

decennio. E' quindi in atto, in tutte le nazioni scientificamente avanzate, un processo quanto mai incisivo di promozione scientifica, organizzativa e finanziaria dei programmi di ricerca focalizzati sulla terapia genica.

Nell'ultimo decennio la ricerca biotecnologica ha sviluppato le tecnologie alla base della terapia genica. Sono stati tentati diversi approcci sperimentali per l'introduzione di un gene in cellule somatiche (trasferimenti di DNA nudo o complessato in un sistema "carrier", trasduzione di DNA mediante virus difettivi per la replicazione o cellule somatiche geneticamente modificate), allo scopo di soddisfare i criteri di efficienza, stabilità e sicurezza indispensabili per l'applicazione clinica. Alla luce dei risultati sinora ottenuti soltanto l'utilizzo dei vettori virali (retrovirali o a DNA) sembra rispondere a tali requisiti.

All'inizio degli anni '90 è iniziata la terapia genica a livello clinico, in particolare nella sindrome ereditaria SCID da gene ADA difettivo, mediante trasduzione del gene ADA normale in cellule T linfoidi e/o staminali ematopoietiche. Altre sperimentazioni hanno successivamente riguardato altre patologie ereditarie o acquisite (ad es., la fibrosi cistica) e i trattamenti anti-neoplastici.

Il Programma sulla terapia genica promosso dall'Istituto nel 1995, e divenuto operativo nel 1996, è limitato a taluni aspetti emergenti di particolare interesse, coltivati da gruppi di ricerca intra- ed extramurali di livello scientifico internazionale. Esso si articola in due sottoprogetti: a) Terapia genica delle cellule staminali ematopoietiche e b) Terapia genica nei tumori solidi e nelle malattie cardiovascolari. I sottoprogetti a loro volta si articolano rispettivamente in 4 e 7 linee di ricerca/unità operative.

a) Il sottoprogetto "Terapia genica delle cellule staminali ematopoietiche" ha particolare rilevanza per le sue potenziali applicazioni nel campo preclinico e clinico. Gli obiettivi a medio termine mirano a sviluppare e migliorare le metodologie di trasduzione genica attualmente disponibili, sia per quanto riguarda i vettori utilizzati, sia per quanto riguarda l'espresso-

ne dei geni trasdotti, utilizzando come "target" cellule staminali ematopoietiche umane. Per quanto riguarda queste ultime, è necessario procedere alla loro purificazione/caratterizzazione e successivamente alla loro amplificazione, senza che esse perdano la loro caratteristica staminale di autoreplicazione. La capacità delle cellule staminali di ripopolare a lungo termine il midollo osseo e gli altri siti ematopoietici sarà valutata nel modello del topo SCID.

L'espressione di geni esogeni, trasdotti mediante un efficiente sistema retrovirale, sarà controllata sulla base di diversi parametri: inducibilità, espressione linea o stadio-specifica ed espressione a lungo termine.

Saranno effettuati studi per la terapia genica *in vitro* mediante oligonucleotidi "antisense" per la proteina di fusione bcr/abl, utilizzando cellule staminali ottenute da pazienti con leucemia mieloide cronica (LMC) oppure modelli animali, come il topo SCID ripopolato con cellule staminali provenienti da pazienti con LMC.

Secondo un altro approccio di ricerca, le cellule staminali purificate, caratterizzate ed espanse *in vitro*, saranno indotte a differenziare nelle varie linee ematopoietiche, per studiare l'espressione e il ruolo funzionale dei geni dei fattori di trascrizione "lineage"-specifici nel processo della proliferazione e differenziazione ematopoietica.

Lo studio sarà complementato dall'uso di un modello clinico, rappresentato dalle cellule leucemiche primarie umane, in cui il clone è "congelato" ad un particolare stadio di differenziazione per una o più linee ematopoietiche. Lo studio del "pattern" di espressione di geni di potenziale rilievo funzionale (ad es., recettori di fattori di crescita) potrà migliorare le conoscenze dei meccanismi che sono alla base del blocco del differenziamento e della proliferazione tumorale dei cloni neoplastici. Questi studi favoriranno le nuove strategie che tendono ad esplorare la possibilità di modificare lo stato proliferativo e differenziativo delle cellule leucemiche umane agendo su geni regolatori specifici.

b) Sottoprogetto "Terapia genica nei tumori solidi e nelle malattie cardiovascolari". Anche questo sottoprogetto presenta un'elevata potenzialità scientifico-clinica.

Per l'aspetto oncologico, vengono proposti:

1) Studi per ottimizzare il trasferimento genico mediante vettori retrovirali modificati con l'inserzione di una sequenza IRES. I geni HOX codificano fattori di trascrizione necessari allo sviluppo embrionale e sono implicati nel controllo della proliferazione cellulare e nel differenziamento. L'identificazione di un trascritto bicistonico per i geni HOXD4/HOXD3 ha messo in evidenza una sequenza IRES nella regione intercistonica. Lo scopo dello studio è caratterizzare le sequenze funzionali di questo elemento, analizzando l'attività di sequenze normali o mutagenizzate e comparandole ad elementi analoghi virali, con lo scopo finale di ottenere un'IRES umana da testare per la capacità di produrre proteine multiple nelle cellule "target".

2) Un secondo obiettivo è quello di ottenere cellule antigeniche modificate per terapia genica da utilizzare come vaccino per stimolare la risposta immune dell'ospite. Gli studi iniziali di tipo preclinico porteranno alla trasduzione dei geni della IL-2 e/o B7 in linee cellulari di melanoma, selezionate in modo che la maggioranza degli epitopi antigenici vengano riconosciuti dalle cellule T-citotossiche. Saranno poi testati il fenotipo e l'immunogenicità *in vitro*, per verificare se la contemporanea trascrizione di entrambi i geni fornisce un'attività stimolatoria maggiore a confronto delle cellule trasdotte con uno solo dei due geni. Infine, il progetto si propone di testare *in vivo* le linee cellulari come vaccino in pazienti con melanoma metastatico per valutare l'immunogenicità, la tossicità e la risposta clinica.

3) Un ulteriore studio per ottenere vaccini antitumorali sarà realizzato utilizzando cellule di adenocarcinoma mammario di topo (TSA) ingegnerizzate per liberare IL-2 o IL-4 o IL-10 nel sito tumorale. Questo studio, condotto in collaborazione da tre laboratori, mira a rispondere ad alcuni

quesiti: quale tipo di vaccino sia in grado di indurre una memoria immunologica efficace da proteggere contro le cellule tumorali, quale sia in grado di curare i tumori iniziali o le metastasi spontanee dopo chirurgia tumorale, se altri tumori murini possano essere trattati in questo modo, se sia possibile preimmunizzare i topi con il rischio di indurre invece tumori. Tale ricerca consentirà anche di apportare nuove conoscenze sulle basi cellulari dei meccanismi immunitari anti-tumorali.

4) Sempre nel campo dei tumori solidi, saranno effettuati studi preclinici per testare l'efficacia antitumorale di vaccini, utilizzando cellule tumorali di topo geneticamente modificate con i geni dell'interferone (IFN)  $\alpha$ -2b, da solo o in associazione con il virus della timidinasi del virus *Herpes simplex* (HVS-TK). Gli studi richiederanno la preparazione e caratterizzazione di linee cellulari "packaging" che producono retrovirus ricombinanti contenenti il gene di IFN  $\alpha$ -2b con associazione di TK: la trasduzione delle linee cellulari tumorali di carcinoma ovarico o linfoma B con la formazione di "master cell banks" e "working cell banks" e l'uso delle cellule geneticamente modificate nel modello chimerico rappresentato dal topo SCID ricostituito con linfociti di sangue periferico umano e trapiantato con le cellule tumorali.

Nel settore delle malattie cardiovascolari, sono stati presentati progetti di ricerca pionieristici di terapia genica della ristenosi coronarica e carotidea.

1) Un primo approccio di ricerca vuole accertare la fattibilità di una terapia genica atta a prevenire la ristenosi che si presenta frequentemente con la tecnica della angioplastica coronarica percutanea, il cui meccanismo cellulare è poco conosciuto. Il DNA plasmidico verrà trasferito nelle cellule muscolari lisce dei vasi per studiare l'effetto *in vivo* delle proteine mutanti transdominanti negative, coinvolte nella trasduzione del segnale (ad es., ras), sulla formazione della neointima dopo la lesione vascolare.

