armi biologiche e tossiniche

Il Settore Biologico partecipa ai lavori della Commissione interministeriale – coordinata dal Ministero degli Affari Esteri – 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. Attualmente la ratifica del protocollo, che prevede tra l'altro, la realizzazione di un regime ispettivo internazionale, è in fase di rivisitazione.

Piano triennale

Nel corso del 2009 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 primo trimestre del 2009 è stato istituito presso il Comitato per le Biotecnologie della Presidenza del Consiglio dei Ministri il "Gruppo di lavoro sulla biosicurezza e il bioterrorismo". Questo organismo – tramite la partecipazione di esperti provenienti dai Ministeri e dalle istituzioni (tra le quali è incluso l'ISS) – avrà il compito di preparare pareri scientifici su aspetti di competenza che permetteranno agli organi competenti l'emissione delle norme di riferimento.

Elaborazione di monografie per i farmaci in ambito europeo

L'attività viene svolta dal Settore Biologico, 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.

Piano triennale

L'attività di stesura e revisione delle monografie in ambito europeo è puntualmente effettuata dai gruppi di revisione europei e dalle autorità nazionali. Il Settore Biologico tramite una unità di personale è inserito in uno di questi gruppi di lavoro europei (endotossine). Nel corso del triennio 2009-2011 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 del Settore Biologico confluisce in due settori di intervento. Il primo relativo all'esecuzione dei controlli su farmaci e su dispositivi medici, il secondo nella realizzazione del Sistema di Assicurazione della Qualità 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, il Settore Biologico è stato sottoposto ad ispezioni da parte di un team ispettivo europeo e un team ispettivo canadese e nel 2008 dall'EDQM. A seguito di esito favorevole, il sistema di qualità del Settore Biologico 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.

Piano triennale

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 e per il Saggio delle endotossine batteriche), il Settore Biologico 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 2009-2011 si prevede di richiedere la Certificazione di qualità da parte dell'EDQM anche per il Saggio per la verifica dell'assenza dei pirogeni, la programmazione prevede di intensificare quelle attività di sistema necessarie al raggiungimento di questo obiettivo.

Ispezione agli stabilimenti di produzione farmaci

L'attività ispettiva viene svolta dagli ispettori del Settore Biologico, su richiesta dell'AIFA e della Presidenza dell'ISS, per valutare la conformità alle Norme di Buona Fabbricazione (NBF) delle Officine farmaceutiche produttrici di Principi farmacologicamente attivi e di farmaci destinati ad uso umano. Presso il Settore sono in ruolo quattro ispettori senior, uno dei quali momentaneamente distaccato presso l'EDQM, con il compito di svolgere ispezioni presso i Paesi terzi (India, Cina e Giappone) dove vengono prodotti molti dei principi farmacologicamente attivi utilizzati nella produzione di farmaci. 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.

Piano triennale

La programmazione del triennio 2009-2011, prevede l'incremento delle attività ispettive, non solo presso le Officine produttrici di farmaci e di Principi Farmacologicamente Attivi, ma anche verso quei 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 mediante l'impiego di 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 Norme di Buona Fabbricazione.

Ispezione campi sperimentali autorizzati al rilascio deliberato di Organismi Geneticamente Modificati

Il Settore Biologico 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.

Piano triennale

Nel triennio 2009-2011 l'ISS, tramite la partecipazione degli esperti, ispettori del Settore Biologico 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 di piante geneticamente modificate.

Parere concernente l'emissione deliberata di organismi geneticamente modificati

Il Settore Biologico 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.

Piano triennale

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

Il Settore Biologico dell'ISS partecipa come membro ai lavori della Commissione interministeriale di Valutazione per l'impiego confinato di Microorganismi Geneticamente Modificati (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.

Piano triennale

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 sul territorio nazionale, di valutarne la congruità e di definirne la sicurezza per l'uomo, gli animali e l'ambiente.

Valutazione dei rischi derivanti da agenti biologici

Il Settore Biologico collabora con il Servizio Prevenzione e Sicurezza 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. In questo ambito vengono svolte attività formative per il personale dell'ISS.

Piano triennale

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 i Dipartimenti e l'SPS richiederanno relativamente agli aspetti di competenza (rischio biologico).

**Servizio Informatico,
Documentazione, Biblioteca ed Attività Editoriali**

Attività di ricerca

Autenticazione federata: Shibboleth

L'accesso alle risorse della rete in ISS (file, directory, applicazioni web e non) avviene attraverso un sistema centralizzato di autenticazione di utenti e gruppi. Il sistema utilizzato è il servizio LDAP, probabilmente il più diffuso, in particolare *Active Directory*, implementato dalla Microsoft.

Se questo sistema centralizzato risolve il problema del *single sign on*, l'accesso a risorse esterne all'ISS comporta comunque la memorizzazione di diverse credenziali (username e password) per accedere ai servizi esteri di università, entità governative, altri enti di ricerca. L'adozione di Shibboleth, software *open source*, l'adesione alla federazione permetterebbe l'utilizzo delle proprie credenziali all'interno delle entità tra loro federate, entità che condividono le regole adottate per le credenziali e le autorizzazioni per l'accesso alle risorse.

Risultati attesi nel triennio

Facilitazione di accesso alle risorse disponibili tra le varie entità federate consentendo così ai singoli fruitori di utilizzarle attraverso un'unica credenziale.

Trasferibilità dei risultati

Al termine della sperimentazione il progetto potrà essere utilizzato in altri contesti.

BIBLIOSAN

Progetto del Ministero della Salute, con finanziamento su ricerca corrente, che vede coinvolti ISS, ISPEL, IRCCS; Istituti Zooprofilattici. Tre finalità: i) creazione di un catalogo unico dei periodici; ii) scambio dei documenti tra i partner; iii) realizzazione di una rete per l'accesso condiviso alle risorse elettroniche (periodici, basi dati, e-book). A partire dal 2007 Bibliosan è evoluto in "Sistema" che può contare su di un finanziamento annuale da parte del Ministero per l'acquisto di risorse elettroniche condivise dagli oltre 50 partner. La Biblioteca dell'Istituto è il fulcro dell'intero sistema, mentre all'Istituto stesso sono attribuite le funzioni di centro amministrativo di riferimento e gestione delle risorse.

Risultati attesi nel triennio

Incremento e razionalizzazione degli accessi alle risorse elettroniche. Diminuzione del numero di titoli di periodici acquistati in formato cartaceo. Acquisizione delle risorse elettroniche attraverso i fondi BIBLIOSAN e conseguente minori oneri finanziari sul bilancio dell'Istituto.

Trasferibilità dei risultati

È previsto l'allargamento e il coinvolgimento agli IRCCS di nuova istituzione e sono allo studio eventuali convenzioni con alcune ASL.

Biobanche

I campioni biologici umani vengono raccolti e conservati per vari scopi dalle varie biobanche.

In generale tale opera ha come fine quello di facilitarne l'utilizzo nell'ambito della ricerca, diagnosi e cura.

La necessità di disporre di un elevato numero di campioni omogenei per effettuare studi di ricerca rende necessario che tali campioni siano raccolti, conservati e corredati di informazioni che li rendano confrontabili a prescindere dalla biobanca ove questi sono conservati.

A questo punto è necessario che tali informazioni siano messe a fattor comune, che siano disponibili presso un unico database che consentirebbe alla rete dei partecipanti di consultare l'insieme dei campioni e gestire l'interscambio degli stessi nell'ambito delle linee guida stabilite. Tale opera di standardizzazione porterebbe a facilitare l'interrelazione con le altre reti, europee e non.

Per realizzare quanto detto è necessaria l'implementazione della struttura hardware e lo sviluppo di procedure software atte ad integrare le informazioni raccolte, a garantirne il flusso continuo e la qualità dei dati presenti nel database centralizzato. I dati raccolti saranno consultabili su un sito web che conterrà anche le linee guida, le politiche adottate e le procedure per l'utilizzo dei campioni. Oltre a una gestione centralizzata dei dati delle biobanche si potrebbe sviluppare un software per la gestione della singola biobanca che risponda ai criteri stabiliti a livello generale, in particolare la parte delle autorizzazioni necessarie e le procedure di esportazione del sottoinsieme dei dati necessari alla biobanca centrale.

Bioinformatica

Negli ultimi anni c'è stato un aumento esponenziale della produzione di dati biologici, in particolare il sequenziamento automatico del DNA e i nuovi sviluppi nella genomica e nella proteomica; tale tendenza continuerà con la diffusione di strumenti atti a raccogliarli. Da questa mole di informazioni si possono avere conoscenze estremamente importanti per la ricerca in generale e per la scienza medica in particolare. La bioinformatica è l'applicazione dell'informatica per la gestione e l'analisi dei dati e più aumentano questi dati maggiore diventa la necessità di avere database per la loro registrazione e di potenza e velocità di calcolo per l'analisi e l'elaborazione. Dal punto di vista infrastrutturale sono necessarie notevoli disponibilità di memoria ed è necessario il potenziamento delle reti per consentire lo scambio delle informazioni raccolte. Al fine di poter rispondere prontamente a quelle che saranno le esigenze future è necessario il potenziamento della rete interna e della connettività verso l'esterno, la possibilità di poter disporre di memoria aggiuntiva in tempi brevi, attraverso una sua gestione modulare, e infine mettere a disposizione software per le elaborazioni bioinformatiche, sviluppato internamente e/o acquisito, in particolare software *open source* in modo da poterlo adattare alle specifiche elaborazioni necessarie alla ricerca.

Risultati attesi nel triennio

I risultati attesi sono lo sviluppo di un'infrastruttura adeguata alla potenza di calcolo e alle esigenze di trasmissione dei dati necessarie a fornire un adeguato servizio. Dalla collaborazione con i ricercatori lo sviluppo di software specializzato alle analisi da effettuare.

Trasferibilità dei risultati

Le metodologie sviluppate potranno essere messe a disposizione della comunità scientifica nonché il software utilizzato, sviluppato o le implementazioni di software esistente.

CMS – Content Management System e BackOffice

Nel corso degli ultimi anni il sistema di gestione dei contenuti dei siti ISS è stato utilizzato al limite della sue possibilità in relazione alle necessità specifiche dell'Ente.

Questa fase ha consentito di acquisire l'esperienza e le professionalità necessarie alla gestione dei progetti comunicativi, con costi minimi, facendo di questo Settore uno dei riferimenti nazionali in merito alle tecnologie web.

Alla luce di quanto sopra si rende ora necessaria la migrazione del CMS – *Content Management System* e del relativo *BackOffice* su una piattaforma che sia perfettamente integrata nella realtà aziendale, aderente alle necessità comunicative presenti e future e sufficientemente malleabile da poter consentire lo sviluppo di progetti di *hosting*, *housing* e comunicazione per conto terzi, con i relativi benefici economici e d'immagine.

Il progetto di migrazione prevede tre fasi:

- Raccolta dei requisiti e analisi concettuale. I requisiti sono stati più volte formalizzati, documentati e aggiornati concorrentemente allo sviluppo della piattaforma attuale e quindi non richiedono alcun impegno aggiuntivo.
- Progettazione e realizzazione. La progettazione riguarderà la struttura del database che dovrà ospitare i dati, la ristrutturazione degli schemi attuali in modo da rappresentare un sistema realmente relazionale ed è facilitata oltre che da quanto detto al primo punto, anche dal fatto che la struttura comunicativa attuale è stata concepita, nei limiti del prodotto utilizzato, in funzione di questa migrazione. Quindi si provvederà alla realizzazione di un *BackOffice* integrato nel dominio aziendale e nella Intranet ISS che verrà parallelamente adeguata, in modo che tutti gli account che vi potranno operare siano o account di dominio ISS o partizioni LDAP create *ad hoc* per la gestione di progetti terzi (v. ACC – Alleanza Contro il Cancro). Infine si provvederà alla realizzazione delle classi, delle procedure e dei modelli che consentano l'estrazione dei dati ai fini della visualizzazione come progetti web aderenti alla Legge 4/2004 e relativi Decreti attuativi, verso la quale l'ISS vanta il primato di essere l'unica PA iscritta all'elenco dei Valutatori CNIPA.
- Test e invio in produzione. La casistica di test verrà sviluppata parallelamente, e utilizzata all'interno del ciclo di sviluppo secondo il modello di B.W. Bohem, in maniera da garantire congruenza, solidità, sicurezza e rapidità di realizzazione, utilizzando le risorse conseguentemente.

La piattaforma per la base di dati MSSQL, il *BackOffice* un applicativo DotNet, mentre le classi e i modelli di estrazione e presentazione, a meno di framework specifici, saranno scritti in Java con tecnologie JEE.

Risultati attesi nel triennio

Realizzazione del software per la gestione e la migrazione del CMS con l'obiettivo dell'aumento di efficienza ed efficacia nella gestione di tutto il processo.

Trasferibilità dei risultati

Il nuovo CMS potrebbe essere utilizzato per gestire agevolmente siti web fornendo tale servizio anche all'esterno a costi contenuti.

Estensione del VoIP

Voice over IP, acronimo VoIP, è una tecnologia che rende possibile effettuare una conversazione telefonica sfruttando una connessione Internet o una qualsiasi rete privata basata sul protocollo IP, per esempio una LAN all'interno di un edificio o di un gruppo di edifici, anziché passare attraverso la normale linea di trasmissione telefonica. Ciò consente di eliminare le relative centrali di commutazione e di economizzare sulla larghezza di banda occupata. Vengono instradati sulla rete pacchetti di dati contenenti le informazioni vocali, codificati in forma digitale, e ciò solo nel momento in cui è necessario, cioè quando uno degli utenti collegati sta parlando. È già stato realizzato un progetto pilota in cui è stata sperimentata questa tecnologia. Questo progetto è andato a buon fine e quindi è possibile pensare di estendere all'intero Istituto questo tipo di tecnologia.

I vantaggi immediati sono: una riduzione dei costi dovuta alla possibilità di utilizzare una sola rete integrata per voce e dati, che garantisce una riduzione dei bisogni totali di infrastruttura. Il VoIP consente di ottimizzare e semplificare la gestione del traffico telefonico, compresi i costi, e la possibilità del *Number Portability*. La tecnologia VoIP permette l'implementazione della multimedialità. Il progetto non intende soppiantare definitivamente la telefonia tradizionale ma affiancarla.

Risultati attesi nel triennio

L'estensione della rete VoIP facilita ulteriormente la gestione e la manutenzione della telefonia in Istituto.

Trasferibilità dei risultati

Le specifiche del progetto potranno essere applicate a strutture o enti con problematiche simili.