Gli esperimenti saranno effettuati *in vivo* nel ratto o nel coniglio.

2) Un secondo approccio alla prevenzione della ristenosi è basato sulla potenziale efficacia di una variante molecolare della apolipoproteina A-1 (ApoA-1), componente delle HDL e responsabile dell'attività antiaterogena. L'obiettivo a breve termine è quello di sviluppare vettori di espressione per la variante Apo A-1 Milano, che conferisce ai portatori un diminuito rischio coronarico, e valutarne il metodo di somministrazione più efficace nel modello animale del coniglio. L'effetto del trattamento sarà testato su sezioni dell'arteria carotidea. I costrutti di espressione, impiegati nella prima parte dello studio, saranno poi usati per sviluppare modelli transgenici per la ApoA-1 Milano.

3) Un ulteriore approccio mira a verificare il possibile uso di iniezioni locali intramuscolari di DNA "nudo" contenente il cDNA della apolipoproteina E4 nella terapia della aterosclerosi sperimentale, dopo eliminazione del gene ApoE che rende gli animali ipercolesterolemici (modello del topo transgenico). L'effetto protettivo sarà valutato dalla diminuzione dei lipidi plasmatici e della riduzione delle lesioni arterosclerotiche. Verrà anche chiarito l'eventuale ruolo degli anticorpi verso la proteina nel determinarne l'effetto.

**Progetto  
Tubercolosi**  
*Responsabile scientifico:  
Antonio Cassone*

Il progetto nazionale "Tubercolosi" è nato con la prospettiva di incoraggiare e se possibile, coordinare la ricerca nel settore in Italia, per renderla idonea ad intercettare il fabbisogno di sanità pubblica per una malattia pericolosamente riemergente. Si tratta di ricerche che complementano gli interventi istituzionali dell'Istituto Superiore di Sanità e ne forniscono solide basi razionali e scientifiche.

Il progetto ha ricevuto 136 proposte, le più numerose nel settore dell'epidemiologia e della patogenesi ed immunità. La

somma globale richiesta è stata di quattro volte la somma disponibile, e pertanto un rigido sistema di "peer review" e di supervisione del Comitato scientifico ha dovuto selezionare solo 55 proposte con un finanziamento medio non elevato ma neanche trascurabile in riferimento a parametri nazionali.

Le linee generali del primo progetto di ricerca sulla tubercolosi sono articolati sugli obiettivi di seguito indicati:

*1) Epidemiologia dell'infezione e della malattia tubercolare.* I dati epidemiologici disponibili sulla diffusione della tubercolosi in Italia, sui gruppi a maggiore rischio e sull'impatto di tale patologia sono molto frammentari e, quindi, insufficienti. Poiché il primo e più importante obiettivo è rappresentato dalla descrizione, a livello nazionale, della diffusione della tubercolosi in Italia, è stato privilegiato il finanziamento di progetti di ricerca multicentrici, in grado di fornire dati affidabili relativi al contesto italiano.

L'attuale sistema, basato esclusivamente sulla notifica obbligatoria dei casi di tubercolosi, presenta numerose carenze in termini di copertura, accuratezza dei dati, tempestività, come evidenziato da alcuni studi su popolazioni limitate. E' compito specifico di alcune unità centrali dell'Istituto Superiore di Sanità eseguire e coordinare gran parte di queste attività di ricerca che sono mirate a valutare i limiti del sistema e sperimentare nuovi flussi informativi, inclusa la fattibilità di un sistema di sorveglianza parallelo basato sulle notifiche da parte del laboratorio, come avviene nella maggior parte dei paesi europei. Nel condurre tale analisi, verrà stimata l'entità della sottonotifica, in modo da quantificare la reale diffusione della tubercolosi nel paese.

L'incidenza di infezione rappresenta un indicatore molto più sensibile e accurato della circolazione del micobatterio nella comunità, rispetto all'incidenza di malattia. Un obiettivo del progetto è, quindi, rappresentato dall'esecu-

zione di indagini sulla frequenza di cutipositività in popolazioni "sentinella".

In Italia non esistono dati a livello nazionale sui gruppi di popolazioni a maggior rischio di TB (immigrati, soggetti HIV<sup>+</sup> ed altri). Sembra quindi prioritario ottenere stime su tale fenomeno e valutare l'opportunità di sistemi di sorveglianza attiva in tali gruppi di popolazione.

Nonostante siano noti i principali fattori di rischio associati all'infezione o malattia tubercolare, vi sono ancora molti quesiti in attesa di risposta. E' quindi importante approfondire i fattori che influenzano la trasmissione di tubercolosi in soggetti ad alto rischio e nella popolazione generale e i fattori associati con la progressione a malattia tubercolare.

2) *Diagnosi dell'infezione tubercolare.* La messa a punto di protocolli diagnostici che consentano sia una rapida identificazione di *M. tuberculosis* dopo l'isolamento microbiologico che il riconoscimento del batterio direttamente dal campione clinico è di fondamentale importanza, dati i lunghi tempi di crescita del micobatterio, non solo per poter iniziare una terapia adeguata nel singolo paziente ma anche per evitare la diffusione dell'infezione nella comunità. Tali metodi hanno, inoltre, solitamente il vantaggio di non necessitare di lunghe manipolazioni del campione come quelle richieste dai metodi tradizionali e sono in grado, pertanto, di garantire un minor livello di rischio per l'operatore.

Negli ultimi anni sono stati messi a punto svariati sistemi commerciali basati su sonde specifiche e sulla PCR. Finora tuttavia l'impatto di queste nuove metodiche sulla diagnostica è stato abbastanza modesto, sia per la bassa sensibilità dei metodi che utilizzano sonde di DNA (di poco superiore ad un esame batterioscopico), sia d'altra parte per l'estrema sensibilità della PCR che rende difficilmente correlabile la positività al test con la diagnosi clinica di malattia. Un ulteriore problema è poi rappresentato dalla grande variabilità di risultati ottenuti con la PCR fra un

laboratorio e l'altro, nonché le false positività. Vi sono quindi ampi spazi di ricerca sia per un miglioramento della specificità e semplificazione di queste tecniche sia per studi multicentrici di valutazione dell'affidabilità dei test commerciali e dei controlli di qualità inerenti a tutte le nuove procedure utilizzate.

Un'altra via da esplorare è quella della risposta anticorpale dell'ospite a componenti batteriche. In passato tale approccio non ha dato i risultati sperati sia per la non specificità degli antigeni scelti, sia per la difficoltà di discriminare i malati dai tubercolino-positivi, in base al livello di risposta sierologica, sia anche per la difficile reperibilità degli antigeni purificati. L'utilità dei test sierologici come possibile completamento della diagnostica microbiologica avanzata è quindi da rivedere alla luce delle acquisizioni di biologia molecolare che rendono possibile la preparazione, in quantità utili, di antigeni purificati, e della messa a punto di reazioni sierologiche di elevata sensibilità e specificità, nonché della produzione e uso di anticorpi monoclonali per rilevare nei materiali biologici antigeni micobatterici.

3) *Patogenesi e immunità.* Nonostante che tubercolosi e micobatteri tubercolari siano conosciuti e studiati da molti anni, molti degli eventi importanti nel rapporto ospite-parassita sono tuttora da chiarire. Non conosciamo ancora, ad esempio, quali siano i meccanismi di adesione e di ingresso del batterio nelle cellule bersaglio, come esso sopravviva ai meccanismi citocidi del macrofago, attraverso quali specifici eventi patologici a livello di tessuti e organi possa provocare la malattia e la morte. Non sono neppure chiare quali siano le differenze, in termini molecolari, che portano ad una diversa patogenicità del BCG rispetto ai micobatteri tubercolari.