Ethicsweb – Inter-connected European information and documentation system for ethics and science: European Ethics Documentation Centre

Ethicsweb è un progetto finanziato dalla Commissione Europea nell'ambito del VII Programma Quadro, con l'obiettivo di creare un centro di documentazione in etica delle scienze attraverso:

- un facile accesso all'informazione;
- il collegamento tra le diverse attività esistenti nell'ambito dell'etica della scienza;
- la documentazione di programmi di scambio o di formazione tra le varie istituzioni per promuovere in Europa un accesso transnazionale alla scienza;
- il miglioramento e il coinvolgimento della società civile nel dibattito sui temi etici;
- la visibilità di documenti, istituzioni, esperti, progetti europei coinvolti nel dibattito etico.

Il progetto è coordinato dal *German Reference Centre for Ethics in the Life Sciences* di Bonn e si articola in sette *Work Package* (WP), ognuno dei quali con un obiettivo specifico:

WP1: *Project Management, Coordination and Quality Assurance*

WP2: *Merging of Databases*

WP3: *Techniques of Content Management, Portal Management and Retrieval Systems*

WP4: *Semantics (Exchange schemas) and Content Management (Thesauri and Ontologies)*

WP5: *Forum for Capacity Building*

WP6: *Forum for Legal Standards*

WP7: *Establishing links to Database and Documentary related EC-Projects*

L'ISS è il leader del WP4.

Risultati attesi nel triennio

In previsione della realizzazione del portale, l'ISS ha il compito di coordinare la creazione di standard documentari per la descrizione e lo scambio di dati riguardanti diverse tipologie di documenti che, una volta tradotti nel linguaggio comune di scambio, andranno a confluire nel sito europeo.

Sarà inoltre realizzato un registro per l'organizzazione della conoscenza (*Knowledge Organisation Systems Registry*) con link a thesauri e ontologie.

Attualmente è stato sviluppato un prototipo del portale europeo (www.ethicsweb.org) in cui è attivo un forum, riservato allo scambio di informazioni tra i diversi gruppi di lavoro. Seguirà la realizzazione del portale ufficiale in cui si renderanno disponibili, attraverso una struttura modulare e dinamica, documenti come: leggi, normativa internazionale, documenti a testo completo, linee guida, progetti di ricerca, notizie ed eventi, corsi di formazione, corsi universitari, liste di esperti bioeticisti.

Trasferibilità dei risultati

Il progetto prevede la creazione di un polo unico europeo attraverso cui il ricercatore, lo studente, il cittadino, possano recuperare, tramite differenti strumenti, la documentazione esistente nei vari Paesi europei. Ethicsweb intende quindi essere un punto comune d'incontro tra le diverse culture, in cui si possano facilmente reperire risorse provenienti da una varietà di fonti tali che, se non integrate tra loro, renderebbero difficilmente recuperabili le informazioni in questo campo.

Libro antico

Recupero catalografico e valorizzazione del fondo libri rari della Biblioteca. Il progetto si articola in due fasi: i) catalogazione informatizzata degli oltre 1.000 volumi appartenenti al fondo rari e delle acque minerali, con inserimento delle descrizioni bibliografiche nel programma SEBINA-Libro Antico; ii) digitalizzazione di circa 5.000 immagini dei frontespizi e delle pagine più significative dei volumi e successiva realizzazione di un DVD e di un prezioso volume a stampa con tiratura di 1.000 copie.

Risultati attesi nel triennio

Completamento del catalogo informatizzato della Biblioteca con inserimento dei dati dell'unica parte di materiali ancora non disponibile in formato elettronico, anche in vista della possibile creazione di un catalogo dei libri antichi di argomento sanitario. Valorizzazione del fondo attraverso la conoscenza non solo catalografica ma anche tramite la disponibilità di immagini significative sia su web che su formato elettronico (DVD) e cartaceo. È prevista la pubblicazione di un catalogo e di un volume di pregio.

Trasferibilità dei risultati

Accessibilità via internet di descrizioni e immagini. Circolazione delle informazioni sui supporti elettronico e cartaceo.

NECOBELAC, una rete di collaborazione tra Europa, America Latina e Caraibi per favorire la produzione e diffusione di informazioni scientifiche nel settore della salute pubblica

NECOBELAC è un progetto triennale (2009-2011) finanziato dalla Commissione Europea nell'ambito del VII Programma Quadro nell'Area "Science in Society", e coordinato dall'ISS. NECOBELAC è l'acronimo di "Network of Collaboration Between Europe and Latin American Caribbean Countries"; infatti il progetto intende stabilire una rete di collaborazione fra Europa, America Latina e Caraibi al fine di promuovere un'attività di formazione in materia di scrittura scientifica e di diffusione delle informazioni secondo i nuovi paradigmi di comunicazione basati sull'accesso aperto (*Open Access*). L'area di intervento è la salute pubblica.

L'idea del progetto nasce nel nostro Istituto che si configura come ente editore e produttore di informazioni scientifiche nel settore della sanità pubblica e ha una lunga tradizione anche in attività di formazione in materia di scrittura scientifica, oltre ad aver sviluppato e reso operativo, dal 2006, un archivio digitale (<http://dspace.iss.it/dspace/>), conforme ai principi del movimento *Open Access* che rappresenta un punto di raccordo per tutta la produzione scientifica nell'area della biomedicina in Italia.

I partner del progetto sono, oltre all'ISS che ne è il coordinatore, il *Consejo Superior de Investigaciones Científicas* (CSIC) Spagna; l'*University of Nottingham* (SHERPA) Regno Unito; *Centro Latino Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde* (BIREME, PAHO) Brasile; l'*Instituto de Salud Pública* (ISP) Colombia; l'*Universidade do Minho* (UMINHO), Portogallo.

Risultati attesi nel triennio

Uno dei punti di forza del progetto NECOBELAC è la proposta di un cambiamento culturale e non solo infrastrutturale nelle modalità di produzione e diffusione dell'informazione. La prospettiva è quella di promuovere, attraverso una rete di collaborazione, uno scambio bidirezionale Europa, America Latina e Caraibi che superi la visione europacentrica limitata a un trasferimento di *know-how* di informazioni e formazione verso l'America Latina.

La ricchezza e la diversità delle risorse informative dei due continenti fa sì che la rete di cooperazione possa funzionare garantendo un mutuo vantaggio per tutti i Paesi coinvolti e lo sviluppo di nuove attività di ricerca su basi collaborative.

I partner europei rappresentano i maggiori esponenti del movimento *Open Access* in Europa, mentre BIREME (il centro specializzato della PAHO – *Pan American Health Organization* in seno alla WHO) vanta una consolidata tradizione nella diffusione di informazioni e documentazione scientifica in rete.

Il contributo di CSIC (Spagna) e dell'Università di Minho (Portogallo) garantisce il superamento delle barriere linguistiche facilitando i contatti in tutti i Paesi di lingua spagnola e portoghese.

Inoltre, pur essendo molti in Europa i progetti e le iniziative di promozione del modello di pubblicazione in *Open Access* per la diffusione dei risultati della ricerca, NECOBELAC si pone attualmente come l'unico progetto focalizzato su un'area tematica specifica rappresentata dalla sanità pubblica. Questa caratteristica garantisce l'individuazione di una strategia operativa mirata in grado di rilevare comuni esigenze di informazione e formazione.

Trasferibilità dei risultati

I risultati saranno progressivamente forniti tramite la redazione di rapporti di attività su: produzione di prototipi di corsi di formazione, realizzazione di corsi online e residenziali, produzione di materiale didattico, esperienze pilota nell'attivazione di archivi digitali aperti, ecc.

Una griglia di riferimento impostata per documentare la produzione di pubblicazioni scientifiche e la loro diffusione in rete in ogni Paese partner consentirà di monitorare i risultati e l'impatto del Progetto in termini di corsi di formazione svolti, numero e tipologia di pubblicazioni prodotte e depositate negli archivi istituzionali, libero accesso alle riviste online, nuove collaborazioni, ecc.

Il Progetto intende promuovere nuove collaborazioni internazionali non solo tramite programmi di formazione sulle tecniche di scrittura scientifica e nuovi modelli editoriali di diffusione dell'informazione, ma anche attraverso la costituzione di una rete di istituzioni che proseguiranno la collaborazione anche successivamente al termine del Progetto. L'aspettativa più marcata è infatti quella di utilizzare a lungo termine i servizi e i materiali prodotti da NECOBELAC in un'ottica di cooperazione tra i due continenti per il progresso della cultura scientifica.

Realizzazione di un portale delle linee guida italiane in biomedicina

Nell'ambito del Sistema Nazionale Linee Guida verrà realizzato un portale per la selezione, la raccolta e la catalogazione delle linee guida italiane relative alla biomedicina, prodotte da ASL, ospedali, società scientifiche o da enti governativi e di ricerca, presenti in Internet in formato elettronico. Il progetto ha realizzato un prototipo di banca dati, e implementerà un sito web con funzione di portale di accesso a tutte quelle risorse che attualmente sono disperse e non ricercabili univocamente.

Gli obiettivi specifici consistono nel:

- Fornire agli operatori dell'SSN accesso a siti nazionali ed internazionali contenenti materiale sull'appropriatezza delle prestazioni mediche.
- Fornire criteri e materiale di confronto delle diverse linee guida relative allo stesso argomento.
- Fornire ai pazienti la valutazione di criteri relativi a specifici quesiti clinici.
- Dare una panoramica sulle attività svolte e in fase di svolgimento nel campo delle linee guida e della loro implementazione a livello nazionale.
- Dare la possibilità di reperire esperti nelle varie aree specialistiche al fine della redazione di linee guida nell'ambito del Sistema Nazionale Linee Guida.

Risultati attesi nel triennio

È stata realizzata una banca dati per l'archiviazione delle risorse raccolte (oltre cento) ed è in corso di realizzazione l'interfaccia web all'interno del sito dell'Istituto. Il progetto proseguirà quindi in varie fasi:

- continuerà la ricerca delle fonti più autorevoli e accreditate, produttrici di linee guida, nonché la ricerca e la selezione delle linee guida disponibili in rete. Saranno inoltre ricercate e catalogate anche linee guida disponibili in altri formati;
- continuerà la catalogazione, descrizione e analisi del contenuto di ogni linea guida e l'indicizzazione, in italiano e in inglese, delle linee guida inserite nel portale, tramite parole chiave estratte dal thesaurus *Medical Subject Headings* (MeSH);
- sarà effettuato il collegamento ipertestuale al testo completo della linea guida, ove possibile.

La banca dati delle linee guida italiane sarà quindi incrementata e sarà effettuato il collegamento alle principali linee guida internazionali.

Trasferibilità dei risultati

Il portale delle linee guida realizzato dall'Istituto si proporrà come punto di riferimento:

- per i medici dell'SSN (riduzione della variabilità assistenziale, confronto con gli obiettivi del PSN-PSR, formazione permanente).
- Per i pazienti (informazione sulle alternative terapeutiche, condivisione degli obiettivi dell'SSN).
- Per le associazioni dei pazienti (bisogni informativi, stato della ricerca).

Lo sviluppo del portale contribuirà alla diffusione in Internet delle informazioni di interesse sanitario qualitativamente valide; tali informazioni saranno ricercabili attraverso vari punti di accesso e con terminologia standardizzata. Le informazioni raccolte saranno riunite in un unico sito analogamente ad altre iniziative realizzate a livello internazionale.

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 già predisposto un sito (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), 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 e incoraggiarli alla consultazione del portale realizzato dall'ISS
- 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 Tesoro Italiano di Bioetica; revisionare e aggiornare il Tesoro stesso; completare la sua traduzione in inglese; inserirlo nell'ambito di progetti di thesauri multilingue
- Inserire la banca dati all'interno di un sistema europeo integrato di diffusione e ricerca dell'informazione nel campo della bioetica.

Risultati attesi nel triennio

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).

Acquisto della nuova versione del software Sebina *Open Library*, utilizzato per la gestione della banca dati, per 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 Tesoro Italiano di Bioetica e, possibilmente, 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 progetto 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).

Sistemi esperti in ambito diagnostico

Il progetto si basa sull'applicazione di un "sistema esperto" che aiuti nell'individuazione delle patologie attraverso l'utilizzo degli elementi che le caratterizzano cercando così di limitare il ritardo diagnostico attraverso l'uso di strumenti di facile utilizzo. All'interno dell'intelligenza artificiale, un sistema esperto è un insieme di software che attraverso vari algoritmi tenta di replicare i comportamenti di esperti nell'ambito di un certo campo di attività.

Tali sistemi vengono utilizzati attraverso procedure inferenziali funzionali alla risoluzione di problemi particolarmente complessi e/o che abbiano bisogno di conoscenze molto specifiche che solo degli esperti in particolari discipline afferenti all'argomento possiedono.

I programmi utilizzati dai sistemi esperti sono in grado di porre in atto procedure di inferenza adeguate alla risoluzione di problemi particolarmente complessi, a cui potrebbe, se posto in una dimensione umana, porre rimedio solo un esperto del settore disciplinare in cui rientra la questione da risolvere.

Tale processo si suddivide in tre parti: l'insieme delle informazioni che portano alla conoscenza di un argomento, un motore inferenziale e un'interfaccia per consentire l'interazione tra il fruitore e il software.

Un motore inferenziale simula il ragionamento umano, le sue logiche, attraverso degli algoritmi. Se parte da un principio generale e arriva ad un particolare si parla di processo deduttivo se avviene l'inverso allora il processo è detto induttivo.

Risultati attesi nel triennio

Riuscire a fornire uno strumento che aiuti il medico nell'individuare facilmente patologie poco diffuse o la cui sintomatologia non sia chiara.

Trasferibilità dei risultati

L'individuazione di un sistema in un certo ambito di conoscenza medica, gruppo di patologie, potrà essere trasferito facilmente anche in altri ambiti.

Smart card: verso un'autenticazione forte

La criticità dei dati trattati dall'ISS richiede meccanismi di protezione mirati che vanno oltre la semplice autenticazione utente/password, detta anche debole. L'introduzione di una *smart card* eleverebbe in maniera sostanziale la sicurezza del sistema informativo. Quanto detto avverrebbe attraverso una *smart card* ibrida che oltre al microchip integrerebbe anche la banda magnetica. Con l'applicazione della foto e dei dati personali sul supporto tale carta permetterebbe il riconoscimento a vista, l'accesso fisico ai tornelli nonché l'autenticazione per accedere ai servizi di rete. Il progetto consente inoltre un'implementazione della firma digitale e il supporto della cifratura. Per la realizzazione saranno necessari fondi adeguati per il conseguimento degli obiettivi.

Risultati attesi nel triennio

Eliminazione degli incidenti dovuti ad una "condivisione" delle credenziali di autenticazione fra i vari utenti nonché la rilevazione immediata di credenziali compromesse essendo la *smart card* personale e indispensabile per l'autenticazione. Possibilità di accedere a tutti i servizi di rete dell'ISS attraverso un unico *sign-on*.

Trasferibilità dei risultati

Le specifiche del progetto potranno essere applicate a strutture o enti con problematiche simili.

Storie e memorie di un ente di ricerca: i protagonisti silenziosi dell'Istituto Superiore di Sanità raccontano

Il progetto intende documentare una parte della storia della sanità pubblica attraverso la nascita e lo sviluppo dell'ISS. Il presupposto fondamentale su cui si basa il progetto è la consapevolezza che la storia non è fatta soltanto da eventi ufficialmente documentati e riconosciuti, ma anche e soprattutto dal vissuto quotidiano dei suoi protagonisti che si manifesta attraverso la memoria individuale, non sempre presa nella dovuta considerazione nella ricostruzione storica degli eventi. La storia dell'ISS del secolo scorso è ancora presente nel ricordo di chi l'ha vissuta direttamente e dunque è recuperabile con l'impegno di chi ne percepisce l'importanza e l'unicità.

In questo contesto il progetto intende ricercare e selezionare testimonianze e materiale potenzialmente utile a documentare l'evoluzione storico-scientifica e culturale di un ente di ricerca e della società stessa attraverso fonti diverse: documentazione e fotografie possedute dall'ente, o facenti parte di collezioni private, di archivi istituzionali o di altri enti che hanno collaborato con l'Istituto; interviste a persone di rilievo nella vita dell'ente, che hanno 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. Al fine di organizzare e rendere disponibile il materiale e le testimonianze raccolti sarà utilizzata una teca multimediale, appositamente creata, contenente immagini, filmati, poster, fotografie di strumenti scientifici e altri oggetti di interesse storico-documentario.

Risultati attesi nel triennio

I prodotti realizzati garantiranno non solo il recupero di un prezioso passato e la promozione dell'immagine dell'ente a livello nazionale e internazionale, ma anche, e soprattutto, permetteranno di rappresentare in modo assolutamente originale una storia inedita e ricchissima di spunti di riflessione, rafforzando la consapevolezza, da parte di tutti coloro che lavorano o hanno lavorato all'interno dell'istituzione, di essere protagonisti attivi nell'espletamento della *mission* dell'ente e più in generale della storia della sanità pubblica italiana. L'interesse a documentare tale storia si fonde, in questo progetto, con un più ampio interesse a non perdere la memoria di un secolo contrassegnato da importanti cambiamenti a livello sociale e politico. Il

ricordo dei protagonisti di questa storia, anche se non sempre esattamente corrispondente ai fatti (di cui si ha certezza storica) rappresenta tuttavia una realtà di come tale storia è stata ed è percepita; ciò consente di approfondire le motivazioni per cui certi fatti sono distorti spiegandone le cause attraverso il confronto con i dati reali.

Trasferibilità dei risultati

I prodotti realizzati tramite questo progetto saranno fruibili a più livelli, in particolare: studenti della scuola superiore, storici, sociologi, ricercatori e anche pubblico in generale in quanto le storie raccontate saranno esposte con linguaggio semplice e allo stesso tempo con ricchezza di particolari, con l'obiettivo di offrire non solo una memoria storica del principale ente di ricerca sanitaria italiano che ben si inserisce in un contesto internazionale, ma anche una visione retrospettiva inedita della vita romana del secondo '900. I protagonisti silenziosi di questa storia infatti racconteranno la loro vita lavorativa e le loro abitudini anche familiari nel contesto cittadino: i rapporti con i superiori, l'organizzazione del lavoro, il rispetto delle regole, la loro percezione dei cambiamenti, il modo di presentarsi, vestirsi, relazionarsi, come arrivare sul luogo di lavoro, come affrontare il problema dei figli, la mensa, le pari opportunità, ecc.

I prodotti realizzati dal progetto potranno essere anche indipendentemente utilizzati a fini didattici e in occasioni diverse: mostre, convegni, eventi culturali, cinematografici, documentari, ecc. Inoltre la stessa metodologia di progetto potrà essere replicata in enti anche di natura diversa ai fini della ricostruzione storica degli eventi che li coinvolgono.

Sviluppo di un archivio fotografico digitale dell'Istituto Superiore di Sanità

L'ISS ha avviato già da diversi anni una serie di attività mirate al salvataggio, alla salvaguardia, allo studio e all'utilizzo per fini diversi del suo vasto patrimonio di beni storico-scientifici che va dalla strumentazione scientifica ai documenti d'archivio, dai filmati, alle fotografie, alle storie orali. Nel più ampio disegno di recupero del patrimonio storico, questo progetto intende organizzare in modo sistematico il patrimonio fotografico dell'ISS rappresentato da collezioni provenienti da diversi laboratori dell'ISS e spesso fortunatamente sopravvissute in collocazioni provvisorie, con ripetuti traslochi nei quali è probabilmente andata dispersa una parte del patrimonio originario.

La grande maggioranza delle foto attualmente in possesso del Settore Attività Editoriali dell'ISS formano insiemi tematici che spesso si ripetono e in parte si sovrappongono da un deposito originario all'altro. Parte delle fotografie è stata sottoposta a interventi conservativi e/o a esperimenti parziali di digitalizzazione e di integrazione delle sommarie legende originarie quando disponibili. Tali primi tentativi di sistemazione, in vista di un'organizzazione e catalogazione definitiva dell'archivio che ne consenta la piena fruizione a scopi di studio e di didattica, hanno riservato ripetute sorprese per la vasta gamma di argomenti rappresentati e per la buona qualità di gran parte delle immagini. In assenza di risorse e competenze interne per la creazione di un archivio digitale conforme agli standard internazionali, si rende necessaria un finanziamento che possa garantire la realizzazione di un prodotto di qualità e durevole nel tempo.

Risultati attesi nel triennio

Con un opportuno finanziamento, si potrà pervenire ad una sistemazione razionale dell'archivio (originali e immagini digitalizzate) e alla produzione di un articolato catalogo, con una vasta gamma di possibilità di successivo utilizzo: mostre e altre iniziative scientifico-didattiche, pubblicazioni a tema, immissione in rete con la migliore organizzazione tematica e i necessari accorgimenti per il rispetto del copyright, cessioni a parti interessate di vario tipo, anche con possibili ritorni economici, ecc. Tale lavoro dovrebbe articolarsi secondo successive fasi a breve, medio e lungo termine, come per esempio:

- nell'immediato, unificazione degli archivi esistenti e digitalizzazione delle immagini con:

- pubblicazione online di una selezione di immagini prescelte tra quelle più significative e già complete di legende identificative rispetto ad attività, luoghi, date, persone, ecc.;
- archiviazione di tutto il patrimonio ad uso interno;
- in un tempo successivo, descrizione il più possibile completa di tutte le immagini, con il ricorso a varie fonti informative interne ed esterne, sino al raggiungimento di un tetto non superabile nel corso del progetto (fatti salvi ovviamente ulteriori aggiornamenti man mano che si rendono eventualmente disponibili);
- realizzazione di prodotti a stampa per argomenti selezionati.

Trasferibilità dei risultati

L'archivio fotografico dovrebbe consentire di documentare la storia dell'ISS nel tempo tramite l'individuazione di persone, fatti ed eventi legati non solo allo sviluppo delle ricerche scientifiche, o a particolari situazioni di emergenza sanitaria, ma anche da un punto di vista più prettamente socio-culturale.

L'utilizzo delle immagini d'archivio potrà essere di estrema utilità per la produzione di volumi a stampa, mostre e filmati, diretti anche al grande pubblico e alle scuole.

Traduzione italiana dei MeSH (*Medical Subject Headings*)

I MeSH costituiscono il vocabolario di oltre 25.000 termini, prodotto e gestito dalla *National Library of Medicine* (NLM). La traduzione italiana del *thesaurus Medical Subject Headings* (MeSH) è stata realizzata nell'ambito di una collaborazione tra l'ISS e la *National Library of Medicine* (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 *Unified Medical Language System* (UMLS) della NLM, avviato nel 1986 per la creazione di un linguaggio medico accessibile universalmente attraverso i sistemi informativi computerizzati. Il Settore Documentazione, in collaborazione con il Settore Informatica, 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 del descrittore principale.

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 previsti per l'anno 2009 sono oltre 500. Il sito deve essere aggiornato annualmente con l'inserimento dei nuovi descrittori e della relativa traduzione. Continua anche l'attività di traduzione dei sinonimi (in totale oltre 100.000) 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 la categoria C (Patologie), secondo gli sviluppi della terminologia scientifica. Dal 2004 la traduzione italiana dei MeSH è consultabile gratuitamente sul sito dell'ISS (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 (circa 13.000).

Trasferibilità dei risultati

Per quanto riguarda l'utenza esterna all'ISS, l'impiego della traduzione italiana all'interno di applicazioni informatiche è consentito solo previo pagamento di una tariffa regolamentata dal Decreto del Presidente dell'ISS del 16/06/2008; la tariffa è differenziata per diverse modalità di utilizzo e tipologie di utenza. L'associazione Alleanza contro il Cancro, con il progetto CignoWeb, è uno dei tanti utenti esterni all'ISS che utilizza la traduzione italiana dei MeSH per l'indicizzazione delle risorse presenti nel proprio catalogo. Analogamente, molti altri repertori di risorse Internet 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. È stato inoltre predisposto uno spazio web condiviso per la collaborazione tra i traduttori internazionali e, in collaborazione con il *Karolinska Institute*, la creazione di 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 per i sistemi computerizzati

Partecipazione alle ispezioni per la Buona Pratica di Laboratorio (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'OCSE 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.

Piano triennale

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 CNIPA, ai sensi dall'art. 3 del DPR 1 marzo 2005, n. 75 pubblicato nella GU 3 maggio 2005, n. 101, e dalla Deliberazione CNIPA 15 settembre 2005, n. 25, pubblicata nella GU 21 settembre 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.

Piano triennale

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

Accordo quadro tra la Scuola internazionale ambiente salute e sviluppo sostenibile e l'ISS

L'associazione denominata "Scuola internazionale ambiente salute e sviluppo sostenibile", in breve SIASS è costituita il 26 ottobre 2004 tra l'Agenzia Regionale di Sanità, l'Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale della Toscana, l'Associazione Medici per l'Ambiente e l'Azienda Ospedaliera "A. Meyer" alla quale è subentrata nel 2007 la Federazione Italiana Medici di Medicina Generale. L'Associazione non ha scopo di lucro, e si propone lo scopo di:

- sviluppare e diffondere conoscenze scientifiche e competenze professionali in tema di salute, ambiente e sviluppo sostenibile in tutti i contesti istituzionali e operativi che possono concorrere a determinare miglioramenti della qualità di vita della popolazione;
- promuovere la cultura dell'integrazione interistituzionale, intersettoriale e multiprofessionale a livello regionale, nazionale e internazionale;
- favorire l'incontro tra i rappresentanti delle amministrazioni locali, nazionali e internazionali, nonché i rappresentanti delle associazioni e delle professioni, per valutare politiche e interventi di rilievo in quest'ambito;
- divenire punto di incontro, scambio e crescita per gli stessi operatori interessati.

Oggetto dell'accordo quadro è la collaborazione tecnico-scientifica tra le due parti per 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 agli operatori sanitari e ambientali, decisori e *stake-holder* coinvolti nella gestione delle attività in oggetto.

Le attività verranno condotte tramite iniziative concordate, oggetto di specifici accordi, sia per quanto riguarda modalità che tempi. Per la definizione di tali attività, viene costituito un Comitato paritetico, costituito dal due membri per parte.

Il primo progetto, denominato Salute e Ambiente Toscana per gli MMG (SAT-MMG) con inizio previsto per l'anno 2010, consiste nella formazione dei Medici di Medicina Generale della Regione Toscana sulle prevalenti tematiche ambientali di interesse sanitario. Il percorso formativo prevede in prima istanza la formazione di formatori (FDF) che, in seguito, condurranno l'aggiornamento degli MMG della Regione Toscana. La FDF consiste in un percorso formativo di 60 ore destinato a circa 20 animatori di formazione provenienti dalle strutture dell'SSN regionale. I partecipanti acquisiranno le competenze necessarie in campo didattico/metodologico e sulla specifica tematica della relazione tra salute e ambiente per poter costruire e attuare appropriate sessioni di aggiornamento per gli MMG che afferiscono all'area territoriale di competenza. Questo approccio presuppone, quindi, che i percorsi formativi saranno ritagliati sulle particolarità e fabbisogni rilevati nelle differenti aree geografico-ambientali ove operano gli MMG della Regione Toscana.

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.

Trasferibilità dei risultati

L'approccio didattico/organizzativo del progetto SAT-MMG può essere utilizzato da altre Regioni italiane o essere applicato ad altre tematiche di interesse e attualità in coerenza con gli obiettivi e le strategie sanitarie della Regione, ogniqualvolta che l'MMG (o il Pediatra di Libera scelta) rappresenti il punto nodale di contatto e di comunicazione/informazione con i cittadini.

Analisi organizzativa dei processi amministrativi e gestionali dell'ISS

Il progetto di Ricerca Corrente è stato elaborato dall'URE in collaborazione con *LUISS Business School* Divisione di LUISS GUIDO CARLI allo scopo di soddisfare le esigenze rappresentate dalla Presidenza e dalla Direzione Generale dell'ISS di ammodernamento dei meccanismi gestionali e amministrativi dell'Ente in un'ottica di miglioramento della competitività nazionale e internazionale e di sostegno alla capacità produttiva.

La *LUISS Business School* ha attuato un piano di lavoro orientato alla diagnosi dell'adeguatezza del sistema organizzativo, rispetto alla missione istituzionale dell'ISS, alle indicazioni degli obiettivi assegnati al Ministero della Salute nonché rispetto ai criteri di efficienza del funzionamento dell'assetto organizzativo.

Il Progetto si basa sulla valutazione delle ipotesi progettuali di architettura organizzativa, gestionale, amministrativa e informativa dell'Istituto coinvolgendo gli attori interessati per assicurare il conseguimento dei risultati attesi nonché la fattibilità e adattabilità del disegno di ricerca nel rispetto dei vincoli normativi.

Risultati attesi nel triennio

L'obiettivo fondamentale dell'analisi è quello di fornire elementi di chiarezza e consapevolezza delle soluzioni organizzative e gestionali emerse consentendo così di raggiungere pienamente gli obiettivi alla base dell'ideazione del progetto stesso.

Trasferibilità dei risultati

La trasferibilità dei risultati prodotti dalla ricerca consiste nel considerare la loro applicazione, opportunamente adattata, in sede di riorganizzazione formale delle procedure di gestione di questo Istituto anche in vista di una prossima riorganizzazione dell'intero Ente.

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 riuso dell'autorità informatica centrale.

Corsi di perfezionamento FAD in Management sanitario ISS – LUM

I Corsi di Perfezionamento proposti intendono offrire ai partecipanti un supporto per comprendere e affrontare i processi di cambiamento e aziendalizzazione in atto nelle strutture sanitarie, stimolando una visione plurisetoriale delle problematiche gestionali, integrando la preparazione professionale sui temi del management e della ricerca sui servizi sanitari. I Corsi si caratterizzano per un taglio prevalentemente pratico e operativo, sono composti di tre moduli obbligatori più uno a scelta nell'ambito di tre opzionali.