Negli ultimi anni si è dato nuovo impulso allo studio di biologia cellulare e molecolare dei componenti batterici, sia ai fini della comprensione della regolazione delle funzioni metaboliche, che nella loro qualità di possibili fatto-

ri di virulenza. Il tentativo di individuare epitopi protettivi, clonandone i relativi geni o sequenze geniche, spinge ad approfondire sempre più lo studio della risposta immunitaria dell'ospite; la caratterizzazione delle risposte T ai diversi componenti antigenici del micobatterio tubercolare (in particolare, ai componenti di stress), i pattern di produzione di citochine e fattori di regolazione della risposta immunitaria antitubercolare, il ruolo della risposta anticorpale nella modulazione della risposta immunitaria sono tutti argomenti da indagare, in particolare in soggetti a rischio quali i soggetti HIV<sup>+</sup>. Lo studio, attraverso adeguati modelli *ex vivo* e *in vivo* del rapporto ospite-parassita, può condurre da un lato all'elaborazione di strategie e strumenti per interventi mirati sia di prevenzione che terapeutici basati sull'uso di vaccini e immunomodulatori, dall'altro alla messa a punto, in sostituzione della tubercolina, di sistemi innovativi in grado di differenziare fra la risposta all'infezione tubercolare e quella al BCG o fra ipersensibilità ritardata e protezione.

4) *Terapia*. L'emergenza negli Stati Uniti di ceppi resistenti ai farmaci antitubercolari ha dato un nuovo impulso alla ricerca e allo sviluppo di nuovi chemioterapici in questo settore o all'uso, da soli o in associazione, di prodotti solitamente adoperati per altri tipi di infezione.

Un particolare interesse dovrà essere dedicato allo studio di enzimi e vie metaboliche di *M. tuberculosis*, e alla loro caratterizzazione genetica, in specie per la biosintesi di costituenti potenziali nuovi bersagli selettivi della chemioterapia.

La ricerca in quest'area dovrebbe primariamente identificare i meccanismi di resistenza dei micobatteri e come rilevarli precocemente e rapidamente, in modo da studiare protocolli terapeutici che consentano di evitarla. Dovrebbe inoltre identificare quali nuove sostanze possano essere utilmente impiegate come seconda scelta nei casi di manifesta resistenza alla terapia standard e stabilire la

durata e le modalità di terapie di mantenimento nei pazienti immunodepressi, in particolare HIV<sup>+</sup>. Grande importanza riveste anche lo studio del potenziale terapeutico di immunomodulatori, *in primis* citochine e antagonisti (anticitochine e recettori) nell'infezione e nella malattia tubercolare, e se sia possibile instaurare protocolli di terapia combinata fra chemioterapici ed immunomodulatori.

Sono inoltre da studiare strategie atte a migliorare la "compliance" dei pazienti ai nuovi protocolli terapeutici come pure alle variazioni o diversi fattori di modifica dei tradizionali trattamenti terapeutici.

5) *Prevenzione.* Mentre si riconosce il valore dei regimi di chemioprophilassi attuali e del vaccino BCG per la profilassi dell'infezione tubercolare, inclusa quella dei contatti, è indubbio che molti passi devono essere fatti nell'identificazione degli antigeni protettivi di *M. tuberculosis*, per poterli utilizzare magari arricchiti o trasferiti nello stesso BCG od altri vettori. E' importante altresì l'identificazione di fattori soppressivi o modulatori della risposta a *M. tuberculosis*, affinché il vaccino non induca effetti immunosoppressivi. Nonostante vari scetticismi, si ritiene che l'apporto degli anticorpi alla protezione antitubercolare non sia stato finora valutato appieno e debba quindi essere seriamente preso in considerazione.

Studi sono anche necessari per approfondire e innovare i regimi di chemioprophilassi per i soggetti altamente reattivi alla tubercolina e a rischio di infezione tubercolare polmonare ed extra-polmonare, in particolare nel soggetto HIV. Tali regimi dovrebbero anche valutare l'efficacia profilattica di nuovi farmaci, e delle modalità di nuovi schemi terapeutici atti a migliorare la "compliance" del paziente che è critica sia per il successo della profilassi nel singolo paziente, sia per evitare o limitare al minimo l'insorgenza di resistenza ai chemioterapici.

6) *Clinica e assistenza.* Sono in particolare da investigare in quest'area le nuove presentazioni cliniche che la

tubercolosi assume nel soggetto HIV<sup>+</sup>. E' stato già osservato come in questo soggetto le forme extra-polmonari prevalgano su quelle più classiche, e spesso si associno a epidemie di tubercolosi ospedaliera. Aspetti da approfondire ulteriormente, anche ai fini della messa in atto di nuove procedure diagnostiche e terapeutiche, sono le presentazioni cliniche nei soggetti alle varie fasce d'età, e i rapporti reciproci fra la malattia da infezione primaria recente, da riattivazione endogena o da reinfezione esogena. E' compito di questo settore la programmazione e l'esecuzione di trial diagnostici, clinico-terapeutici e/o profilattici atti a valutare nuovi metodi di diagnosi, nuovi farmaci e/o nuove combinazioni di trattamenti nel paziente tubercolotico. Per questi trial, saranno favorite le proposte multicentriche formulate sotto l'egida di gruppi di ricerca clinica già operanti nel settore.

**Progetto**  
**Valutazione dell'efficacia**  
**a lungo termine,**  
**dell'immunità cellulo-mediata,**  
**della prevenzione secondaria**  
**nei contatti familiari,**  
**e dell'effetto della dose**  
**di richiamo dei vaccini**  
**acellulari contro la pertosse**  
**(Studio PROPER)**  
*Responsabile scientifico:*  
*Stefania Salmaso*

La sperimentazione clinica sui vaccini antipertosse terminata recentemente in Italia (Progetto "Pertosse") ha fornito una misura rigorosa dell'efficacia assoluta di 3 vaccini antipertosse somministrati a bambini entro i 6 mesi di età in tre dosi. I due vaccini acellulari utilizzati, somministrati con una formulazione trivalente DTaP (prodotti uno da Chiron Biocine e un altro da SmithKline Beecham, entrambi contenente PT, FHA e pertactina), si sono dimostrati altamente efficaci (ognuno all'84%) nel prevenire la pertosse clinica confermata con criteri di laboratorio, e associati con una bassa frequenza di effetti collaterali. Al contrario, il vaccino a cellule intere utilizzato nello studio (prodotto dalla Connaught Laboratories) ha dimostrato una bassa efficacia (36%) ed è risultato associato ad un'alta frequenza di effetti collaterali comuni e rari.

Sulla base di questi e di altri risultati dello studio, ci si aspetta che i nuovi vaccini acellulari rimpiazzeranno in

modo estensivo il vaccino a cellule intere per l'immunizzazione primaria in tutto il mondo. Comunque, rimane da determinare quale sia la persistenza della elevata protezione clinica. Ciò è importante per formulare appropriate raccomandazioni sull'uso e l'epoca delle dosi di richiamo nei programmi vaccinali dell'Italia e di altri paesi. In attesa di ulteriori informazioni, le autorità sanitarie in molti paesi formuleranno tali raccomandazioni sulla base di ciò che viene eseguito con il vaccino a cellule intere. Le evidenze disponibili circa la durata della protezione dalla pertosse nei bambini vaccinati con il prodotto a cellule intere sono contraddittorie, ma la maggior parte di esse suggerisce una diminuzione nel tempo.

La prima analisi dei dati del Progetto "Pertosse" è stata effettuata per valutare l'efficacia assoluta dei vaccini nei bambini con età media di 23 mesi. Per questa analisi, la sorveglianza ha tenuto conto degli episodi di tosse con inizio fino al 31 dicembre 1994. Tale fase è stata chiamata Stadio I del Progetto "Pertosse". Il periodo compreso tra il 1° gennaio 1995 al 30 novembre 1995 è stato chiamato Stadio II, ed è stato disegnato per esaminare l'efficacia relativa dei vaccini acellulari in condizioni ancora in cieco in un periodo di alta incidenza, a livello nazionale. Nel 1996 le osservazioni sono proseguite con metodi inalterati, ma in condizioni non cieche. Tale prosecuzione dello studio è stata denominata Stadio III del Progetto "Pertosse" o Studio PROPER.

La struttura generale per la raccolta dei dati e dei campioni biologici nello studio PROPER è stata mantenuta e riorganizzata nel 1996: in particolare, è stata mantenuta la sorveglianza attiva continuativa della maggior parte dei bambini che hanno originariamente ricevuto uno dei vaccini antipertosse acellulari, è stato ricostituito un gruppo di controllo di bambini non vaccinati che sono stati arruolati

nello studio osservazionale, dopo verifica dell'assenza di anticorpi per pertosse. Inoltre, è stata avviata un'ulteriore valutazione della risposta immune cellulo-mediata nei bambini vaccinati con i prodotti acellulari in confronto ai bambini non vaccinati che hanno contratto l'infezione da *B. pertussis* confermata con metodi di laboratorio.

La prosecuzione del Progetto "Pertosse" nello Studio III ha ricevuto l'approvazione etica del comitato *ad hoc* istituito presso l'ISS. Un "grant" dai National Institutes of Health statunitensi copre circa il 65% delle risorse necessarie alla conduzione dello studio. Il resto del finanziamento è stato richiesto all'ISS nel capitolo dei fondi 1% del 1996 (non ancora disponibili) e alle regioni partecipanti (una regione ha stipulato una convenzione con fondi 1996).

L'obiettivo primario del PROPER è la valutazione dell'efficacia in epoca prescolare (fino ai sei anni di età) della vaccinazione eseguita nel primo anno di vita con i nuovi vaccini antipertosse, che sono ora di largo uso in Italia. Di fatto lo studio PROPER è l'unico studio al mondo in grado di fornire dati scientifici in base ai quali decidere la necessità e i tempi della somministrazione di dosi di richiamo dei due vaccini acellulari antipertosse europei. I risultati del PROPER quindi sono attesi anche a livello internazionale, dato l'acceso dibattito corrente circa i calendari e i vaccini da adottare per la prevenzione della pertosse.

L'attività prevista per il prossimo triennio, fino al 1999, sarà incentrata sulla sorveglianza della pertosse e su valutazioni di immunogenicità e immunità cellulo-mediata a distanza. Inoltre è allo studio la proposta di effettuare una dose di vaccino come richiamo, in epoca prescolare, per i bambini della coorte che a settembre 1998 inizieranno la scuola elementare. Tale offerta di vaccinazione, se eseguita con vaccini omologhi a quelli utilizzati nella sperimentazione iniziale, permetterà la valutazione della reattogenicità alla quarta dose di vaccino.

**Progetto**  
**Valutazione della lettura**  
**dei preparati citologici**  
**cervico-vaginali mediante**  
**analisi automatica**  
**delle immagini**  
**con PAPNET.**  
**Progetto VALPAP**  
*Responsabile scientifico:*  
*Margherita Branca*

E' stato dimostrato che programmi di screening ben organizzati sono efficaci nel ridurre incidenza e mortalità del cervico-carcinoma invasivo. Lo screening è in grado di individuare le lesioni precorritrici del carcinoma cervicale (SIL di basso grado e SIL di alto grado), prima che queste possano evolvere in forme invasive. Componente fondamentale dei programmi di screening è il monitoraggio sistematico dell'accuratezza e riproducibilità diagnostica. La lettura al microscopio è un processo complesso il cui risultato dipende completamente dal giudizio umano. Da un punto di vista tecnico la lettura prevede che i citologi e il supervisore siano specificamente addestrati in centri accreditati e competenti. Va sottolineata l'importanza della formazione continua dei professionisti sanitari: a questo proposito va sottolineata l'importanza dei "test di competenza" periodici (aptitude test), che sono anche suggeriti da norme europee. Test di competenza sperimentati secondo le norme CEE per citotecnici e per anatomopatologi nel campo della citodiagnostica da screening (cervico-vaginale) sono già stati effettuati in numerosi paesi europei e anche in Italia, presso l'Istituto Superiore di Sanità e alcune università italiane (Padova, Torino, Sassari, Napoli), con il patrocinio dell'Associazione Italiana di Citologia (AIC), della Società Italiana di Anatomia Patologica e Citopatologia Diagnostica (SIAPEC) e dello European Community Training Project for Cervical Cancer Screening (ECTP/CCS), ora divenuto European Federation of Cytology Societies/Committee of Quality Assurance Training and Education (EFCS/QUATE).

Il carico di lavoro per singolo citologo non dovrebbe superare i 50 vetrini al giorno. Al lettore è richiesta la massima attenzione, soprattutto perché talora le cellule anormali presenti in uno striscio sono relativamente scarse.

Numerosi studi hanno dimostrato come le diagnosi citologiche possano presentare notevoli variazioni e come a volte nei laboratori possa essere elevata la percentuale dei falsi negativi (5-45%). Altri studi hanno dimostrato come la

riproducibilità delle diagnosi tra laboratori diversi presenta a volte indici kappa di concordanza piuttosto bassi.

Il raggiungimento di alti livelli di qualità diagnostica citologica è possibile se vengono sistematicamente adottati programmi di monitoraggio di qualità che tengono sotto controllo le principali cause di errore: a) errore di tecnica di prelievo; b) errore di allestimento del vetrino; c) errore di prima lettura (screening); d) errore di supervisione.

Il controllo di qualità si distingue in "interno" ed "esterno". Il controllo di qualità interno si riferisce a tutte quelle procedure di controllo che si attuano quotidianamente all'interno del laboratorio, come il riesame dei negativi, il confronto, nei casi positivi, delle diagnosi citologiche precedenti dello stesso soggetto, la correlazione cito-istologica e il monitoraggio statistico delle diagnosi per singolo citologo. Il controllo di qualità esterno si basa essenzialmente nella distribuzione di vetrini a più centri e nel confronto delle diagnosi sui medesimi vetrini.

Per quanto riguarda il rescreening dei negativi, la soluzione ottimale sarebbe il loro riesame totale, pratica piuttosto onerosa. A questo proposito è stata suggerita la revisione casuale di una parte dei negativi (10%): tale necessità è piuttosto controversa. Si sostiene che la resa di questo controllo (il numero di vetrini falsi negativi identificati) è molto bassa e che il tempo di lavoro del supervisore è troppo prezioso per impiegarlo in questo modo. Al metodo della revisione del 10% si preferisce attualmente, specialmente in Gran Bretagna, il sistema cosiddetto della "revisione rapida". Tutti i vetrini (con l'aggiunta eventuale di qualche vetrino positivo "seminato", vengono passati in rassegna rapidamente a piccolo ingrandimento (obiettivo 10 X) per un tempo medio di 30 secondi per vetrino da parte di tecnici appositamente addestrati.

Un rescreening totale dei negativi potrebbe essere effettuato in alternativa col sistema automatico PAPNET. Il PAPNET consiste di 2 sottosistemi indipendenti l'uno dal-

l'altro e con funzioni distinte:

1) lo "scanner" localizzato in una stazione centrale di analisi, che seleziona, in ciascun striscio cervicale, 2 set di 64 (128) campi di immagine o "formelle", che vengono poi registrate su nastro digitale.

2) la "review station", situata in un laboratorio di citologia, che viene utilizzata dal citologo per esaminare le formelle in cui lo scanner ha riscontrato la presenza di cellule anormali.

Alcuni autori, tra i quali Rilke, Kish, Slagel, Kharazi e Mango, hanno pubblicato lavori di valutazione della sensibilità e specificità del sistema nel rescreeing degli strisci cervico-vaginali.

I vantaggi del rescreeing attuato con il supporto del PAPNET possono essere così riassunti: 1) il citologo osserva immagini non più in movimento, ma statiche, con minore probabilità di commettere errori per stanchezza; 2) le cellule anormali, provenienti da varie parti dello striscio, compaiono nelle formelle l'una accanto all'altra; 3) si attua un risparmio di tempo per il rescreeing, in quanto in una giornata si possono esaminare un maggior numero di strisci.

Il progetto di ricerca multicentrico VALPAP, in fase di attuazione, ha confermato questi aspetti positivi.

D'altra parte, da alcuni dati preliminari della sperimentazione in corso risulta che il sistema PAPNET può presentare alcuni svantaggi: 1) impossibilità di eseguire la scansione di tutto il preparato quando questo sia strisciato su di un'area molto ampia che supera i limiti previsti dal sistema, o quando esso sia in parte coperto dal codice a barre; 2) difficoltà di identificazione degli elementi anormali in presenza di abbondante materiale ematico/necrotico che sembra "accecare" il sistema; 3) talora i quadri presentati nelle formelle PAPNET non corrispondono ai quadri maggiormente significativi nel medesimo vetrino; si è notato ad esempio, in alcuni casi, che quadri patognomonicici di infezione virale od altro si trovano nelle immediate vicinan-

ze dell'elemento prescelto dall'apparecchio; 4) una certa predilezione per la scelta degli artefatti, in particolare i cosiddetti "cornflake"; 5) selezione preferenziale di campi con molti leucociti e/o istiociti; 6) costi elevati.