L'offerta formativa comprende una prima area corrispondente al Corso di Perfezionamento in Prevenzione e Promozione della Salute; una seconda area di Perfezionamento in Management e Programmazione Sanitaria e infine ad una terza area di Perfezionamento in Gestione delle Aziende Sanitarie.

Obiettivo dei corsi: fornire competenze e strumenti per l'inserimento e la crescita professionale dei partecipanti nell'ambito del management socio-sanitario.

La metodologia didattica adottata utilizza i principi dell'apprendimento per problemi (PBL).

La modalità di erogazione del corso è a distanza e in ciò consente, attraverso Internet, la fruizione dei contenuti nella tempistica più adatta alle esigenze di apprendimento del singolo e lo scambio di esperienze tra i partecipanti.

Risultati attesi nel triennio

- Formazione di almeno 30 discenti.
- Miglioramento delle competenze nelle ASL e nelle strutture territoriali da cui provengono i partecipanti nell'ambito della pianificazione e della gestione dei servizi sanitari.
- 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.
- 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 operatori della salute delle varie Regioni.

Trasferibilità dei risultati

Il Master consentirà la trasmissione di competenze nella pianificazione e nella gestione dei servizi sanitari presenti presso le diverse strutture territoriali sanitarie italiane.

Corso di formazione manageriale dei Dirigenti di Struttura complessa veterinaria

La formazione manageriale dei dirigenti dell'SSN è ormai da diversi anni una realtà consolidata che si è espressa e si esprime in una vasta gamma di percorsi formativi a valenza regionale o nazionale.

Il DPR n. 484 del 10 dicembre 1997 rimane il dettato legislativo di riferimento per l'organizzazione di percorsi formativi che siano in grado di erogare un attestato di formazione manageriale utile all'abilitazione come dirigente di struttura complessa. Il corso descritto in questo documento è costruito con il preciso scopo di attuare con scrupolo il requisito di legge e, nel contempo, di fornire un'opportunità di formazione efficace e funzionale alle attività e compiti affidati al Dirigente di struttura veterinaria complessa.

Gli enti che organizzano il corso sono l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Brescia, l'ISS, e settore competente del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali.

Il Corso si qualifica per alcune caratteristiche distintive:

- La valenza tecnico-scientifico-istituzionale degli organizzatori.

- L'utilizzo di metodi e strumenti di formazione rispondenti ai principi dell'andragogia (formazione dell'adulto), dallo studio di casi al *Problem-based Learning* (PBL), all'apprendimento esperienziale.
- La valutazione continua dell'apprendimento del partecipante.
- La valutazione continua della qualità percepita del corso.
- L'applicazione nella propria pratica professionale prevista dal progetto sul campo (Tesi).

Il tema generale del curriculum riguarderà, quindi, le competenze richieste ad un dirigente veterinario per poter gestire appropriatamente una struttura complessa.

Il programma formativo si articola in sette unità didattiche, coerenti con gli obiettivi del corso, e che vengono affrontate con un approccio multidisciplinare. Una ottava unità consiste nella presentazione e discussione della tesi (derivata dal progetto di lavoro sul campo).

L'apprendimento esperienziale rivestirà una particolare importanza: un'attenzione speciale sarà dedicata alle esercitazioni per formare i partecipanti alla capacità di applicare le conoscenze acquisite.

I docenti e gli esperti che fungeranno da risorsa di apprendimento e formazione in ciascuna unità didattica provengono prevalentemente da enti di eccellenza del settore veterinario e della sanità pubblica con concreta e prolungata esperienza di gestione.

Risultati attesi nel triennio

Il Corso intende fornire le principali conoscenze e capacità manageriali richieste ad un Dirigente di struttura complessa veterinaria. Come meta obiettivo il percorso formativo si prefigge di sviluppare le capacità di auto apprendimento che permettono a un professionista, in qualsiasi settore esso operi, di gestire efficientemente la propria formazione continua.

Alla fine del Corso il partecipante sarà in grado di:

- Progettare e realizzare interventi di sanità pubblica in ambito veterinario a livello di struttura complessa.
- Pianificare e attuare una strategia di valutazione delle attività di una struttura veterinaria complessa.
- Comunicare efficacemente e relazionarsi appropriatamente con i propri interlocutori.
- Ricercare e valutare criticamente la letteratura scientifica relativa al settore di competenza.
- Svolgere attività di ricerca applicata rilevante alla gestione di una struttura veterinaria complessa.
- Gestire appropriatamente le risorse umane, materiali e finanziarie afferenti alla struttura veterinaria complessa.

Trasferibilità dei risultati

Il percorso formativo in applicazione del DPR 484/97 è trasferibile con i dovuti adattamenti alle altre figure dell'SSN ricomprese nel Decreto.

Formazione professionale in salute pubblica tra ISS e Università di McGill

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.

Risultati attesi nel triennio

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 ed erogati secondo modalità sottoposte a procedure rigorose di valutazione e accreditamento sulla base delle indicazioni ricevute dai partecipanti (formatori e professionisti del settore socio-sanitario italiano e canadese), con valutazione del gradimento e dell'efficacia. 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. Si ricordano, a titolo indicativo, la *Mount Sinai Medical School* e l'Università di California – San Francisco (UCSF) per gli aspetti didattici legati alla comunicazione medico-paziente, *Stanford University* per l'utilizzazione di simulazioni in ambito didattico, l'*Harvard University* per l'insegnamento specifico nei Paesi in via di sviluppo, la *Concordia University* per le attività di valutazione "customizzata"). Tutte queste istituzioni sono già inserite nel network di collaborazioni del progetto.

Saranno poi sviluppate le seguenti azioni:

- Costruzione di una banca dati virtuale destinata alla raccolta e archiviazione specializzata di moduli formativi, casi di studio, letteratura scientifica e materiale didattico in generale.
- Erogazione di moduli formativi sperimentali attraverso modalità sincrona e asincrona attraverso forum virtuali, tirocini pratici e seminari residenziali e lavoro di gruppo virtuale sincrono (videoconferenza multipunto) tra i partecipanti, con facilitazione didattica garantita da docenti italiani e canadesi.
- Valutazione dell'efficacia didattica utile ad apprezzare la relazione esistente tra gli obiettivi educativi dei singoli moduli didattici e il grado di soddisfazione espresso sul modulo formativo.

Trasferibilità dei risultati

Identificando e certificando le conoscenze, le competenze e le abilità fondamentali per l'implementazione di formazione accreditante in salute pubblica, attraverso l'identificazione, la raccolta, la validazione e lo stoccaggio di materiale appropriato e rilevante, si intende contribuire alla formulazione di percorsi e metodologie formative efficaci soprattutto in ambiti relativamente poco consolidati, come l'educazione sanitaria, la comunicazione in ambito sanitario pubblico, il marketing sociale in sanità e la promozione della salute attraverso campagne informative.

Si faciliterà la formazione di un'attitudine creativa e di una cultura di innovazione nell'ambito dei professionisti della sanità pubblica, grazie all'utilizzo di nuovi processi, metodologie e tecnologie di apprendimento.

Gestione integrata del rischio socio-sanitario in una prospettiva di continuità assistenziale: tecnologie e percorsi coordinati ospedale territorio, "inerzia clinica", esame degli esiti socio-sanitari

Il Progetto intende realizzare strumenti di analisi e gestione del rischio clinico e socio-assistenziale che il cittadino affronta in una prospettiva di continuità assistenziale. Le basi di dati sanitarie e comunali saranno integrate con la finalità di valutare gli esiti degli incontri clinici a completamento delle tradizionali procedure di gestione del rischio in sede intraospedaliera.

La realizzazione delle attività del progetto ha previsto la stipula di accordi di collaborazione con tre Aziende sanitarie in tre Regioni pilota, ovvero, ASL 1 Taranto, AUSL 12 veneziana, ASUR Marche.

La metodologia proposta per il conseguimento degli obiettivi del progetto include:

- l'analisi delle banche dati disponibili presso le Aziende Sanitarie per la valutazione della morbosità e della mortalità relative ad alcune patologie neoplastiche e cardiovascolari;
- l'analisi delle banche dati disponibili presso gli enti locali per ottenere le informazioni anagrafiche relative agli assistiti e agli MMG che li hanno in carico;
- l'analisi retrospettiva del percorso socio-assistenziale e l'individuazione degli eventi "sfavorevoli" intercorsi nella gestione delle patologie selezionate, anche attraverso la somministrazione di un questionario ai pazienti o, in caso di decesso, ai loro familiari;
- l'inserimento dei dati socio-sanitari e anagrafici raccolti nelle fasi precedenti in un software di analisi integrata che consentirà anche di costruire mappe tematiche georeferenziate di vulnerabilità e di rischio per le patologie selezionate.

Risultati attesi nel triennio

I principali risultati attesi sono:

- analisi banche dati sanitarie e comunali effettuate;
- ricostruzione dell'albero decisionale clinico e organizzativo che ha portato all'evento sfavorevole effettuata;
- integrazione banche dati socio-sanitarie e anagrafiche effettuate;
- mappe tematiche georeferenziate di vulnerabilità e di rischio prodotte per le patologie selezionate.

Trasferibilità dei risultati

La sperimentazione identificherà inizialmente i requisiti di base e le procedure per potere applicare il sistema di interscambio dati nelle realtà territoriali più diversificate. Il potenziale utilizzo dei sistemi di interscambio dati dipende da un lato dalla capacità del sistema stesso di adeguarsi alla struttura informatica esistente senza dovere ricorrere all'acquisto di nuovi software specialistici e quindi senza dover ricorrere ad investimenti troppo onerosi per gli enti locali, e dall'altro dalla capacità che la struttura organizzativa dell'ente dimostrerà per adeguarsi all'utilizzo del sistema stesso.

Health Governance Unit, Alessandria d'Egitto

Il progetto si pone l'obiettivo di rinnovare la *mission* del *Medical Research Institute* di Alessandria e di rafforzarne le competenze, perché possa costituire al proprio interno una struttura che si occupa di salute pubblica e di monitoraggio e attuazione delle politiche sanitarie, in grado di supportare il Ministero della Salute e della Popolazione egiziano e il Governatorato di Alessandria nell'implementazione della seconda fase della Riforma sanitaria in atto nel Paese.

Alla luce dei recenti cambiamenti introdotti nel sistema sanitario egiziano, con la sperimentazione di meccanismi di assicurazioni e partecipazioni alla spesa pubblica a livello familiare, la separazione tra i *provider* che forniscono direttamente i servizi sanitari e le istituzioni deputate al finanziamento e al controllo, e la spinta verso il miglioramento dell'efficienza gestionale, la creazione di una *Health Governance Unit* all'interno del *Medical Research Institute* permetterà di produrre evidenze e capitalizzare i risultati dell'applicazione della riforma sanitaria a partire dal Governatorato di Alessandria per poi estenderlo a tutto il sistema sanitario egiziano. Questa struttura, infatti, raccoglierà *best practice*, analizzerà dati e fornirà informazioni e raccomandazioni ai decisori riguardo a:

- valutazione del bisogno di salute delle popolazioni;

- impatto di tipo sociale e finanziario della riforma sanitaria, in termini di garanzia dell'equità e dell'accesso all'assistenza per i gruppi più svantaggiati;
- valutazione dei servizi sanitari, nell'ottica di favorire l'integrazione tra livello primario, secondario e terziario;
- programmazione e gestione dei servizi sanitari a livello di Governatorato;
- promozione della qualità dei servizi sanitari e dei meccanismi di accreditamento.

Il progetto prevede quindi inizialmente un'intensa attività di formazione e *capacity building* in management sanitario e ricerca applicata rivolta al personale del *Medical Research Institute*, che porti alla formazione di un gruppo di esperti che andranno a formare e gestire direttamente la *Governance Unit*. Nella seconda fase del progetto sarà la stessa *Governance Unit* a fornire attivamente supporto agli organi centrali e regionali deputati alla programmazione dell'offerta sanitaria all'interno del quadro di riferimento normativo e amministrativo della riforma sanitaria, anche presentando iniziative progettuali in gare internazionali allo scopo di rafforzare la ricerca di fondi che favoriscano l'implementazione della riforma sanitaria. Il progetto favorirà anche il rafforzamento della presenza della *Governance Unit* sul territorio e della sua capacità di *networking* con realtà istituzionali di livello internazionale, nazionale e locale.

Risultati attesi nel triennio

Il progetto prevede di creare un centro di eccellenza capace di fornire servizi di consulenza, formazione e ricerca all'interno del sistema sanitario per supportare le attività necessarie al completamento della riforma in Egitto. Nello specifico la *Governance Unit* sarà in grado di:

- fornire linee di indirizzo tecnico-scientifiche per l'utilizzo di risorse umane, professionali e tecnologiche funzionali al processo di riforma sanitaria;
- promuovere studi e ricerche nell'ambito della gestione dei servizi sanitari, con particolare attenzione allo sviluppo del sistema informativo sanitario;
- offrire attività formative rivolte al personale dei servizi sanitari, allo scopo di migliorare la capacità di attuare efficacemente la riforma sanitaria;
- partecipare a programmi di finanziamento e cooperazione bilaterali e internazionali;
- stabilire relazioni formali di collaborazione con gli attori centrali nell'ambito dell'applicazione della riforma sanitaria, quale per esempio l'Ufficio Regionale della WHO (EMRO);
- mantenere un livello adeguato di visibilità e riconoscimento tecnico-scientifico attraverso attività di informazione, comunicazione e divulgazione dei risultati raggiunti.

Trasferibilità dei risultati

La *Health Governance Unit* svolgerà progressivamente un ruolo di riferimento per il miglioramento dell'implementazione della riforma sanitaria e in generale della gestione del sistema sanitario in tutta l'area medio-orientale.

L'esperienza di costituzione di un'agenzia di sanità pubblica in un Paese in transizione è completamente trasferibile a realtà territoriali colpite dalle stesse problematiche sanitarie e organizzative.

Il Governo Clinico Digitale

Il progetto "Il Governo Clinico Digitale", finanziato dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, è stato avviato a gennaio 2009 e avrà la durata di due anni. Gli ambiti di innovazione a cui il progetto si rivolge sono il supporto all'introduzione del governo clinico nelle aziende sanitarie italiane attraverso la realizzazione di sistemi digitalizzati che realizzino la metafora dell'ospedale virtuale o del distretto sanitario virtuale, connessi tra di loro e al proprio interno con i servizi di propria articolazione gerarchica. In tal modo saranno possibili il

monitoraggio e il controllo (di qualità oltre che formale) delle procedure e del flusso-pazienti all'interno del servizio, fin dal momento in cui il paziente attiva il contatto con il servizio stesso.