Il Progetto VALPAP è uno studio multicentrico promosso e coordinato dall'ISS, con finanziamento 1% del Fondo Sanitario Nazionale. Partecipano al progetto 8 Centri di riferimento di citopatologia, ciascuno fornito di stazione PAPNET: 1) Department of Cytopathology and Cytogenetics, St. Mary Hospital Medical School, London; 2) Servizio di Anatomia, Istologia Patologica e Citodiagnostica, Università di Trieste; 3) Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Università di Torino; 4) Servizio di Anatomia Patologica e di Citopatologia, Ospedale S. Pietra Ligure, Savona; 5) Servizio di Anatomia Patologica e di Citodiagnostica, Ospedali Riuniti S. Chiara, Pisa; 6) Dipartimento di Medicina Sperimentale, I<sup>a</sup> Cattedra di Citopatologia, Università "La Sapienza", Roma; 7) Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica, Unità di Citopatologia cervico-vaginale, Istituto Superiore di Sanità, Roma; 8) Servizio di Anatomia Patologica e di Citopatologia, Università Federico II, Napoli.

Partecipano, inoltre, 20 Laboratori pubblici selezionati in modo casuale e rappresentativi delle varie regioni italiane, sprovvisti di stazione PAPNET: 1) Servizio di Anatomia ed Istologia Patologica, USL 3, Foggia; 2) Servizio di Anatomia ed Istologia Patologica, Ospedale "Maggiore della Carità", Novara; 3) Servizio di Anatomia Patologica e di Diagnostica Istocitopatologica, Ospedale "Padre A. Micone", USL 3, Genova; 4) Servizio di Anatomia Patologica, Ospedale Regionale Valle d'Aosta, Aosta; 5) Centro Citologico, USL 5, Terni; 6) Centro Prevenzione Tumori, Azienda Ospedaliera "S. Filippo Neri", Roma; 7) Servizio di Colposcopia e Patologia cervico-vaginale, Azienda Sanitaria 10, Camerino (Macerata); 8) Servizio di Anatomia Patologica, Ospedale Grande degli Infermi, Viterbo; 9)

Servizio di Anatomia Patologica, Azienda Sanitaria 9, Sondrio; 10) Servizio di Anatomia Patologica, USL 28, Vimercate (Milano); 11) Servizio di Anatomia Patologica, Ospedale degli Infermi, Rimini; 12) Servizio di Anatomia Patologica, Ospedale Civile di Palmanova (Udine); 13) Servizio di Anatomia Patologica, Catania; 14) Servizio di Anatomia ed Istologia Patologica, Presidio Ospedaliero "Macedonio Melloni", Milano; 15) Servizio di Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliera di Viareggio (Lucca); 16) Servizio di Anatomia Patologica, Ospedale Civile S. Maria delle Croci, Ravenna; 17) Servizio di Anatomia ed Istologia Patologica e Citologia, Azienda USL 28, Cagliari; 18) Servizio di Anatomia Patologica, USL 35, Castellammare di Stabia (Napoli); 19) Servizio di Anatomia Patologica, USL 2 di Gallipoli (Lecce); 20) Servizio di Anatomia Patologica, Ospedale S. Giovanni e Paolo, USL 11, Venezia.

Gli obiettivi del progetto possono essere così riassunti: 1) valutazione della sensibilità e specificità del sistema PAPNET rispetto alle diagnosi effettuate con screening convenzionale; 2) controllo della capacità del sistema combinato, lettura convenzionale più lettura automatica, di assicurare la riproducibilità diagnostica.

Rispetto a studi precedenti, il Progetto VALPAP mostra le seguenti caratteristiche: a) è multicentrico, comprendente 2 tipologie di laboratori; b) è effettuata la lettura in cieco (rispetto alle notizie cliniche e alla diagnosi originariamente effettuata) dei vetrini al PAPNET e al microscopio; c) prevede la revisione collegiale delle immagini dei preparati "da rivedere", ove esista discrepanza.

E' stata adottata la seguente metodologia:

a) Scelta dei vetrini. Ciascuno degli 8 laboratori di riferimento ha fornito 200 vetrini (170 negativi e 30 positivi) e ciascuno dei 20 laboratori ASL ne ha forniti 75 (60 negativi e 15 positivi). Sono stati così raccolti 1.600 vetrini consecutivi provenienti dagli 8 centri di riferimento e 1.500

vetrini consecutivi provenienti dai 20 laboratori ASL scelti in modo casuale. Il totale dei 3.100 vetrini è stato inviato ad Amsterdam per la scansione.

b) Elaborazione della scheda standardizzata. Per la lettura al PAPNET è stata approntata un'apposita scheda standardizzata in cui sono elencati i motivi per la revisione al microscopio ottico. La lettura al PAPNET e quella al microscopio ottico vanno riportate in codice nella classificazione approntata secondo il sistema Bethesda.

Lo studio si svolge in tre fasi:

1) Fase di addestramento. Ogni laboratorio di riferimento ha letto a rotazione 300 vetrini scelti consecutivamente.

2) Fase di lettura di screening. Ogni laboratorio di riferimento sottopone al PAPNET "in cieco" rispetto alla diagnosi originaria: 200 vetrini propri; 200 vetrini provenienti da un altro laboratorio di riferimento; 375 vetrini provenienti da 5 laboratori ASL, per un totale di 775 vetrini. Ogni vetrino è classificato come "negativo" o "da rivedere". Per ogni vetrino classificato "da rivedere" vengono specificati i motivi di tale decisione secondo le classificazioni riportate nella scheda di risposta. Viene richiesta una diagnosi provvisoria al sistema PAPNET per i vetrini "da rivedere" prima di passare all'esame microscopico. Sia la diagnosi provvisoria che quella al microscopio sono classificate in base alle categorie diagnostiche della scheda.

3) Seconda diagnosi al microscopio. Tutti i preparati, tranne i casi "negativi" alla diagnosi originale e al PAPNET e i casi "da rivedere" non positivi per SIL sia alla diagnosi originaria sia alla diagnosi del laboratorio partecipante, verranno rivisti da un citopatologo degli 8 centri di riferimento, "in cieco" rispetto alla diagnosi iniziale e alla diagnosi del laboratorio partecipante. In caso di discordanza tra le diagnosi, il preparato verrà rivisto indipendentemente da un secondo citopatologo e quindi i 3 citopatologi cercheranno di raggiungere una diagnosi di consenso.

Alla fine dello studio verranno effettuate analisi statistiche, al fine di valutare sensibilità e specificità della lettura dei preparati citologici cervico-vaginali mediante analisi semiautomatica delle immagini con PAPNET in rapporto alla lettura convenzionale al microscopio.

In conclusione, in un laboratorio di citopatologia è indispensabile l'adozione di sistemi di controllo di qualità intra- e interlaboratorio.

Va sottolineato come l'utilizzo attuale del sistema PAPNET per la revisione dei negativi e quindi come metodica di controllo di qualità è possibile a due condizioni: conoscenza approfondita e grande esperienza citopatologica del lettore al microscopio ottico; b) esperienza e confidenza di lettura al PAPNET, raggiungibile solo con un periodo di addestramento al video di almeno 300-500 campioni.

La sperimentazione proposta approfondirà e chiarirà, nel suo prosieguo, altri aspetti dell'utilizzo del sistema PAPNET (ad esempio l'utilizzo in prima istanza come screening primario).

**ALLEGATO 1.  
Elenco delle pubblicazioni 1995**

*Le pubblicazioni, in ordine alfabetico per autori,  
sono suddivise per sottoprogetti  
nell'ambito dei Progetti d'Istituto cui afferiscono.*

**Progetto:  
Ambiente**

**Sottoprogetto 1: Antiparassitari e sostanze pericolose**

Binetti, R. (1995). 3. Hazard identification. In: *Ulmann's encyclopedia of industrial chemistry*. 5<sup>th</sup> Edition. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft. Vol. **88**, p. 182-200.

Camoni, I. (1995). Il problema sanitario dei residui di fitofarmaci negli alimenti. In: *I residui dei prodotti fitosanitari negli ortofrutticoli*. Atti del convegno nazionale. Arezzo, 24-25 novembre 1994. p. 146-149.