Risultati attesi nel triennio

I principali risultati attesi sono:

- la piena realizzazione delle strategie di governo clinico nelle strutture sanitarie italiane attraverso l'utilizzazione di azioni di *e-governance* digitale coerenti con il Piano d'Azione per l'*e-government* del Governo italiano (2002);
- l'adesione del cittadino alle azioni di prevenzione e promozione della salute proposte dall'SSN attraverso la valorizzazione delle opportunità digitali che garantiscano un'ampia e diffusa alfabetizzazione e cultura sanitaria, mirando alla formazione del "cittadino competente";
- la creazione di nano e micro-strumentazione per la trasmissione di dati digitali di interesse clinico dal cittadino al servizio assistenziale competente e viceversa;
- la realizzazione di procedure e strumenti atti a garantire la realizzazione di *trial* clinici multicentrici digitalizzati con la creazione di pazienti virtuali e con la connessione di centri di eccellenza certificati per la conduzione di *trial*.

Trasferibilità dei risultati

La realizzazione di sistemi digitalizzati consentirà di migliorare il flusso e l'organizzazione delle informazioni utili per supportare il "governo clinico", le reti nazionali e la sinergia fra i diversi attori coinvolti nei servizi. La digitalizzazione dei dati permette notevoli risparmi nell'ambito della produzione documentale, dei processi di archiviazione, delle attività di interrogazione e dei costi di logistica. Infine, i maggiori benefici possono derivare dalle potenzialità dell'ICT in termini di supporto ai processi di integrazione, tramite l'implementazione di standard di comunicazione aperti e compatibili, che assicurino un'elevata interoperabilità tra i diversi sistemi.

La gestione del rischio clinico nelle Aziende Sanitarie della Regione Lazio come strumento di miglioramento della qualità assistenziale

Il progetto è finalizzato all'introduzione di un sistema per la riduzione e la gestione del rischio clinico nel contesto generale delle strategie di miglioramento continuo della sicurezza e qualità assistenziale e di sostenibilità economica delle strutture sanitarie nella Regione Lazio, attraverso l'individuazione, il monitoraggio e il controllo delle aree a rischio e la sperimentazione di soluzioni operative di natura professionale (tecnica e organizzativa), tecnologica ed economica. Il conseguimento di questo obiettivo ha previsto l'articolazione del progetto in tre fasi:

- qualificazione e risparmio della spesa assicurativa
- valutazione del rischio percepito e fabbisogno formativo da parte degli operatori
- valutazione del livello oggettivo di rischio attraverso il calcolo degli indicatori AHRQ in collaborazione con il progetto "Rating ASL" condotto da LAIT e predisposizione di un piano formativo sulle tematiche del rischio clinico per gli operatori sanitari.

Per il completamento delle attività previste dalla terza fase del progetto è stata autorizzata da parte della Regione Lazio un'estensione non onerosa fino a maggio 2009.

Risultati attesi nel triennio

I principali risultati attesi sono:

- Diminuzione dei costi assicurativi e diffusione di forme di gestione del rischio
- Migliore distribuzione degli oneri di gestione del rischio per le aziende e maggiori garanzie assicurative per gli operatori sanitari

- Piano formativo sui problemi assicurativi progettato
- Aree di rischio clinico percepito dagli operatori sanitari identificate e mappate
- Creazione dell’inventario delle iniziative di *risk management* nelle Aziende Sanitarie della Regione Lazio
- Debito formativo in tema di rischio clinico identificato
- Aree di rischio clinico oggettivo identificate e sorvegliate dal sistema di indicatori AHRQ prodotto da LAIT
- Sistema di *incident reporting* standardizzato e informatizzato attraverso la piattaforma informatica prodotta da LAIT
- Predisposizione di un piano generale di formazione specifica sulle tematiche del *risk management*.

Trasferibilità dei risultati

A seguito del lavoro di ricerca che si propone, la Regione Lazio potrà:

- realizzare un progetto regionale di miglioramento della qualità aziendale, finalizzato alla sicurezza del paziente, estendendo l’indagine alla valutazione dei rischi che non accedono al contenzioso al momento attuale, ma che lo potrebbero in futuro e che attengono agli ambiti di appropriatezza dei percorsi diagnostico-terapeutici;
- gestire gli aspetti assicurativi della struttura e dei professionisti a livello regionale in modo informato ed efficiente, negoziando il premio assicurativo sulla base della valutazione effettiva del rischio e delle procedure e iniziative di gestione messe in atto;
- valutare l’opportunità di offrire al professionista sanitario e al paziente una micropolizza assicurativa aggiuntiva contro il rischio residuale, ovvero, inevitabile, da ricondurre all’interno delle procedure di consenso informato obbligatoriamente rese al paziente.

La salute nelle isole minori

Il progetto “La salute nelle Isole Minori” sarà finanziato dal Ministero della Salute e avrà la durata di due anni. Allo stato attuale i dati sociosanitari dei cittadini residenti sulle isole minori sono frammentati in diversi database disomogenei, non collegati in rete o strutturati in modo tale da consentire l’interscambio dei dati stessi. Inoltre, i Medici di Medicina Generale (MMG) delle isole si trovano in una condizione di isolamento rispetto alle strutture di secondo e terzo livello e, più in generale, rispetto alla possibilità di attivare le normali procedure di riferimento alla valutazione specialistica, supportata da diagnostica strumentale e, talora, mini-invasiva evoluta (spesso non disponibile sul territorio isolano).

Obiettivi generali (OG) e obiettivi specifici (OS):

- OG1: Sostenere il processo di riallocazione delle risorse per rispondere efficacemente ai bisogni di salute della popolazione residente nelle isole minori.
 - OS1: Condurre una valutazione epidemiologica dello stato di salute della popolazione delle piccole isole, con particolare riferimento alle aree tematiche prioritarie definite dal Piano Sanitario Nazionale, dal Piano Nazionale della Prevenzione nonché dalle priorità identificate dal Ministero della Salute per la ricerca finalizzata (malattie del sistema nervoso, cardiovascolari e oncematologiche).
 - OS2: Effettuare la mappatura dei bisogni di salute e dell’offerta dei servizi sanitari e sociosanitari identificati attraverso l’integrazione dei database anagrafici e sociosanitari, costruendo scenari basati sull’andamento storico dei dati di popolazione che verranno intercettati e analizzati, con il fine di supportare la decisione programmatica attraverso l’analisi delle opzioni disponibili e fattibili anche sul piano economico-finanziario.

- OS3: Elaborare un piano di offerta di servizi sanitari e socio-sanitari coerente con i bisogni identificati e mappati.
- OG2: Ridurre l'isolamento degli MMG operanti sulle isole minori rispetto alle strutture di II e III livello presenti sulla terraferma attraverso l'utilizzo della telemedicina.
 - OS1: Effettuare una revisione dell'offerta dei dispositivi e delle soluzioni telematiche applicabili ad attività cliniche, preventive e promotive della salute.
 - OS2: Sperimentare un sistema che consenta il collegamento tra gli MMG delle isole minori e le strutture di II e III livello presenti sulla terraferma.
 - OS3: Formulare una serie di raccomandazioni per la creazione di un sistema integrato e condiviso di telemedicina per le isole minori.
- OG3: Formare il personale sanitario operante sulle isole minori per migliorare la gestione dei pazienti in assistenza domiciliare.
 - OS1: Condurre un'analisi del fabbisogno formativo del personale sanitario operante sulle isole minori.
 - OS2: Disegnare percorsi formativi a distanza sulla base dei bisogni identificati.
 - OS3: Erogare corsi di formazione a distanza su piattaforma *open source* dell'ISS rivolti al personale sanitario operante sulle isole minori.
- OG4: Creare un network a livello nazionale ed europeo tra le isole minori italiane e con le altre isole del Mediterraneo.
 - OS1: Organizzare un Convegno nazionale sulla salute nelle isole minori per consentire lo scambio di esperienze e la presentazione del progetto.
 - OS2: Organizzare un Convegno conclusivo di livello europeo per la creazione di un network delle isole dell'area mediterranea che possa portare all'elaborazione di un progetto europeo di sostegno e sviluppo integrato della sanità nelle piccole isole.

Risultati attesi nel triennio

- Stato di salute della popolazione residente nelle piccole isole valutato
- Identificazione e mappatura dei bisogni di salute e dell'offerta dei servizi sanitari e socio-sanitari delle isole minori effettuata; scenari costruiti
- Piano dell'offerta dei servizi elaborato
- Revisione dell'offerta effettuata, analisi dei costi e dei benefici potenziali e definizione di fattibilità completate
- Sistema per la trasmissione di informazioni tra MMG delle isole minori e strutture sulla terraferma collaudato
- Raccomandazioni per la creazione di un sistema di telemedicina appropriato formulate
- Rapporto sui fabbisogni formativi del personale sanitario elaborato
- Piano formativo elaborato
- Formazione in modalità FAD su piattaforma *open source*/ISS del personale sanitario operante sulle isole minori erogata
- Convegno nazionale realizzato
- Convegno europeo realizzato

Trasferibilità dei risultati

Il progetto consentirà l'identificazione degli effettivi bisogni socio-sanitari della popolazione residente nelle isole minori italiane e la programmazione di interventi appropriati dal punto di vista organizzativo, finanziario, tecnologico e clinico.

L'utilizzo della telemedicina favorirà opportunità di formazione e di scambio professionale tra gli MMG operanti sulle isole minori e gli specialisti delle strutture di II e III livello presenti sulla terraferma.

Laboratorio Congiunto nel campo della ricerca scientifica e tecnologica e per la formazione professionale in salute pubblica tra ISS e *Harvard University*, finalizzato alla creazione di una struttura di supporto alle attività di prevenzione e contenimento dell'impatto sulla salute mentale derivante da disastri naturali o causati dall'uomo ed in situazioni di emergenza complessa

La proposta è nata sulla base della collaborazione esistente tra ISS e Università di Harvard e si configura come un laboratorio di 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. L'ISS e l'Università di Harvard attraverso il *Program on Refugee Trauma*, 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.

La ricerca delle evidenze e l'approccio tecnico corretto alla preparazione e alla gestione del disastro, alla mitigazione del suo impatto, alla riabilitazione immediata e successiva alla normalizzazione dello scenario di riferimento, sembrano ancora rimanere elementi di discussione accademica, piuttosto che strumenti operativi.

Esistono, peraltro, esperienze settoriali, tecnologie e sistemi di programmazione e gestione che possono essere utilmente impiegati in questo settore, come dimostrato sia dall'ISS che dall'Università di Harvard, la quale ha attivato un settore altamente specializzato soprattutto nella gestione delle relazioni sociali e psicologiche.

Risultati attesi nel triennio

Una verifica documentale globale sarà effettuata nella prima fase dei lavori e presentata attraverso attività di informazione scientifica, residenziale e a distanza, con particolare attenzione ai Paesi colpiti da eventi calamitosi o soggetti a violenza e attacchi organizzati.

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.

Trasferibilità dei risultati

Gli strumenti proposti in questo progetto sono quelli dell'informazione e della formazione, basati sulla verifica sistematica dell'efficacia, ottenuta con prove meta-analitiche analoghe a quelle impiegate per la validazione di protocolli clinico-diagnostici, oltre all'esperienza di campo maturata dalle due istituzioni e alla sperimentazione di linee guida interventistiche che verranno verificate presso Paesi terzi collaboranti all'interno del Progetto "*1 Billion*" citato, co-finanziato dal *Fulbright Program* statunitense e dal Ministero degli Affari Esteri italiano.

Master Governo Clinico per la Medicina interna

Il master si propone di porre gli operatori delle organizzazioni sanitarie di fronte alla necessità di sviluppare capacità di governo dei processi di assistenza, allo scopo di raggiungere congiuntamente obiettivi di appropriatezza ed efficienza. A questo proposito la *clinical governance* propone un insieme di logiche, metodologie e strumenti attraverso cui i servizi

sanitari si rendono responsabili del miglioramento continuo della qualità dell'assistenza e mantengono elevati livelli di prestazioni. Tutto ciò, in un contesto organizzativo che promuova e stimoli l'eccellenza clinica, nel limite delle risorse disponibili. Il Master universitario di secondo livello in governo clinico per la Medicina interna è rivolto ai medici internisti per sviluppare competenze specifiche in ambito manageriale. Gli obiettivi che si propone sono quelli di far acquisire ai partecipanti il *know how* e le capacità distintive necessarie per una crescita professionale rispondente alle esigenze aziendali delle équipes multidisciplinari che governano la complessità ospedaliera del nuovo millennio e far acquisire competenze specifiche nell'area gestionale organizzativa che si focalizza sull'interazione tra persone e contesto di lavoro. Il master biennale, 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 modulo è coordinato dalla LIUC. Un secondo modulo erogato a distanza in modalità FAD (formazione a distanza). Tale modalità sarà svolta attraverso il metodo PBL (*Problem Based Learning*), processo attraverso il quale il discente apprenderà servendosi di un problema come stimolo, come definire i propri obiettivi di apprendimento e grazie a questi ricercare le informazioni di cui ha bisogno per risolvere il problema stesso. Il modulo è coordinato dall'Istituto. I partecipanti concluderanno l'attività formativa con il terzo modulo, coordinato dalla FADOI, riguardante la stesura di un *project work*, che verterà su una tematica manageriale. L'elaborato verrà poi valutato durante la dissertazione finale.

Risultati attesi nel triennio

- 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 Piano Sanitario Nazionale.
- 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.

Master Universitario di primo e secondo livello internazionale in Gestione dei servizi sanitari – Accredimento del titolo Master con Università LUM Jean Monnet – in collaborazione con Università Sapienza e Mc Gill University

Nel corso del 2007 è stata operata la riprogettazione del curriculum del Master in *Health Service Management* organizzato dall'ISS fin dal 1986, quando, su raccomandazione della

WHO, l'allora Dipartimento per la Cooperazione allo Sviluppo indicò come priorità la creazione in Italia di un polo tecnico-scientifico di livello internazionale ad orientamento sanitario pubblico, che, coerentemente con il notevole e sempre crescente impegno finanziario, umano e tecnico della cooperazione italiana in questo ambito, potesse attuare e condurre attività di ricerca e formazione avanzate.

La revisione operata si inquadra nella strategia di accreditamento e certificazione a livello universitario del Master che ha portato alla collaborazione con istituzioni universitarie nazionali (Università Jean Monnet di Bari, Università Sapienza di Roma) e internazionali (McGill University, Montreal Canada) che consentirà il rilascio di un titolo di Master di I e II livello universitario.

Il rinnovato piano studi porterà all'erogazione di crediti universitari ripartiti su moduli didattici. Saranno previsti moduli *core* e moduli opzionali in base alle diverse esigenze dei fruitori nell'ambito di un curriculum in cui saranno contemplati elementi chiave metodologici di Management Sanitario e di Promozione della Salute.

La proposta formativa dell'anno 2008 proposta con LIUC e con Sapienza rispettivamente, in collaborazione con McGill University che prevedeva una erogazione mista e il pagamento completo della retta di partecipazione ad opera dei discenti ha visto un notevole interesse da parte del pubblico ma non ha raggiunto il numero di partecipanti minimi per l'attivazione dei corsi master per l'anno accademico 2008-09.

L'iniziativa prevista per l'anno accademico 2009-10, prevederà quindi un maggiore sviluppo della componente FAD con un solo momento residenziali al termine del corso per la valutazione certificativa.

Saranno peraltro previste e stimolate sponsorizzazioni da parte di Fondazioni e di ONLUS per borse di studio a favore di studenti particolarmente meritevoli in base a criteri chiari e predefiniti.

Il Master si articola sulle seguenti componenti fondamentali:

- Una fase preliminare di orientamento e formazione a distanza durante la quale il corpo docente interagirà con i partecipanti nel loro Paese d'origine. Questa fase sarà gestita prevalentemente attraverso mezzi elettronici (internet e videoconferenze) e audiovisivi, sia multimediali che tradizionali, prodotti, selezionati e utilizzati in base alla presenza di supporti tecnologici presso i Paesi di provenienza dei partecipanti e in base alla capacità di utilizzazione ed all'accesso a tali mezzi che i partecipanti dimostreranno di avere;
- Una fase di formazione a distanza, asincrona, sviluppata preferenzialmente in lingua inglese che si avvarrà rispettivamente di centri di produzione dei materiali presso strutture universitarie nazionali e internazionali. Si avvarrà della LUM di Bari, per la certificazione del titolo del Master e avrà come sede di erogazione dei corsi Roma, presso la sede designata dall'Istituto. Lo scopo sarà quello di permettere un'azione congiunta, efficace per valori e per costi, tra le strutture collaboranti. Sarà anche considerato il coinvolgimento di sedi UTL presenti presso le sedi di Ambasciata dei Paesi dei partecipanti, per le fasi di valutazione in itinere e terminale attraverso momenti residenziali certificativi.
- Una fase di ricerca applicata (*Field Project*), che costituisce parte integrante del percorso formativo del Master, si svolgerà presso strutture accreditate dal Sistema sanitario nazionale e sedi di progetti internazionali gestiti dai partner accademici citati o dal Ministero degli Esteri. Tale fase si concluderà con l'elaborazione di una tesi finale su problematiche e soluzioni gestionali rilevanti rispetto ai servizi sanitari del Paese di origine del borsista.

Risultati attesi nel triennio

- Formazione di almeno trenta dirigenti apicali di servizi sanitari per anno.

- Miglioramento delle competenze dei Paesi beneficiari nell'ambito della gestione dei servizi sanitari e, indirettamente, per la formazione di quadri sanitari manageriali e per il miglioramento della qualità dei servizi erogati ai cittadini, aumento dell'accessibilità e diminuzione delle disuguaglianze nell'erogazione delle prestazioni sanitarie.
- Rinnovamento metodologico della formazione in campo sanitario, grazie alla funzione di collaborazione tecnico-scientifica dell'entità proponente con le istituzioni e le scuole dei Paesi di provenienza dei partecipanti. 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 il sistema sanitario di provenienza.
- Scambio attivo di esperienze e competenze in un ambito formativo multiprofessionale, multidisciplinare, con varia provenienza geografica e amministrativa e creazione di rapporti privilegiati di comunicazione e collaborazione tra dirigenti apicali di vari Paesi con cui l'Italia intrattiene relazione di cooperazione spesso assai intense.

Trasferibilità dei risultati

Il Master consentirà la trasmissione di competenze nella progettazione e realizzazione di attività formative analoghe a quelle disponibili presso le strutture italiane e internazionali che partecipano alla realizzazione del progetto, a favore delle istituzioni da cui i partecipanti provengono o che hanno, comunque, competenza accademico-formativa in sanità pubblica a livello nazionale nei Paesi stessi.

Potenziamento della Facoltà di Medicina “Dogliotti Medical College” di Monrovia, Liberia

Il *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. Oltre ai danni materiali subiti in tale periodo, l'effetto ancora più grave e sicuramente di più lunga durata è stata la progressiva perdita di personale qualificato. Negli anni della guerra si è assistito ad una progressiva migrazione, mentre allo stesso tempo non è stato possibile assicurare la continuità e la qualità della formazione universitaria.

Numerose e gravi problematiche ostacolano al momento lo svolgimento di corsi universitari di livello adeguato ad una moderna formazione medica e che attualmente risultano al di sotto degli standard qualitativi regionali e internazionali.

La revisione dei curricula formativi è considerata una delle priorità da parte del Ministro della Salute.

Tale revisione dovrà da un lato permettere il riconoscimento internazionale del corso universitario e dall'altro tenere in considerazione le necessità e le specificità della situazione sanitaria liberiana, specialmente per quanto riguarda le gravi problematiche di salute pubblica e di grave carenza di personale medico specializzato e di figure professionali aggiornate.

L'introduzione dei nuovi curricula rappresenta inoltre una priorità dal punto di vista della tempistica di implementazione del progetto. Infatti, sulla base delle eventuali modifiche curriculari introdotte sarà poi necessario l'adeguamento a cascata dei moduli formativi, della bibliografia, dei materiali didattici e di tutte le attività relative ai corsi di insegnamento.

Un altro importante problema da risolvere riguarda le gravi carenze relative al personale docente. Tali carenze riguardano il numero di docenti, le loro qualifiche, il livello di aggiornamento e la disponibilità a svolgere funzioni di insegnamento. Molti professori, alcuni

dei quali formatisi presso il *Medical College* prima dell'inizio della guerra e che hanno continuato la loro attività sia di insegnamento che di pratica clinica durante la guerra, hanno usufruito di limitate possibilità di accesso a nuove tecnologie ed hanno avuto limitate possibilità di aggiornamenti e sviluppo professionale e accademico.

Il livello della tecnologia disponibile nel Paese, anche a livello del principale ospedale universitario, il *JFK Memorial Hospital*, non ha avuto un aggiornamento al passo con le nuove tecnologie. I pochi equipaggiamenti disponibili risultano datati e insufficienti per una moderna diagnostica, limitando quindi sia le possibilità di aggiornamento professionale dei docenti che di insegnamento. La maggior parte dei docenti, inoltre, ricopre vari incarichi sia nel settore pubblico che privato per cui il tempo che possono effettivamente dedicare all'insegnamento e all'aggiornamento è molto limitato. Alcuni sono ormai vicini e oltre l'età della pensione.

In tale contesto 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.

La prima componente, affidata all'Istituto, 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.

Risultati attesi nel triennio

- Analisi della situazione condotta
- Bisogni formativi identificati
- *Task analysis* condotta
- Curricula delle facoltà di medicina dei paesi limitrofi di lingua anglofona valutati
- Analisi quali/quantitativa delle aspettative degli studenti iscritti al primo, terzo e ultimo anno di formazione effettuata
- *Stakeholder analysis* compiuta
- Manuale di accreditamento dei percorsi formativi prodotto
- Curricula aggiornati e utilizzati per i nuovi corsi
- Nuovi materiali didattici utilizzati secondo i nuovi curricula
- Moduli di formazione prodotti
- Reclutati *visiting professor*
- Eseguiti i corsi di formazione per i docenti presso il *Medical College*
- Formatosi i futuri docenti presso università straniere
- Resi operativi i laboratori didattici
- Formato il personale non docente
- Migliorati i trasporti del *Medical College*

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 pre-definizione di obiettivi specifici di apprendimento come richiesto dalla moderna andragogia.

Progetti finalizzati di trasferimento tecnologico, nell'ambito della telematica applicata alla sanità, in aree periferiche e isolate (sia a livello nazionale che internazionale). Adeguamento della diagnostica di controllo, dei trattamenti clinici e della formazione continua in medicina alla tecnologia a distanza

L'URE è impegnato nella realizzazione di tre progetti di Ricerca Finalizzata (RF): uno dal 2005, uno dal 2006 e un altro dal 2008 dove l'URE è Unità Operativa.

- Il primo progetto, dal titolo "Continuità assistenziale. Arcipelago Salute", è finalizzato a collocare i medici di medicina generale (MMG) operanti nei territori isolati al centro di una rete informatica di collegamento con strutture di alta specializzazione e con i pazienti affetti da patologie cardiologiche, pneumologiche e dermatologiche. L'implementazione del progetto ha previsto la dotazione degli MMG di strumenti di diagnostica cardiologica, di dispositivi di raccolta e invio di immagini di competenza dermatologica e di strumenti per il monitoraggio domiciliare di pazienti con insufficienza cardiorespiratoria. La conclusione è prevista per marzo 2009.
- Il secondo progetto, dal titolo "Assistenza e ospedalizzazione a domicilio" finalizzerà alcune delle attività avviate nel precedente progetto, sia dal punto di vista clinico che territoriale. Continueranno le attività di monitoraggio telecardiologico con l'invio di tracciati elettrocardiografici da parte degli MMG a un centro specialistico di secondo livello. Seguendo un protocollo operativo concordato con gli MMG, saranno monitorati a domicilio dei pazienti anziani in condizioni di isolamento tramite dei dispositivi di rilevazione di alcuni parametri vitali. Tramite piattaforma informatica precedentemente selezionata, che ha già permesso l'interconnessione dei dati anagrafici e sociosanitari di una delle isole incluse nella sperimentazione, con successiva rappresentazione su base geografica, si realizzerà la mappatura georeferenziata del territorio di un'altra isola.
- Nel terzo progetto, dal titolo "Strumenti e strategie in riabilitazione: dal progetto terapeutico alla continuità assistenziale", l'URE, come unità operativa, ha il compito di condurre una revisione della letteratura scientifica sull'efficacia e sui costi associati ai programmi di teleriabilitazione e di definire un modello di valutazione dell'impatto economico e organizzativo dei servizi di teleriabilitazione nel Sistema Sanitario Nazionale.

Risultati attesi nel triennio

I principali risultati attesi sono:

- identificazione degli ostacoli di natura organizzativa, semantica e culturale alla disseminazione delle tecnologie informatiche e di comunicazione nelle strutture sanitarie;
- impostazione di protocolli di definizione delle responsabilità medico-legali del cardiologo *on-call* e dell'MMG;
- identificazione di politiche adeguate di rimborso delle prestazioni erogate a distanza;
- determinazione delle procedure per il riconoscimento formale della telemedicina come metodica diagnostica clinica da parte dell'SSN e delle assicurazioni private (soprattutto per quanto concerne gli effettivi costi proponibili in un nomenclatore e la gestione del rischio clinico che si può determinare nella negoziazione del premio assicurativo a carico delle aziende di riferimento);
- produzione dei dati conclusivi sul rapporto costo-efficacia rispetto alle metodiche tradizionali nell'ambito sociale, professionale e geografico del progetto;
- sviluppo di un modello di valutazione dell'efficacia clinica e dell'efficienza gestionale del nuovo modello di assistenza, tramite:
 - analisi della soddisfazione del paziente
 - miglioramento dello stato di salute del paziente

- riduzione delle liste di attesa e dei tempi di attesa
- riduzione numero visite/esami diagnostici di controllo
- riduzione dei costi economici e sociali sopportati dai pazienti e dalle loro famiglie
- riduzione dei costi indiretti sul lavoro (assenze)
- riduzione dei costi per l'SSN
- miglioramento dell'accessibilità.

Trasferibilità dei risultati

Costruzione di nuovi modelli clinici secondo i livelli essenziali di assistenza negli ambiti della:

- prevenzione
- diagnosi
- cura
- riabilitazione

attraverso una nuova progettazione alla luce delle attuali tecnologie informatiche e di telecomunicazione.

Per la diffusione dei risultati, si prevede di pubblicare periodicamente i *report* delle attività progettuali. Attraverso il sito web dell'ISS sarà inoltre resa disponibile la documentazione di progetto e tutti i materiali correlati (proposte formative, manualistica e informazioni tecniche).

Progetto di Laboratorio Congiunto nel campo della formazione professionale in salute pubblica tra ISS e Karolinska Institute, 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

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. La progettazione e la creazione di entrambi i modelli ha previsto sostanzialmente fasi analoghe:

- Studio della letteratura esistente e raccolta delle informazioni.
- Comparazione con soluzioni eccellenti e classificazioni utili a creare un efficace sistema di ricerca (sezioni, sottosezioni, classi, sottoclassi, gruppi e sottogruppi).
- Definizione di protocolli clinico-diagnostici e validazione.
- Costruzione del repertorio di modelli, metodi e strumenti di valutazione degli esiti utilizzati a livello nazionale e internazionale.
- Definizione dei requisiti tecnologici per la condivisione in ambiente web.
- Costituzione del team di sviluppo.
- Design esecutivo.

In linea generale, nel modello EVAs, i dati vengono raccolti e organizzati in base a specifici protocolli socio-sanitari, nonché a parametri di tipo culturale, geo-politico e anche religioso, per la costruzioni di *best practice* da applicare in contesti diversi. L'utilizzatore accede quindi per comparare i vari modelli presentati e implementare una strategia di successo di facile applicabilità. Ogni problema è scomposto in problemi elementari per ognuno dei quali si definisce una procedura di soluzione. La somma delle varie soluzioni supporta la formulazione di ipotesi il più possibile realistiche e attuabili da parte dell'utilizzatore/ricercatore (il sistema riprende in linea generale i fondamenti di base della metodologia della discussione dei casi sorto a Harvard nella metà del secolo scorso).

Il modello ADAMp prevede una procedura computazionale che trasforma l'insieme di dati di ingresso in un prodotto (paziente virtuale) con cui l'utente finale interagisce. Attraverso il tipo di interazione comportamentale adottato (da parte dell'utilizzatore che sperimenta ipotesi di tipo bio-medico o comportamentale tentando di evidenziare la presenza di eventuali patologie e

di intervenire appositamente) l'algoritmo stimola nello stesso l'attivazione di meccanismi di costruzione di attitudini, atteggiamenti e comportamenti variabili e l'applicazione di linguaggi socialmente condivisi e di natura non-pregiudiziale utili a contrastare forme di discriminazione. In pratica stimola quel complesso intreccio di variabili – non solo cliniche, epidemiologiche ed economiche – ma socio-culturali e psico-sociali che naturalmente generano condizioni di non equità.

Entrambi i modelli permettono la modifica delle scelte da compiere attraverso interazioni di tipo incrementale, ovvero che si sviluppano in maniera continuativa, e permettono un graduale miglioramento sia per presa di coscienza etero diretta (con EVAs) che auto-indotta (con ADAMp).

Risultati attesi nel triennio

Sviluppo di due modelli virtuali dotati di un'anatomia realistica e di sufficiente capacità emotiva – attraverso l'utilizzo di immagini computerizzate e algoritmi – tali anche da garantire la presenza di anomalie o alterazioni morfologiche e reattività psico-emotiva per rendere il più realistico possibile l'interazione tra uomo e macchina per gli scopi previsti;

Implementazione dell'utilizzo attraverso un software applicativo di facile utilizzo e diffusione per permettere la sperimentazione di pratiche formative nel campo biomedico e psico-sociale.