Camoni, I., Di Muccio, A., Fabbrini, R. (1995). Assessment of pesticide residue intake in Italy from survey data (1980-1991). In: *Aspects on environmental toxicology*. 33<sup>rd</sup> International congress on forensic (TIAFT) and 1<sup>st</sup> on environmental toxicology (Gretox '95). Thessaloniki (Greece), August 27-31, 1995. V.P. Kotsaki Kovatsi, A.J. Vagliadou (Eds). p. 140-144.

Carere, A., Crebelli, R., Zijno, A., Marcon, F., Leopardi, P., Mosesso, P., Palitti, F., Mantovani, A., Macrì, C., Ricciardi, C., Stazi, A.V., Traina, E., Urbani, E., Ade, P., Fazzi, P. (1995). Valutazione della genotossicità, dell'embriotossicità e della tossicità riproduttiva di pesticidi selezionati. In: *Prevenzione e controllo dei fattori di malattia*. Follonica, 14-16 dicembre 1994. G. Bronzetti, M. Cini, E. Chiesara (Eds). FATMA, Sottoprogetto n. 2, Ambiente e salute. p. 13-20.

Conte, E., Imbroglini, G., Bertolini, E., Camoni, I. (1995). Presence of sprout inhibitor residues in potatoes in relation to application techniques. *J. Agric. Food Chem.*, **43**: 2985-2987.

Di Muccio, A. (1995). Pesticides. Determination of residues. In: *Encyclopedia of analytical science*. London, Academic Press. p. 3782-3792.

Di Muccio, A., Camoni, I., Ventriglia, M., Attard Barbini, D., Mauro, M., Pelosi, P., Generali, T., Ausili, A., Girolimetti, S. (1995). Simplified clean-up for the determination of benzimidazolic fungicides by high-performance liquid chromatography with UV detection. *J. Chromatogr. A*, **697**: 145-152.

Di Muccio, A., Mauro, M., Attard Barbini, D., Dommarco, R., Girolimetti, S., De Merulis, G., Generali, T., Pelosi, P., Ventriglia, M., Sernicola, L. (1995). Indagine sui livelli di residui del fungicida imazalyl su agrumi. *Boll. Chim. Igien.*, **46** (1): 9-16.

Giordano, R., Ciaralli, L., Ciprotti, M., Camoni, I., Costantini, S. (1995). Applicability of high-performance ion chromatography (HPIC) to the determination of fosetyl-aluminum in commercial formulations. *Microchem. J.*, **52**: 68-76.

Marconi, A., Binetti, R., Di Prospero, P. (1995). Le fibre vetrose artificiali: rassegna delle più recenti evidenze scientifiche. *G. Igien. Ind.*, **20** (2): 7-16.

Settimi, L., Ronco, G., Cavone, D., Merlo, F., Musti, M., Comba, P. (1995). Agricoltura. In: *Mortalità per professioni in Italia negli anni '80*. Ministero della Sanità; Regione Piemonte - Progetto ReSò; ISPESL Regioni Italiane - Progetto S.I.PRE. (Quaderni ISPESL). p. 97-104.

*Rapporti tecnici:*

Alessio, L., Crippa, M., Lucchini, R., Binetti, R., Roi, R. (1995). *Data profiles for selected chemicals series. 1. Inorganic mercury compounds. 2. Organic mercury compounds*. Joint Research Centre of the European Commission. Brussels, Luxembourg, ECSC-EC-EAEC. (EUR 16248 EN). 134 p.

Di Muccio, A., Attard Barbini, D., De Merulis, G., Vergori, L., Girolimetti, S., Sernicola, L., Dommarco, R. (1995). *Rapporto sulle revisioni di analisi per residui di antiparassitari: 1988-1995*. Roma, Istituto Superiore di Sanità. (Rapporti ISTISAN, 95/37). 117 p.

*Flusso informativo sugli antiparassitari agricoli*. (1995). Corso tenuto presso l'Istituto Superiore di Sanità. Roma, 28-30 settembre 1994. A cura di G. Petrelli, F. Pace. Roma, Istituto Superiore di Sanità. (Rapporti ISTISAN, 95/11). 89 p.

Petrelli, G., Siepi, G. (1995). L'archivio degli antiparassitari agricoli e flusso informativo. In: *Flusso informativo sugli antiparassitari agricoli*. Corso tenuto presso l'Istituto Superiore di Sanità. Roma, 28-30 settembre 1994. A cura di G. Petrelli, F. Pace. Roma, Istituto Superiore di Sanità. (Rapporti ISTISAN, 95/11). p. 3-8.

*Sottoprogetto 2: Bioelementi ed ambiente*

Alimonti, A., Petrucci, F., Santucci, B., Crisauolo, A., Caroli, S. (1995). Determination of chromium and nickel in human blood by means of inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **306**: 35-41.

Ballanti, P., Martin Wedard, B., Mazzaferro, S., Coen, G., Costantini, S., Giordano, R., Bonucci, E. (1995). Comparison between aluminon and solochrome azurine techniques for the histochemical detection of aluminium in bone of patients with chronic renal failure. *Ital. J. Mineral Electrolyte Metab.*, **9**: 47-51.

Caroli, S. (1995). Element speciation: challenges and prospects. *Microchem. J.*, **51**: 64-72.

Caroli, S., Coni, E., Violante, N., Petrucci, F., Caimi, S. (1995). Alcuni aspetti del trattamento di materiale biologico prima della determinazione di elementi in traccia. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **31** (2): 219-224.

Coni, E., Bocca, A., Ianni, D., Caroli, S. (1995). Preliminary evaluation of the factors influencing the trace element content of milk and dairy products. *Food Chem.*, **52**: 123-130.

Costantini, S., Mazzaferro, S., Pasquali, M., Ballanti, P., Bonucci, E., Chicca, S., De Meo, S., Perruzza, I., Sardella, D., Taggi, F., Coen, G. (1995). Diagnostic value of serum peptides of collagen synthesis and degradation in dialysis renal osteodystrophy. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **10**: 52-58.

Dominici, C., Petrucci, F., Alimonti, A., La Torre, F., Cifani, C., Caroli, S. (1995). Composti antitumorali a base di platino: applicazioni biomediche e aspetti terapeutici. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **31** (2): 289-294.

Elementi in traccia: salute e ambiente. (1995). A cura di S. Caroli, G. Morisi, G. Santaroni. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **31** (2): 217-300.

Giordano, R., Ciaralli, L., Beccaloni, E., Ciprotti, M., Costantini, S. (1995). Presence of major and trace metals in Antarctic sediments: preliminary results. In: *Heavy metals in the environment*. International conference. R.D. Wilken, U. Förstner, A. Knöchel (Eds). Hamburg, September 1995. Vol. **1**, p. 133-136.

Giordano, R., Ciaralli, L., Ciprotti, M., Camoni, I., Costantini, S. (1995). Applicability of high-performance ion chromatography (HPIC) to the determination of fosetyl-aluminium in commercial formulations. *Microchem. J.*, **52**: 68-76.

Menditto, A., Chiodo, F., Giampaoli, S., The DiSCo Project Research Group, Morisi, G. (1995). Association of serum selenium with selected cardiovascular risk factors. *Microchem. J.*, **51**: 170-180.

Morazzoni, F., Canevali, C., Moschetti, I., Todeschini, R., Caroli, S., Alimonti, A., Petrucci, F., Ravasi, G., Bedini, A.V., Milani, F., Palazzi, M., Villa, S., Giudice, G. (1995). Determination of platinum in plasma of patients affected by inoperable lung carcinoma treated with radiotherapy and concurrent low-dose continuous infusion of *cis*-dichlorodiammine platinum(II). *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **35**: 529-532.

Morisi, G., Patriarca, M., Menditto, A. (1995). Controllo di qualità per gli elementi in traccia in medicina occupazionale ed ambientale. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **31** (2): 245-254.

Patriarca, M., Lyon, T.D.B., McGaw, B., Reid, M., Fell, G.S. (1995). Assessment of nickel metabolism in humans, using stable isotopes and ICP-MS. In: *Recent advances in plasma source mass spectrometry*. G. Holland (Ed.). Exeter (UK), BPC Wheatons. p. 224-234.

Petrucci, F., Caimi, S., Mura, G., Caroli, S. (1995). Artemia as a bioindicator of environmental contamination by trace elements. *Microchem. J.*, **51**: 181-186.