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 di linee guida interventistiche che verranno verificate presso Paesi terzi collaboranti e/o beneficiari.

Riattivazione delle attività come WHO Collaborating Centre

La costituzione, nel 1987, dell'*International Centre for Health Management (ICHM)* all'interno dell'ISS grazie all'accordo con il Ministero degli Affari Esteri e la WHO, ha caratterizzato il rafforzamento delle attività istituzionali nell'ambito della cooperazione sanitaria internazionale e della formazione dei quadri dirigenziali nei Paesi in via di sviluppo e successivamente in transizione, grazie anche alla concomitante attivazione del *Master's Course on Health Management at District level for Developing Countries*.

A partire da questa esperienza, nel 1989 l'ICHM è stata designata come *WHO Collaborating Centre for Training and Research in District Health Systems*. Grazie all'esperienza accumulata nell'ambito della formazione per professionisti con metodi didattici attivi, nel 1997 l'ICHM ha modificato la sua denominazione come WHO CC diventando *WHO Collaborating Centre for Problem-Based Learning in Health Professions Education*.

Dopo un periodo di interruzione, viene riattivato lo storico rapporto di collaborazione con la WHO, in particolare con il Dipartimento di *Human Resources for Health* di Ginevra, nell'ambito della formazione e *capacity building* del personale sanitario a livello nazionale e internazionale con applicazione di strumenti e metodi innovativi. Saranno promosse nel futuro triennio attività di scambio e di reciproco coinvolgimento all'interno dei progetti, delle conferenze e delle altre iniziative formative e di assistenza tecnica realizzate dalle due istituzioni.

Risultati attesi nel triennio

La designazione dell'ISS come *WHO Collaborative Centre* nell'ambito dello sviluppo delle risorse umane per la salute sarà formalizzata nell'arco dei prossimi due anni. L'iniziativa prevede che venga rafforzato il ruolo dell'ISS a livello internazionale per la formazione del personale sanitario nell'ambito del management e della *governance* dei sistemi sanitari e che sia promossa la relazione di scambio collaborazione con la WHO.

Trasferibilità dei risultati

L'esperienza come *WHO Collaborating Centre* nell'ambito della formazione delle risorse umane per la salute è applicabile nel contesto nazionale, europeo e internazionale.

Sostegno al Ministero della Sanità del Sudafrica per la realizzazione del programma nazionale di risposta globale all'HIV/AIDS nelle zone di confine tra Sudafrica e Paesi circostanti e in regioni di sviluppo selezionate

Il progetto viene affidato nel suo sviluppo operativo alla responsabilità del CNAIDS, a cui si rimanda per il dettaglio.

Supporto allo sviluppo organizzativo del Centro di riabilitazione di Bengasi, Libia

Obiettivo del progetto è quello di sostenere il Centro di Riabilitazione di Bengasi nello sviluppo della sua capacità operativa gestionale, attraverso un programma di formazione *in loco* (con brevi soggiorni formativi in Italia) al fine di sviluppare sia la programmazione delle attività cliniche sia la gestione di attività d'acquisto, manutenzione, aggiornamento professionale permanente, programmazione dell'attività ortesica e lo sviluppo di una struttura di formazione a distanza e video telemedicina. Il progetto prevede il coinvolgimento di Istituti di ricovero e cura a carattere scientifico di altissima specializzazione, in modo da garantire un adeguato trasferimento di tecnologie e conoscenze.

Per il programma, in scadenza il 30/06/2009, sono previste le seguenti attività:

- Stage formativi di personale medico e paramedico del Centro di Riabilitazione di Bengasi presso l'IRCCS Centro Neurolesi "Bonino Pulejo";
- Formazione a distanza e teleconsulto, con il recupero delle risorse multimediali esistenti e integrazione con moderni sistemi telematici e di videocomunicazione, che permetteranno l'avvio di azioni di formazione e *continuous education* sulle terapie riabilitative, oltre che di teleconsulto medico e telemonitoraggio dei parametri vitali.
- Formazione *in loco* con l'invio di una missione di esperti dell'IRCCS al Centro di Bengasi per completare la formazione del personale medico e paramedico ed effettuare il monitoraggio e valutazione delle attività svolte.
- Erogazione di corsi di formazione a distanza sulla gestione dei servizi socio-sanitari e riabilitativi attraverso la piattaforma web *open source* dell'ISS.
- Conferenza/workshop finale e o altre attività di divulgazione sulle attività e risultati del programma.

Risultati attesi nel triennio

- Pianificazione delle attività formative in essere presso il CR (Centro di Riabilitazione) per i disabili di Bangasi, formazione dei formatori, preparazione dei curricula dei corsi in Management Clinico e Management Gestionale, realizzate;
- Direttori dei vari dipartimenti del CR e delle OO (Officine Ortopediche) adeguatamente formati ed equipaggiati per la raccolta in analisi dei dati e per la gestione dei servizi;
- Servizi per la gestione delle attrezzature e delle strutture, riorganizzati e migliorati nelle loro funzioni di programmazione delle attività e di erogazione di prestazioni;
- Sistema di riferimento fra ospedali, CR e le comunità riorganizzato;
- Decollo di iniziative locali di dimissione protetta dei pazienti stabilizzati.

Trasferibilità dei risultati

Sviluppando le conoscenze, le competenze e le abilità fondamentali per riorganizzazione funzionale del Centro e la valutazione dei protocolli clinici adottati, attraverso attività di training e seminari tecnici in ambito clinico e gestionale per lo staff tecnico del centro sia residenziale che con metodologie di formazione a distanza e telemedicina, si intende:

- contribuire alla formulazione di percorsi e metodologie formative efficaci
- garantire un adeguato trasferimento di tecnologie e conoscenze, ottimizzando anche la proiezione regionale del centro.

TUFH International Conference

“*Towards Unity For Health*” è un’associazione mondiale legata alla WHO che comprende 185 Paesi oltre che gruppi, organizzazioni e istituzioni impegnati nella crescita e nel miglioramento dello stato di salute delle comunità delle quali hanno mandato di servizio. TUFH si occupa di pubblicare una rivista mensile (*Education for Health*), di pubblicare una newsletter mensile (*The network-Newsletter*) e di preparare annualmente una conferenza internazionale con temi inerenti il *capacity building* e la formazione del personale sanitario. L’ISS è membro del gruppo *The Network: TUFH* dal 1990.

In considerazione del mandato istituzionale attinente la formazione continua del personale dell’SSN, delle attività di formazione condotte anche come *WHO Collaborative Centre*, attinenti metodologie formative andragogiche, i molteplici progetti di *capacity building* implementati in svariati Paesi in transizione e non (dalla Cina al Sud Sudan, dalla Palestina al Sudafrica per riportare alcuni esempi) è stata proposta la candidatura per la conferenza del 2011 inerente strumenti e tecnologie per la formazione e per il *capacity building*, in particolare considerando come temi chiave la Formazione a Distanza e i principi dell’apprendimento basato su problemi applicati nella formazione a distanza così come il paziente virtuale e le sue applicazioni nei processi formativi. Ulteriori temi di rilievo della conferenza saranno gli *outcome* e l’impatto della formazione per la salute in particolare legati alle applicazioni delle metodologie innovative e alle procedure di accreditamento della formazione.

Risultati attesi nel triennio

La designazione dell’ISS come sede della conferenza annuale del TUFH per l’anno 2011 con tema specifico attinente lo sviluppo delle risorse umane per la salute attraverso strumenti e tecnologie innovative per la formazione prevede che venga rafforzato il ruolo dell’ISS a livello internazionale per la formazione del personale sanitario nell’ambito del management e della *governance* dei sistemi sanitari e che sia promossa la relazione di scambio e di collaborazione con gli oltre 185 Paesi facenti parte del gruppo *The Network*.

Trasferibilità dei risultati

L’esperienza di gestione di un congresso internazionale nell’ambito della formazione delle risorse umane per la salute è applicabile nel contesto nazionale, europeo e internazionale.

**Presidenza
Unità di Bioetica**

Attività di Ricerca

Consulenze di bioetica, partecipazione a comitati etici e didattica

Nel triennio 2009-2011 proseguirà l'attività di consulenza su temi di etica per i Dipartimenti e i Centri nazionali dell'ISS, sia nell'ambito di progetti di ricerca in vari settori, sia nell'ambito dell'attività istituzionale.

Proseguiranno inoltre le consulenze verso altre istituzioni (Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali; Comitato Nazionale per la Bioetica e Comitato Nazionale per la Biosicurezza, le Biotecnologie e le Scienze per la Vita; ENEA; e altre).

Gli incarichi in comitati di etica di vari enti di ricerca e Istituti di ricovero e cura a carattere scientifico continueranno ad essere occasione per contribuire alla pianificazione di numerosi protocolli di ricerca, sia interventistica, sia osservazionale ed epidemiologica, nonché alla formazione nell'ambito delle attività degli stessi comitati.

Si intende proseguire nel triennio 2009-2011 l'attività didattica nel settore della bioetica già in atto da vari anni. L'attività didattica è realizzata mediante: direzione scientifica di corsi nell'ambito delle attività formative dell'ISS, partecipazione a corsi organizzati da altre strutture dell'ISS, 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 consulenze all'interno e all'esterno dell'Istituto sono occasione per partecipare alla preparazione e all'esecuzione di vari progetti di ricerca.

Le consulenze all'esterno dell'Istituto sono spesso inserite in documenti ufficiali (linee guida, pareri, ecc.).

L'esperienza maturata nella didattica della bioetica attesta le ricadute positive dei corsi. Il corso "Etica della ricerca scientifica: studi clinici, di popolazione, genetici" dell'ISS si è rivelato utile e gradito specialmente da parte dei membri dei comitati di etica, che trovano in esso suggerimenti operativi utili per la loro attività.

Trasferibilità dei risultati

La trasferibilità dei risultati è attestata dall'operatività dei progetti di ricerca per i quali si forniscono consulenze.

Le consulenze verso istituzioni esterne sono spesso parte integrante di documenti ufficiali.

L'attività didattica è, per sua natura, finalizzata al trasferimento di competenze. Il trasferimento dei risultati sarà favorito anche dall'interazione con alcuni degli altri progetti in cui l'Unità di Bioetica è coinvolta e specificamente quelli che hanno, tra le varie finalità, anche una componente didattica (per esempio: la realizzazione di linee guida operative per i comitati etici e per i ricercatori nell'ambito di "Alleanza Contro il Cancro" e dell'"*Italian/Canadian GE3LS collaboration*"). La trasferibilità dei risultati è favorita inoltre dalla preparazione e diffusione, durante i corsi, di dispense e raccolte di documenti in formato cartaceo ed elettronico.

Data and Safety Monitoring Board del progetto "Antipsicotici e demenza di Alzheimer: una sperimentazione clinica multicentrica a lungo termine" (AdCare)

AdCare è uno studio clinico multicentrico di fase IV, randomizzato, a gruppi paralleli con gruppo placebo, in doppio cieco. L'obiettivo principale di AdCare è valutare il profilo di efficacia e sicurezza a lungo termine di tre farmaci antipsicotici atipici (risperidone, olanzapina, quetiapina) e un farmaco antipsicotico tipico (aloperidolo) nel trattamento di psicosi, aggressività e agitazione in pazienti con malattia di Alzheimer non istituzionalizzati. La

sperimentazione pone rilevanti problemi di etica, in particolare per quanto riguarda il coinvolgimento di soggetti incapaci di esprimere il consenso e la valutazione rischi/benefici. È in questo contesto che si colloca l'attività di bioetica qui descritta. Il problema del consenso informato viene affrontato nelle sue varie componenti, e specialmente: principi di etica cui riferirsi (sulla base di quanto stabilito in codici deontologici, dichiarazioni, convenzioni, linee guida e normative); valutazione della capacità dei soggetti di esprimere un valido consenso; rappresentanza legale (con particolare riferimento all'amministrazione di sostegno) per i soggetti incapaci di comprendere pienamente e di esprimere un valido consenso; gestione delle emergenze. La valutazione dei rischi è effettuata nell'ambito di un comitato per il monitoraggio dei dati incaricato di: valutare lo svolgimento del *trial*, dei dati di sicurezza, degli esiti di efficacia e raccomandare al comitato di coordinamento del progetto se continuare, modificare o interrompere il *trial*.

Risultati attesi nel triennio

L'individuazione di criteri di riferimento e di procedure operative per l'esecuzione di sperimentazioni in ambito neurologico con soggetti incapaci di esprimere il consenso non solo è essenziale per il progetto AdCare, ma sta già avendo un notevole impatto sull'attività di altri gruppi di ricerca e di comitati di etica. È infatti evidente, sia dall'analisi della letteratura, sia dall'esperienza di lavoro mediante collaborazioni con centri clinici, come il problema di stimare la capacità di comprendere da parte di soggetti incapaci (in modo più o meno marcato) e di esprimere un consenso consapevole sia molto spesso eluso. Anche il problema di chi sia legittimamente titolato ad esprimere un consenso valido in vece del soggetto incapace è molto spesso trascurato. L'Unità di Bioetica, operante nel *Data and Safety Monitoring Board*, e in costante collaborazione con il comitato di coordinamento del progetto, potrà dare un contributo importante non solo per la conduzione del progetto AdCare, ma anche per tutti i ricercatori che effettuano sperimentazioni con soggetti affetti da varie forme di demenza.

Trasferibilità dei risultati prodotti:

L'attività di bioetica nell'ambito di AdCare è orientata alla pratica. Essa fornisce innanzi tutto una premessa irrinunciabile per l'avvio della sperimentazione, evidenziando i requisiti di etica indispensabili per il reclutamento dei soggetti. Ha inoltre una ricaduta operativa per l'intero svolgimento del progetto, mediante l'attività del *Data and Safety Monitoring Board*. L'esperienza maturata nell'ambito di AdCare ha ricadute su molti gruppi di ricerca in ambito neurologico, che stanno conformando la loro attività ai criteri stabiliti per AdCare. La diffusione è favorita anche da un'attività di divulgazione attiva, che comprende in particolare l'invio di rapporti tecnici a tutti i comitati di etica in Italia e la divulgazione mediante conferenze in numerose città italiane.

Italian/Canadian GE3LS collaboration: Joint Italian-Canadian Partnership on Ethical, Environmental, Economic, Legal and Social Issues Related to Genomics Research

L'Unità Operativa di Bioetica partecipa al progetto, il cui coordinamento è affidato alla *Queen's University* di Kingston (Canada) e al Centro per la Scienza, la Società e la Cittadinanza di Roma. Il progetto coinvolge un network multidisciplinare di centri e istituzioni in varie Nazioni con competenze in vari settori: genetica, etica, diritto, scienze sociali, filosofia, economia. Lo scopo è uno studio, in una prospettiva internazionale, sulle implicazioni etiche, ambientali, economiche, legali e sociali della ricerca scientifica nel settore della genetica finalizzata alla salute umana, in particolare in sei aree: malattie infettive, malattie cardiovascolari, malattie metaboliche, malattie neurologiche, oncologia e reazioni avverse dovute a farmaci. L'Unità Operativa di Bioetica si occupa delle implicazioni di etica per quanto

riguarda sia gli aspetti individuali (consenso informato, tutela dei dati personali, ecc.), sia gli aspetti di sanità pubblica. L'Unità Operativa di Bioetica dedicherà una particolare attenzione ai problemi di etica posti nella gestione di biobanche e nell'utilizzo di campioni biologici nella ricerca internazionale, anche in modo coordinato con analoghe attività nel settore delle biobanche che l'Unità svolge in altri progetti (come, ad esempio, il progetto nell'ambito di "Alleanza Contro il Cancro"). Il valore delle linee-guida per la ricerca in genetica che scaturiranno dal progetto deriva specialmente dalla interazione tra competenze in ambiti disciplinari diversi e dal contesto internazionale in cui si opera.

Risultati attesi nel triennio

Dal progetto si attendono risultati con forte impatto operativo. Sarà redatto un volume con criteri guida di riferimento per la conduzione di ricerche nel settore della genetica. Tramite i due Centri coordinatori saranno offerti servizi di consulenza per coloro che avviano nuovi progetti di ricerca nel medesimo settore. La partecipazione al progetto di istituti nazionali centrali italiani (come il Consiglio Nazionale delle Ricerche) e canadesi (come *Genome Canada*) favorirà una migliore cooperazione scientifica tra i due Paesi.

Trasferibilità dei risultati

Il volume di rassegna che sarà pubblicato costituirà uno strumento di riferimento sia per gli approfondimenti teorici, sia come manuale operativo. La consulenza offerta ad altri ricercatori favorirà lo sviluppo anche di altri progetti di ricerca che potranno avvalersi delle competenze messe a disposizione dalla collaborazione italo/canadese. La collaborazione tra istituzioni nazionali italiane e canadesi favorirà una più stretta cooperazione scientifica tra i due Paesi. Sotto il profilo specificamente dell'etica, la collaborazione tra esperti italiani e canadesi, con la partecipazione anche di esperti di altri Paesi, favorirà l'individuazione di approcci comuni per fronteggiare alcuni problemi di etica ricorrenti in tutti Paesi per quanto riguarda la conduzione di ricerche nel settore della genetica. L'armonizzazione sarà particolarmente utile per gli studi con campioni biologici: nel settore delle biobanche, infatti, difformità nell'approccio a problemi quali, ad esempio, la tutela dei dati personali, spesso ostacolano l'efficacia della collaborazione scientifica internazionale.

Unità Operativa di Bioetica del progetto "EATRIS: The European Advanced Translational Research Infrastructure in Medicine"

EATRIS è un progetto finanziato dalla Commissione Europea finalizzato alla creazione di un'infrastruttura paneuropea per lo sviluppo della ricerca translazionale. EATRIS opera attraverso un network di enti e istituti di ricerca, nei vari Paesi europei, per lo sviluppo della ricerca preclinica. Lo scopo principale è promuovere un efficace trasferimento dei risultati dalla ricerca di base all'applicazione clinica, favorendo così lo sviluppo di farmaci innovativi e di nuove strategie terapeutiche. Uno degli obiettivi del progetto riguarda l'armonizzazione, tra i vari Paesi membri, delle procedure regolatorie e dei criteri di etica per la ricerca preclinica. L'ISS ha una responsabilità specifica per tale obiettivo, nell'ambito del quale opera, per gli aspetti di competenza, l'Unità di Bioetica. Essa è incaricata di effettuare dapprima un'analisi comparativa dei criteri di etica alla base delle normative per la sperimentazione nei singoli Stati. Successivamente l'Unità di Bioetica dovrà formulare proposte utili per l'identificazione di criteri di etica comuni da adottare nella ricerca translazionale in Europa. Una particolare attenzione è dedicata alla tutela dei soggetti che partecipano a ricerche. Uno dei punti più controversi nella ricerca translazionale riguarda infatti i rischi in cui possono incorrere i partecipanti a ricerche quando si sperimentino per la prima volta nuovi agenti, prodotti, sostanze.

Risultati attesi nel triennio

Sebbene i Paesi membri dell'Unione Europea operino facendo riferimento a direttive comuni, è noto che i margini di autonomia consentiti nel recepimento delle direttive e dei regolamenti rendano eterogenee non solo le regole pratiche stabilite nelle normative nazionali, ma anche le priorità nei principi di etica alla base delle normative stesse. Le diversità sono particolarmente evidenti per quanto riguarda aspetti non coperti da direttive o regolamenti comunitari. Si possono così distinguere modelli di etica differenti, a seconda che si privilegi l'interesse individuale, l'utilità collettiva, ecc. L'Unità di Bioetica studierà comparativamente tali modelli e ne tratterà un quadro sinottico, evidenziando convergenze, divergenze ed eventuali contraddizioni. Su tale base l'Unità formulerà alcune proposte volte non all'appiattimento di tali differenti approcci su un unico modello, bensì a favorire una più facile cooperazione tra realtà nazionali diverse. Le proposte saranno formulate in un documento, condiviso dai partner del progetto, e proposto alla Commissione Europea nonché in pubblicazioni soggette a *peer-review*.

Trasferibilità dei risultati prodotti

La "trasferibilità" è lo scopo principale del progetto, che intende infatti promuovere il trasferimento delle conoscenze dalla ricerca di base alla pratica clinica. Il compito affidato all'Unità di Bioetica ha, in questo senso, un rilievo primario. Infatti, è impossibile l'armonizzazione delle normative, e in primo luogo delle procedure regolatorie, se non vi sono a monte l'analisi e la comparazione dei principi di etica alla base dei regolamenti. L'aspetto maggiormente innovativo del compito assegnato all'Unità di Bioetica riguarda il fatto che, mentre sono stati finora studiati in profondità gli aspetti di etica della sperimentazione clinica a partire dalla fase I alla IV, un'attenzione assai minore è stata dedicata agli aspetti di etica della sperimentazione clinica fino al passaggio sull'uomo incluso ("*first in man*"). Tale passaggio pone quesiti di etica molto rilevanti, primo tra tutti l'interrogativo sulla sicurezza e la tutela dei soggetti partecipanti.

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"

Il progetto si propone di integrare le competenze necessarie per lo studio del coma e degli stati vegetativi persistenti (*severe disorders of consciousness*, indicati con l'acronimo DOC), coordinando esperti dei seguenti settori: biologia del comportamento, bioetica, medicina generale, anesthesiologia, psicologia, fisiologia e biostatistica. Il progetto è realizzato dalla collaborazione fra tre Unità Operative, una delle quali è l'Unità di Bioetica. Le finalità principali dell'attività dell'Unità di Bioetica sono l'identificazione e lo studio dei principi di etica per la sperimentazione con pazienti in stato DOC, nonché la proposta di criteri operativi da adottare sia per la valutazione (da parte dei comitati di etica) delle sperimentazioni proposte, sia per la loro esecuzione (da parte dei medici ricercatori).

In tale analisi una particolare attenzione sarà rivolta a documenti prodotti da istituzioni nazionali e internazionali (es.: Comitato Nazionale per la Bioetica; Governi e Parlamenti di vari Paesi; Consiglio d'Europa; Commissione Europea e Parlamento Europeo; Organizzazione Mondiale della Sanità; Associazione Medica Mondiale; Consiglio delle Organizzazioni Internazionali di Scienze Mediche; Nazioni Unite). I principi esposti in codici, dichiarazioni, convenzioni, trattati saranno analizzati in modo comparativo.

Risultati attesi nel triennio

Il contributo dell'Unità di Bioetica sarà orientato verso i risultati: dopo aver identificato i più rilevanti principi di etica ampiamente condivisi, l'Unità di Bioetica proporrà criteri operativi per la loro attuazione nella pratica.

Un rapporto contenente sia la rassegna della letteratura, sia i criteri operativi proposti dall'Unità di Bioetica, sarà fatto circolare tra esperti europei per una consultazione. Saranno consultati anche membri del Comitato nazionale per la bioetica e del Gruppo europeo sull'etica nella scienza e nelle nuove tecnologie istituito dalla Commissione Europea. L'Unità di Bioetica utilizzerà anche contatti già in atto come responsabile della partecipazione italiana nell'*European Public Health Ethics Network* (EuroPHEN) e come coordinatore del Gruppo di Lavoro 4 ("*Ethics issues*") dell'*European Advanced Translational Research Infrastructure in Medicine* (EATRIS).

La versione finale dei documenti prodotti dall'Unità di Bioetica saranno divulgati, anche in coordinamento con le altre due Unità Operative, tramite i tradizionali canali scientifici: pubblicazioni in riviste con peer-review, rapporti tecnici in formato cartaceo ed elettronico, congressi.

Trasferibilità dei risultati

La trasferibilità dei risultati è favorita, tra l'altro, dalle collaborazioni già in atto che collegano l'Unità Operativa di Bioetica, altre istituzioni e altri progetti (per esempio: CNT e Consulta Tecnica Permanente per i Trapianti per quanto riguarda l'accertamento degli stati vegetativi persistenti; Autorità garante per la tutela dei dati personali per quanto riguarda la protezione dei dati sensibili; altri progetti di ricerca, in cui l'Unità è impegnata, che coinvolgono soggetti incapaci di esprimere il consenso, come il progetto AdCare; Istituti di ricovero e cura a carattere scientifico operanti nel settore delle neuroscienze). La trasferibilità dei risultati è favorita dal fatto che mentre è grande l'attenzione, anche da parte delle autorità pubbliche, sugli stati vegetativi persistenti per quanto riguarda l'assistenza e la cura, finora sono stati scarsamente approfonditi gli aspetti di etica da considerare quando si ritenga necessario effettuare sperimentazioni con persone in tali condizioni.

Unità Operativa di Bioetica per "Alleanza Contro il Cancro"

L'Unità Operativa di Bioetica, di cui il proponente è titolare e responsabile scientifico, è stata approvata nell'ambito del Programma 1 di "Alleanza Contro il Cancro" su "Riduzione delle disparità nell'accesso dei pazienti ai mezzi diagnostici e alle terapie", e specificamente del *work package 5*: "Istituzione di un servizio nazionale informativo sul cancro". Il progetto presentato dall'Unità Operativa di Bioetica riguarda i problemi di etica che si incontrano nella sperimentazione clinica in oncologia. Tra i maggiori problemi con rilevanza etica vi sono: l'informazione ai soggetti partecipanti a ricerche, il consenso, la tutela delle categorie vulnerabili (anziani, bambini, persone incapaci a dare il consenso), il cosiddetto "frintendimento terapeutico", l'equità nell'accesso alle sperimentazioni, le implicazioni degli studi di equivalenza e non inferiorità, le eventuali interruzioni precoci degli studi, l'*equipoise* e altri. Problemi analoghi sono presenti anche per altri tipi di patologie, ma in oncologia hanno connotazioni peculiari, che necessitano un approccio specifico. Le peculiarità derivano, per esempio, dall'impossibilità di effettuare studi di fase I su volontari sani. L'Unità produrrà risorse informative (cartacee ed elettroniche), finalizzate ad identificare i vari problemi di etica e ad offrire una panoramica dei possibili approcci per affrontarli. Saranno preparate guide operative per i medici sperimentatori e per i membri di comitati etici. Le risorse informative saranno frutto di una revisione della letteratura (con particolare riferimento a documenti sull'argomento provenienti da istituzioni nazionali, internazionali, sovranazionali: dichiarazioni, linee guida, raccomandazioni, pareri, ecc.)

e prenderanno in particolare considerazione i contesti normativi (notevolmente evoluti negli ultimi anni, sia in Europa, sia in Italia) e culturali in cui ci si colloca.

Risultati attesi nel triennio

I documenti elaborati dall'Unità operativa saranno proposti ad esperti (partner dell'Unità Operativa, soci di Alleanza Contro il Cancro) e ad associazioni di pazienti per una valutazione e revisione. Saranno quindi divulgate versioni frutto di un'ampia consultazione e di un consenso. Saranno poi divulgati capillarmente, in formato cartaceo ed elettronico, alle due categorie destinatarie: sperimentatori e comitati di etica.

L'Unità Operativa di Bioetica collabora inoltre con la Rete Nazionale Biobanche per l'Oncologia di Alleanza Contro il Cancro (afferente al Programma 2 "Integrazione delle attività di ricerca attraverso la costruzione di strutture e reti di collaborazione interistituzionali"). Nell'ambito della Rete si sono constatate sensibili differenze nei moduli di consenso informato per la raccolta, la conservazione e l'utilizzo di campioni biologici in biobanche. Tali differenze rendono difficoltosa, e talvolta impediscono, la standardizzazione delle procedure e gli scambi nell'ambito della Rete nazionale. Per superare tale difficoltà, la Rete nazionale ha chiesto un parere al Gruppo misto tra Comitato nazionale per la bioetica e Comitato nazionale per biosicurezza, le biotecnologie e le scienze della vita (CNB-CNBBSV) della Presidenza del Consiglio dei Ministri. Il Presidente del Gruppo misto ha incaricato l'Unità di Bioetica della Presidenza dell'ISS e il Dipartimento di BCN di preparare un documento sull'argomento. L'Unità di Bioetica dell'ISS ha redatto allo scopo un'ampia rassegna intitolata "Il consenso informato per la raccolta, la conservazione e l'utilizzo di cellule e tessuti in banche biologiche a scopo di ricerca: aspetti di etica".

Trasferibilità dei risultati

Stimolando la consapevolezza su aspetti di etica e di diritto e offrendo possibili percorsi per affrontarli, i documenti prodotti dall'Unità contribuiranno alla realizzazione degli obiettivi del Programma 1 di Alleanza Contro il Cancro. L'attività dell'Unità potrà facilmente integrarsi anche con altri *work-package* del Programma 1, e in particolare: WP4, WP6, WP7.

Il documento per i comitati etici coprirà una lacuna evidente: i membri di comitati di etica hanno infatti a disposizione vari strumenti pratici (linee guida, *check-list*) per la valutazione delle sperimentazioni cliniche in generale (utili anche per i membri con formazione in discipline umanistiche, e quindi con scarsa esperienza professionale su aspetti tecnici), ma spesso hanno difficoltà a valutare proposte di sperimentazioni in campo oncologico per l'assenza di linee-guida specifiche.

Per quanto riguarda il documento sul consenso informato per la gestione di campioni biologici, l'Unità di Bioetica ha partecipato e parteciperà alle riunioni del Gruppo misto CNB-CNBBSV per la discussione del testo. Al termine delle consultazioni il testo preparato dall'Unità di Bioetica confluirà in un rapporto ufficiale del Gruppo misto CNB-CNBBSV della Presidenza del Consiglio dei Ministri.

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma
Roma, marzo 2011*