Tebano, M.T., Carlini, P., Loizzo, A., Luzi, M., Petrucci, F., Alimonti, A., Caroli, S. (1995). Clinical pharmacokinetics of cumulative very high dose of cisplatin in chemotherapy resistant solid tumors. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **31** (3): 351-357.

#### *Rapporti tecnici:*

Baldini, M., Stacchini, P. (1995). *Mercury in food*. Strasbourg, Council of Europe Publishing. 15 p.

#### **Sottoprogetto 3: Fibre e polveri minerali**

Diociaiuti, M., Falchi, M., Paoletti, L. (1995). Electron energy loss spectroscopy study of iron deposition in human alveolar macrophages: ferritin or hemosiderin? *Microsc. Microanal. Microstruct.*, **6**: 33-40.

Pollice, L., Molinini, R., Paoletti, L., Batisti, D., Caruso, G., Di Nunno, C., Gentile, A. (1995). Riscontro di fibre di asbesto in tessuti extrapolmonari. In: *12° Convegno "Patologia da tossici ambientali e occupazionali"*. Ancona, 18 settembre 1995. Ancona, Università degli Studi. 4 p.

*Sottoprogetto 4: Modelli e metodi di valutazione del rischio genotossico e cancerogeno*

Aquilina, G., Hess, P., Fiumicino, S., Ceccotti, S., Bignami, M. (1995). A mutator phenotype characterizes one of two complementation groups in human cells tolerant to methylation damage. *Cancer Res.*, **55**: 2569-2575.

*Assessing and managing health risks from drinking water contamination: approaches and applications.* (1995). Proceedings of an international symposium. Rome (Italy), 13-17 September 1994. E.G. Reichard, G.A. Zapponi (Eds). Wallingford (Oxfordshire, UK), IAHS (International Association of Hydrological Sciences), Institute of Hydrology. (IAHS Publication; 233). 339 p.

Basic-Zaninovic, T., Meschini, R., Calcagnile, A.S., Palombo, F., D'Errico, M., Proietti-De Sanctis, L., Dogliotti, E. (1995). Strand bias of UV-induced mutations is a transcriptionally active gene in human cells. *Mol. Carcinogen.*, **14**: 214-225.

Benigni, R. (1995). The bone marrow micronucleus assay: relationships with *in vitro* mutagenicity and rodent carcinogenicity. *J. Toxicol. Environ. Health*, **45**: 101-111.

Benigni, R. (1995). Predicting chemical carcinogenesis in rodents: the state of the art in light of a comparative exercise. *Mutat. Res.*, **334**: 103-113.

Benigni, R., Andreoli, C., Cotta-Ramusino, M., Giorgi, F., Gallo, G. (1995). The electronic properties of carcinogens, and their role in SAR studies of noncongeneric chemicals. *Toxicol. Model.*, **1**: 157-167.

Benigni, R., Andreoli, C., Giuliani, A. (1995). Relationships among *in vitro* mutagenicity assays: quantitative versus qualitative test results. *Environ. Mol. Mutagen.*, **26**: 155-162.

Benigni, R., Cotta-Ramusino, M., Giorgi, F., Gallo, G. (1995). Molecular similarity matrices and quantitative structure-activity relationships: a case study with methodological implications. *J. Med. Chem.*, **38**: 629-635.

Ciotta, C., Dogliotti, E., Bignami, M. (1995). Mutation analysis in two newly identified rat p53 pseudogenes. *Mutagenesis*, **10**: 123-128.

*Concern for Europe's tomorrow: health and the environment in the WHO European Region.* (1995). G.A. Zapponi (Contributor). WHO European Centre for Environment and Health. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. 537 p.

Crebelli, R., Andreoli, C., Carere, A., Conti, L., Crochi, B., Cotta-Ramusino, M., Benigni, R. (1995). Toxicology of halogenated aliphatic hydrocarbons: structural and molecular determinants for the disturbance of chromosome segregation and the induction of lipid peroxidation. *Chem.-Biol. Interact.*, **98**: 113-129.

Crebelli, R., Fuselli, S., Turrio Baldassarri, L., Ziemacki, G., Carere, A., Benigni, R. (1995). Genotoxicity of urban air particulate matter: correlations between mutagenicity data, airborne micropollutants, and meteorological parameters. *Int. J. Environ. Health Res.*, **5**: 19-34.

Dogliotti, E., Bignami, M. (1995). Difetti nella riparazione del DNA nella eziopatogenesi del cancro. *Boll. Soc. Ital. Ric. Radiaz. (SIRR)*, **3**: 4-9.

Fuselli, S., Attias, L., Viviano, G., Zapponi, G.A. (1995). Concentrazioni di benzene in aria: considerazioni preliminari sugli scenari di esposizione e rischio. In: *Qualità dell'aria nell'ambiente urbano e industriale*. A. Frigerio (Ed.). Milano, Gruppo Scientifico Italiano Studi e Ricerche. p. 45-56.

Fuselli, S., Benigni, R., Conti, L., Carere, A., Crebelli, R. (1995). Volatile organic compounds (VOCs) and air mutagenicity: results of one year monitoring at an urban site. *Int. J. Environ. Health Res.*, **5**: 123-132.

Zapponi, G.A., Attias, L., Marcello, I. (1995). Dose-response analysis and effect assessment under uncertainty. In: *Assessing and managing health risks from drinking water contamination: approaches and applications*. Proceedings of an International symposium. Rome (Italy), 13-17 September 1994. E. Reichard, G.A. Zapponi (Eds). Wallingford (Oxfordshire, UK), IAHS (International Association of Hydrological Sciences), Institute of Hydrology. (IAHS Publication; 233). p. 175-186.

#### **Sottoprogetto 5: Modelli e metodi di valutazione del rischio tossicologico**

Ade, P., Guastadisegni, C., Testai, E., Vittozzi, L. (1995). Multiple activation of chloroform in kidney microsomes from male and female DBA/2J mice. *J. Biochem. Toxicol.*, **9** (6): 289-295.

Baroncelli, S., Karrer, D., Turillazzi, P.G. (1995). Oral bis(tri-n-butyltin) oxide in pregnant mice. I. Potential influence of maternal behavior on postnatal mortality. *J. Toxicol. Environ. Health*, **46**: 335-367.

Fabrizi, L., D'Agostino, G., Testai, E., Vittozzi, L. (1995). Ruolo delle differenti isoforme del P450 nel metabolismo del diazinon. In: *Atti del II Convegno "Progetto finalizzato prevenzione e controllo dei fattori di malattia (FATMA)"*. Follonica (GR), 14-16 dicembre 1994. G. Bronzetti, M. Cini, E. Chiesara (Eds). Consiglio Nazionale delle Ricerche. Pisa, Poligrafico CNR. p. 411-430.

Gallo, D., Merendino, A., Keizer, J., Vittozzi, L. (1995). Acute toxicity of two carbamates to the guppy (*Poecilia reticulata*) and the zebrafish (*Brachidanio rerio*). *Sci. Total Environ.*, **171** (1/3): 131-136.

Guastadisegni, C., Ade, P., Vittozzi, L. (1995). Modulation of chloroform metabolism in freshly isolated rat hepatocytes. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **14**: 71-73.

Karrer, D., Baroncelli, S., Turillazzi, P.G. (1995). Oral bis(tri-*n*-butyltin) oxide (TBTO) in pregnant mice. II. Alterations in haematological parameters. *J. Toxicol. Environ. Health*, **46**: 369-377.

Keizer, J., D'Agostino, G., Nagel, R., Volpe, T., Gnemi, P., Vittozzi, L. (1995). Enzymological differences of AChE and diazinon hepatic metabolism. Correlation of *in vitro* data with the selective toxicity of diazinon to fish species. *Sci. Total Environ.*, **171** (1/3): 213-220.

Macrì, A., Mantovani, A. (1995). The safety evaluation of residues of veterinary drugs in farm animal tissues and products. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **14** (2): 119-129.

Mantovani, A., Macrì, C., Ricciardi, C., Stazi, A.V. (1995). Histological alterations in gestational day 13 rat embryos from albendazole-treated dams. *Congen. Anomalies*, **35**: 25-36.

Mantovani, A., Ricciardi, C., Stazi, A.V., Macrì, C. (1995). Effects observed on gestational day 13 in rat embryos exposed to albendazole. *Reprod. Toxicol.*, **9** (3): 265-273.

Mantovani, A., Stazi, A.V., Ricciardi, C., Macrì, C., Zapponi, G.A. (1995). Early indicators of developmental toxicity. In: *Assessing and managing health risks from drinking water contamination: approaches and applications*. Proceedings of an International symposium. Rome (Italy), 13-17 September 1994. E. Reichard, G.A. Zapponi (Eds). Wallingford (Oxfordshire, UK), IAHS (International Association of Hydrological Sciences), Institute of Hydrology. (IAHS Publication; 233). p. 187-193.

Testai, E., Di Marzio, S., Di Domenico, A., Piccardi, A., Vittozzi, L. (1995). An *in vitro* investigation on the reductive metabolism of chloroform. *Arch. Toxicol.*, **70**: 83-88.

**Sottoprogetto 6: Sostanze chimiche esistenti: selezione di priorità mediante modelli matematici e saggi di screening tossicologico**

Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. *ATLA*, **23**: 129-147.

**Sottoprogetto 7: Ecotossicità e destino ambientale**

Berlincioni, M., Croce, G., Ferri, F., Iacovella, N., La Rocca, C., Lolini, M., Megli, A., Pupp, M., Rizzi, L., Turrio Baldassarri, L., Di Domenico, A. (1995). Priority organic microcontaminants in selected environmental and food matrices. *Fresenius Environ. Bull.*, **4**: 169-174.

Bonadonna, L., Di Girolamo, L., Liberti, R. (1995). Studio preliminare sulle acque e sui sedimenti del fiume Arrone (Roma): aspetti microbiologici. *Acqua Aria*, **3**: 315-318.

Bruno, M., Congestri, R., D'Archino, R., Mengarelli, C., Caroppo, C., Benedettini, G., Marchiori, E. (1995). Ecologia di *Dinophysis caudata* lungo le coste del Lazio. *Ambiente, Risorse, Salute*, **4** (36): 26-32.

Bruno, M., Pierdominici, E., Ioppolo, A., Serse, A.P., Iela, M.T., Sechi, N. (1995). Fattore neurotossico associato ad una fioritura di Cianoficee nel mare Mediterraneo. *Biologia Oggi*, **9** (2): 87-92.

Dal Cero, C., Di Carlo, M., Bonadonna, L., Liberti, R., Volterra, L. (1995). Andamento storico delle trasformazioni dei sedimenti marini del nord Adriatico in corrispondenza di corpi fluviali. *Inquinamento*, **2**: 70-76.

Di Domenico, A. (1995). Detection and evaluation of PCDDs and PCDFs in Italian soils. In: *Kriterien zur Beurteilung organischer Bodenkontaminationen: Dioxine (PCDD/F) und Phthalate*. G. Kreysa, J. Wiesner (Eds). Deutsche Gesellschaft für Chemisches Apparatewesen, Chemische Technik und Biotechnologie. Frankfurt am Main, DECHEMA. p. 105-132.

Di Domenico, A. (1995). Studio per la valutazione dell'impatto ambientale e del rischio per l'uomo associati ai microinquinanti con alta tossicità (PCDD, PCDF, PCB, IPA, ecc.) emessi da attività produttive e non, nell'ambiente di vita e di lavoro, nonché della loro mobilità suolo-pianta e del bioaccumulo in tessuti vegetali. In: *Atti del Convegno su "Aspetti igienico-sanitari associati alla presenza di microinquinanti organici non normati (IPA e Nitro-IPA, PCB, PCDD, PCDF)"*. Firenze, Dipartimento di Sicurezza Sociale, Regione Toscana - Giunta Regionale. p. 5-85.

Di Domenico, A., Lupi, C., De Felip, E., Ferri, F., Iacovella, N., Miniero, R., Scotto di Tella, E., Tafani, P., Turrio Baldassarri, L., Volpi, F. (1995). Clusters of kin analytes: detection thresholds of individual components and representativeness of cumulative results. In: *Organohalogen compounds. Dioxin '95*. 15th International symposium on chlorinated dioxins and related compounds. Edmonton (Canada), August 21-25, 1995. D. Bolt, R. Clement, H. Fielder, B. Harrison, S. Ramamoorthy, E. Reiner (Eds). Vol. 23, p. 165-170.

*Dioxine und Phthalate im Boden: eine kritische und vergleichende Bewertung. (Dioxins and phthalates in soil: a critical and comparative assessment)*. (1995). Compiled by W. Klein, W. Kördel, G.H.M. Krause, J. Wiesner. Frankfurt am Main, DECHEMA. 24 p.

[Per l'Istituto Superiore di Sanità ha partecipato: A. Di Domenico].

Gallo, D., Merendino, A., Keizer, J., Vittozzi, L. (1995). Acute toxicity of two carbamates to the guppy (*Poecilia reticulata*) and the zebrafish (*Brachidanio rerio*). *Sci. Total Environ.*, **171** (1/3): 131-136.

Keizer, J., D'Agostino, G., Nagel, R., Volpe, T., Gnemi, P., Vittozzi, L. (1995). Enzymological differences of AChE and diazinon hepatic metabolism: correlation of *in vitro* data with the selective toxicity of diazinon to fish species. *Sci. Total Environ.*, **171**: 213-220.

Migliore, L., Brambilla, G., Cozzolino, S., Gaudio, L. (1995). Effects on plants of sulphadimetoxine used in intensive farming (*Panicum miliaceum*, *Pisum sativum* and *Zea mais*). *Agric. Ecosyst. Environ.*, **52**: 103-110.

Rodriguez, F., Berlincioni, M., Ferri, F., Turrio Baldassarri, L., Di Domenico, A. (1995). Presenza di microinquinanti non normati in ambiente urbano. In: *Qualità dell'aria nell'ambiente urbano e industriale*. A. Frigerio (Ed.). Milano, Gruppo Scientifico Italiano Studi e Ricerche. p. 13D-31D.

Turrio Baldassarri, L., Bocca, A., Di Domenico, A., Fulgenzi, A.R., Iacovella, N., La Rocca, C. (1995). PCB contamination in samples from the Italian diet, dairy products, and agricultural soil. *Microchem. J.*, **51**: 191-197.

Turrio Baldassarri, L., Di Domenico, A., Iacovella, N., La Rocca, C., Mediati, M.G., Rodriguez, F. (1995). PCB congener profile and contamination levels of Italian national and regional diets. In: *Organohalogen compounds. Dioxin '95*. 15th International symposium on chlorinated dioxins and related compounds. Edmonton (Canada), August 21-25, 1995. D. Bolt, R. Clement, H. Fielder, B. Harrison, S. Ramamoorthy, E. Reiner (Eds). Vol. **26**, p. 121-124.

Volterra, L. (1995). Comments on some health and ecotoxicological features of Adriatic mucilages. *Sci. Total Environ.*, **165**: 225-228.

Volterra, L. (1995). Disinfezione. Conseguenze e possibili alternative. *Quaderni di Tecniche di Protezione Ambientale*, 153-169.

Volterra, L. (1995). Problemi connessi con le alghe rilevabili nelle acque potabili. In: *Acque potabili. I problemi microbiologici esistenti*. A cura di G. Pollicino. Bologna, Pitagora Editrice. (Quaderni di tecniche di protezione ambientali - Protezione delle acque sotterranee). Vol. **44**, p. 171-175.

*Rapporti tecnici:*

Di Domenico, A., La Rocca, C., Rodriguez, F., Conti, L., Crebelli, R., Crochi, B., Ferri, F., Iacovella, N., Turrio Baldassarri, L., Ziemacki, G. (1995). *Ecotossicologia ed effetti biologici di inquinanti inorganici ed organici nel sistema lagunare veneziano. Caratterizzazione dei microinquinanti chimici a maggiore potenziale mutageno nei mitili e nel loro habitat*. Roma, Istituto Superiore di Sanità. (Rapporti ISTISAN, 95/3). 59 p.

Gruppo di lavoro dell'Istituto Superiore di Sanità "Esposizione della popolazione italiana ad idrocarburi policiclici aromatici in aria". (1995). *Metodo per la determinazione di idrocarburi policiclici aromatici (IPA) in aria*. A cura di E. Menichini. Roma, Istituto Superiore di Sanità. (Rapporti ISTISAN, 95/9). 19 p.